

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biotechnologie der Nutztiere

Regulation der Expressionsaktivität humaner endogener Retroviren (HERVs)

Olivia Christina Diem

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. D. Langosch

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. A. Schnieke, Ph.D.

2. apl. Prof. Dr. C. Leib-Mösch
(Universität Heidelberg)

Die Dissertation wurde am 26. 04. 2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09. 08. 2011 angenommen.



Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Retroviren	1
1.2	Humane endogene Retroviren (HERVs)	1
1.2.1	Klassifikation und Nomenklatur	2
1.2.2	LTR-Region und regulatorische Elemente	4
1.2.3	Einfluss von HERV LTRs auf die zelluläre Genexpression	5
1.2.4	Endogene Retroviren in der Primatenevolution	6
1.2.5	Repräsentative HERV-Gruppen	8
1.2.5.1	HERV-H	8
1.2.5.2	HERV-W	8
1.2.5.3	ERV9	9
1.2.5.4	HERV-F	9
1.2.5.5	HERV-K(HML-1) - (HML-10)	9
1.2.5.6	HERV-L	11
1.2.6	Regulation von HERVs durch epigenetische Modifikationen	11
1.2.6.1	DNA Methylierung von Retroelementen	12
1.2.6.2	Chromatin-Modifikationen	14
1.2.7	Aktivierung reprimierter HERVs	15
1.2.8	HERVs und Erkrankungen des Menschen	16
1.2.8.1	HERVs und Krebs	16
1.2.8.2	HERVs und Autoimmunerkrankungen	17
1.2.8.3	HERVs und psychische Störungen	18
1.2.9	Antipsychotische Medikamente	20
1.2.9.1	Haloperidol- ein typisches Neuroleptikum	21
1.2.9.2	Risperidon und Clozapin- zwei atypische Neuroleptika	21
1.2.9.3	Valproinsäure	23
1.2.9.4	5-Azacytidin	23
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Material	26
2.1.1	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	26

2.1.2	Oligonukleotide	.26
2.1.2.1	„Mixed oligonucleotide primers“ (MOP) für die Multiplex-PCR	.26
2.1.2.2	Oligonukleotide des Retrovirus-spezifischen Microarray („Capture Probes“)	.29
2.1.2.3	Kontroll-Oligonukleotide zur Qualitätssicherung des Retrovirus-spezifischen Microarrays	.31
2.1.2.4	Primer-Sequenzen für die Kontroll-PCR nach dem DNase Verdau	.32
2.1.2.5	Primer-Sequenzen für die quantitative RT-PCR (qRT-PCR)	.32
2.1.2.6	Primer-Sequenzen für die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	.33
2.1.2.7	Primer-Sequenzen für die Methylierungsanalysen	.33
2.1.2.8	Primer-Sequenzen für die Mutationsanalyse	.34
2.1.3	Das Plasmid- pLXSNEGFP	.34
2.1.4	Prokaryotische Zellen und Bakterienmedien	.34
2.1.5	Puffer und Lösungen	.35
2.1.6	Chemikalien und Reagenzien	.36
2.1.7	Enzyme, Proteine und Antikörper	.38
2.1.8	Sonstige Labormaterialien	.39
2.1.9	Zelllinien und Kulturmedien	.40
2.1.10	<i>Postmortem</i> Gehirnproben	.42
2.1.11	Makaken-Gehirnproben	.42
2.1.12	Geräte	.43
2.1.13	Software und Datenbanken	.44
2.2	Methoden	.45
2.2.1	Zellkulturtechniken	.45
2.2.1.1	Auftauen und Kultivierung adhärenter humaner Zellen	.45
2.2.1.2	Kultivierung von humanen primären Gehirnzellen (ANBC)	.45
2.2.1.3	Kultivierung der humanen neuralen Stammzelllinie HNSC.100	.45
2.2.1.4	Aussäen von Zellen	.46
2.2.1.5	Einfrieren von Zellen	.46
2.2.1.6	MTT Assay	.46
2.2.1.7	Behandlung der Zellen mit verschiedenen Medikamenten	.46
2.2.1.8	Transfektion eukaryotischer Zellen mit gereinigter Plasmid-DNA.	.47
2.2.1.9	Infektion von Zellen mit rekombinanten Viruspartikeln	.47
2.2.1.10	Isolierung von Zellklonen	.47

2.2.1.11 FACS-Analyse (“Fluorescence activated cell sorting”)	48
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	48
2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus humanen Zellen	48
2.2.2.2 RNA Isolierung aus humanen Zellen	48
2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
2.2.2.4 DNase Verdau und Kontroll-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	48
2.2.2.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	49
2.2.2.6 Retrovirus-spezifischer Microarray	50
2.2.2.7 Quantitative Reverse Transkriptase-PCR	55
2.2.2.8 Bisulfit Sequenzierung	57
2.2.2.9 Agarosegelelektrophorese	58
2.2.2.10 DNA Isolierung aus Agarosegelen	58
2.2.2.11 Klonierung von PCR-Fragmenten in den pGEMT-Vektor	58
2.2.2.12 Transformation von E.coli-Bakterien mit Plasmid-DNA	59
2.2.2.13 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	59
2.2.2.14 DNA-Restriktionsverdau	60
2.2.2.15 Sequenzierungen	60
2.2.2.16 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	60
2.2.2.17 Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) für Mutationsanalysen/Standard	60
3 Ergebnisse	62
3.1 Einfluss antipsychotischer Medikamente auf die Expression von humanen endogenen Retroviren (HERVs) in menschlichen Gehirnzellen	62
3.1.1 Zytotoxische Effekte verschiedener Antipsychotika auf Gehirnzellen	64
3.1.2 HERV-Transkriptionsprofil von unbehandelten Gehirnzellen – der.. HERV-spezifische Microarray	66
3.1.3 Qualitative Analyse des HERV-Transkriptionsprofils in verschiedenen Gehirnzellen nach Behandlung mit Antidepressiva oder Neuroleptika mittels des . Retrovirus-spezifischem Microarrays	69
3.1.4 Quantitative Analyse der Expression ausgewählter HERV-(Sub)Gruppen mittels . qRT-PCR	78
3.1.4.1 Quantifizierung der HERV-Expression nach VPA-Behandlung	78
3.1.4.2 Quantifizierung der HERV-Expression nach Behandlung mit Haloperidol, Risperidon oder Clozapin	83
3.1.5 Untersuchung der (H)ERV-Expression im Gehirn von Rhesusaffen (<i>M. mulatta</i>) nach Behandlung mit Antipsychotika	86

3.1.6	Expression von HERV-W, ERV9 (ERV9) und HML-2 in <i>postmortem</i> Proben von Patienten mit Schizophrenie und bipolaren Störungen	89
3.2	Regulation der HERV-K(HML-2) Transkription	93
3.2.1	Methylierungsstatus von unterschiedlich aktiven HERV-K(HML-2) Loci	93
3.2.1.1	Methylierungsanalyse von unterschiedlich aktiven HERV-K(HML-2) Loci in der Modellzelllinie Tera-1	95
3.2.1.2	Methylierungsanalyse der 5'LTR unterschiedlich aktiver HERV-K(HML-2) Loci in gesundem Gehirngewebe	97
3.2.1.3	Methylierungsanalyse der 5'LTR unterschiedlich aktiver HERV-K(HML-2) Loci im Gehirngewebe eines schizophrenen Patienten	97
3.2.1.4	Korrelation zwischen Methylierungsgrad und Locus-Aktivität	100
3.3	Einfluss von VPA auf einzelne HERV-K(HML-2) Loci am Beispiel einer Modellzelllinie - Effekte auf epigenetischer Ebene?	102
3.3.1	Methylierungsstatus ausgewählter HERV-K(HML-2) Loci in der Gehirnzelllinie HNSC.100 nach Behandlung mit antipsychotischen Medikamenten	102
3.3.2	Chromatin-Status ausgewählter HERV-K(HML-2) Loci in VPA behandelten HNSC.100 Zellen mittels Chromatin-Immunoprecipitation	103
3.4	Regulation der HERV-LTR gesteuerten Expression nach <i>de novo</i> Infektion mit HERV-MLV Hybridvektoren	105
3.4.1	Expressionsaktivität verschiedener HERV-H und HERV-L Vektoren in infizierten Zellklonen über einen Zeitraum von sechs Monaten	106
3.4.2	Der Rückgang der Reportergenexpression in MIAPaCa-2 Zellen ist vermutlich nicht auf einen Verlust des Provirus zurückzuführen	111
3.4.3	Mutationen im regulatorischen Bereich oder im Reportergen als mögliche Ursache für die verringerte Expression	112
3.4.4	Behandlung eines teilweise inaktivierten Zellklons mit verschiedenen epigenetisch wirksamen Medikamenten - ein Reaktivierungsversuch	112
3.4.4.1	Zytotoxische Effekte verschiedener Medikamente auf MIAPaCa-2 Zellen	113
3.4.4.2	Aktivität des HERV Promoters von LXSN-HERV-H-MC16 in MIAPaCa-2 Zellen nach Behandlung mit epigenetisch wirksamen Medikamenten	115
4	Diskussion	117
4.1	Das HERV Expressionsmuster menschlicher Gehirnzelllinien entspricht im Wesentlichen dem spezifischen HERV-Expressionsprofil des Gehirns.	118
4.2	Das antipsychotische Medikament Valproinsäure kann die HERV Expression beeinflussen - Haloperidol, Risperidon und Clozapin zeigen kaum Wirkung	118
4.3	Antipsychotika beeinflussen nicht die Gesamtaktivität der HERV-K(HML-2) Gruppe	122
4.4	Untersuchungen an <i>postmortem</i> Gehirnproben von Patienten weisen auf einen leichten Einfluss von VPA hin	123

4.5	Epigenetische Modifikationen der HERV-K(HML-2) LTR-Sequenzen in verschiedenen Zelltypen und unter Einfluss von VPA	124
4.6	HERV-Promotoren können Transgene über einen längeren Zeitraum stabil exprimieren	128
4.7	HERVs und Schizophrenie	129
4.8	Ausblick	132
5	Zusammenfassung	133
6	Summary	135
A	Anhang	137
B	Abkürzungen	147
C	Literaturverzeichnis	150
	Danksagung	168

1 Einleitung

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms ergab, dass es zu fast 45% aus sogenannten transponierbaren genetischen Elementen, wie LTR-Retrotransposons, Nicht-LTR-Transposons und DNA-Transposons besteht (Lander *et al.* 2001; Venter *et al.* 2001). Den größten Anteil davon bestreiten die Nicht-LTR-Retrotransposons wie LINEs („Long Interspersed Nuclear Elements“) mit 21,0% und SINEs („Short Interspersed Nuclear Elements“) mit 13,6% (Waterston *et al.* 2002). Außerdem konnte ein beachtlicher Anteil von etwa 8,6% als viralen Ursprungs identifiziert werden. Diese sogenannten humanen endogenen Retroviren (HERVs) gehören zu den LTR-Retrotransposons und werden als Relikte früherer Keimbahninfektionen durch exogene Retroviren angesehen (Mager *et al.* 2003; Sverdlov 2005).

1.1 Retroviren

Retroviren stellen aufgrund ihrer prominenten Vertreter wie z. B. HIV-1 und HTLV-1 eine bedeutende Virusgruppe dar, deren charakteristisches Merkmal ihr einzelsträngiges RNA-Genom mit einer doppelsträngigen DNA als Zwischenprodukt ist. Diese wird durch das vom Virus kodierte Enzym Reverse Transkriptase (RT) generiert (zur Hausen 2010). Die doppelsträngige DNA wird als Provirus in das Wirtsgenom integriert. Die Familie der *Retroviridae* ist anhand von morphologischen und genetischen Unterschieden, sowie Besonderheiten während der Infektion in sieben Genera eingeteilt worden, Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta und Epsilon-Retroviren, sowie Lenti- und Spumaviren (Coffin *et al.* 1997). Neben den exogenen Retroviren, die in ihrem Genom meist alle Informationen für den Ablauf eines Infektionszyklus mit Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln besitzen, existieren auch endogene Retroviren.

1.2 Humane endogene Retroviren (HERVs)

HERVs gelangten durch Infektion von Keimbahnzellen durch exogene Retroviren vor circa 70 bis 40 Millionen Jahren in das Primatengenom. Dadurch wurden sie normale Bestandteile des menschlichen Genoms und werden als genetisch fixierte Elemente gemäß den Mendel'schen Regeln weitervererbt (Mager *et al.* 2003; Leib-Mösch *et al.* 2004). Im Laufe der Evolution fanden HERVs aufgrund ihrer Fähigkeit zur Amplifikation durch Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom und der damit verbundenen vertikalen Transmission, Reinfektion und/oder Retrotransposition in Keimbahnzellen Verbreitung. Im Gegensatz zu den endogenen Retroviren anderer Spezies (ERVs) haben HERVs die Fähigkeit zur selbständigen Replikation und Infektion verloren. Jedoch können sich solche defekten Viruskopien noch intrazellulär verbreiten (Abb. 1). Sie benötigen dazu nur die Enzyme reverse Transkriptase und Integrase, für die sie selbst kodieren oder die sie von anderen Retroelementen zur Verfügung gestellt bekommen. Hierbei wird retrovirale, retrovirusähnliche oder auch zelluläre RNA in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der Integrase

neu ins Genom integriert. Durch diesen Vorgang können mehrere tausend Kopien produziert und beliebig im Genom verteilt werden. Im Laufe der Primatenevolution haben sich somit endogene Retroviren über alle Chromosomen verteilt.

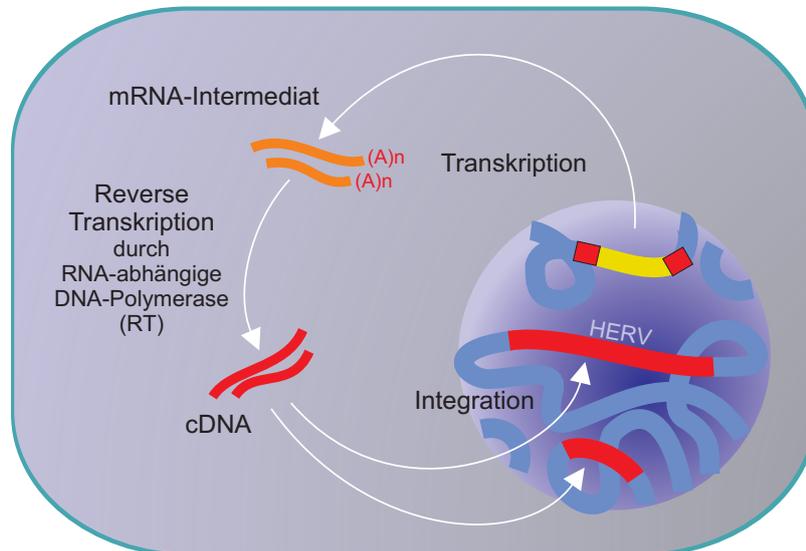


Abb. 1: Mechanismus der Retrotransposition. Das integrierte Retroelement wird transkribiert, das RNA-Intermediat wird mittels RT in cDNA umgeschrieben und mittels Integrase neu ins Genom integriert (Abbildung verändert nach W. Seifarth).

Heute ist bekannt, dass das menschliche Genom zu 8-9% aus retroviralen Sequenzen besteht (Mager *et al.* 2003). Von diesen circa 450.000 integrierten Proviren enthalten insgesamt circa 8000 Elemente *pol*-ähnliche Sequenzen (Villesen *et al.* 2004), wobei 3661 ein komplettes oder zumindest partielles offenes Leseraster (ORF) besitzen (Jern *et al.* 2005). Kennzeichnend für komplette Proviren sind, wie bei den exogenen Retroviren, die codierenden Regionen *gag*, *pol* und *env*, die von „Long Terminal Repeats“ (LTRs) flankiert werden (vgl. 1.2.2). Die drei Gene sind in HERVs allerdings meist durch Mutationen oder Deletionen stark verändert bzw. verkürzt und deshalb stellen HERVs im allgemeinen nicht-infektiöse, replikationsdefekte Fossilien dar, welche vor allem in der frühen Primatenevolution aktiv waren. Jedoch konnte in zahlreichen Untersuchungen gezeigt werden, dass wenigstens einige Vertreter jeder HERV-Gruppe weiterhin transkriptionell aktiv sind, und HERV Sequenzen auch heute noch einen wesentlichen Bestandteil des menschlichen Transkriptomts stellen (Stauffer *et al.* 2004; Forsman *et al.* 2005; Seifarth *et al.* 2005; Muradrasoli *et al.* 2006).

1.2.1 Klassifikation und Nomenklatur

Die Einteilung der HERVs in drei Klassen wird aufgrund von Sequenz-Homologien zu exogenen Retroviren im *pol*-(RT) Bereich vorgenommen (Griffiths 2001; Mager *et al.* 2003), da diese proviralen Genomabschnitte die stärkste phylogenetische Konservierung aller retroviralen Gene aufweisen (Xiong *et al.* 1988). So gehören Klasse I HERVs zu den Gamma-Retroviren und sind

beispielsweise mit dem Murinen Leukämievirus (MLV) verwandt (Jern *et al.* 2005) (Abb. 2). Während Klasse II HERVs zu den Beta-Retroviren zählen und Ähnlichkeiten mit dem Maus-Mamma-Tumorvirus (MMTV) aufweisen, werden Klasse III HERVs zu den Spumavirus-Verwandten gerechnet. Die einzelnen Klassen werden nochmals in HERV-Gruppen unterteilt. Dies beruht auf der Spezifität ihrer Primer-Bindestelle (PBS) für die tRNA, die als Primer für die cDNA-Synthese benötigt wird. Der HERV-Name beruht auf dem Einbuchstabencode der Aminosäure, mit der die tRNA beladen ist. So steht zum Beispiel HERV-W für die HERV Gruppe, deren Vertreter eine Tryptophan-tRNA an ihre PBS gebunden haben. Mittlerweile sind allerdings auch phylogenetisch unterscheidbare HERV-Gruppen bekannt, die dieselben PB-Stellen aufweisen, weshalb diese Einteilung oft nicht ganz stimmig ist. HERV Gruppen, die mit dem humanen exogenen Retrovirus HIV (Lentivirus) oder HTLV (Delta-Retrovirus) verwandt sind, wurden im menschlichen Genom nicht gefunden.

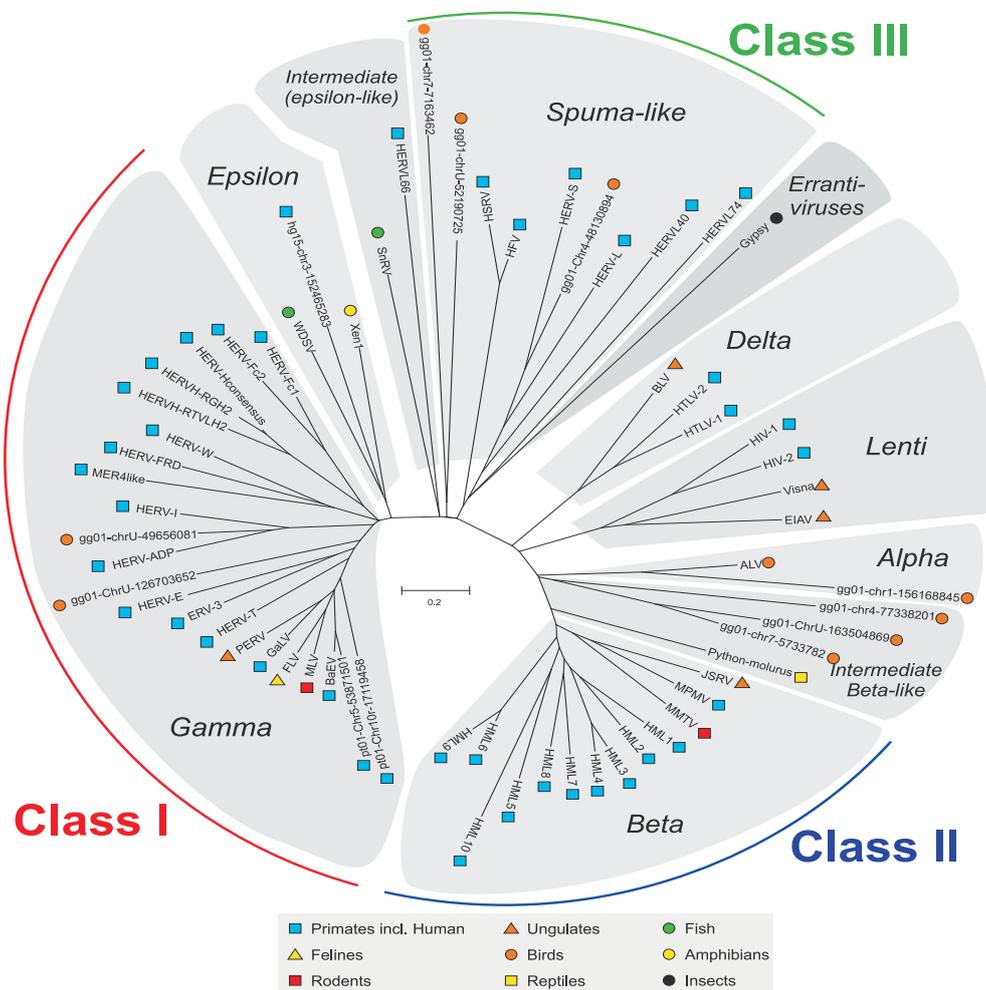


Abb. 2: Einteilung der einzelnen HERVs in drei Klassen (Jern *et al.* 2005). Zu sehen ist sowohl die Verwandtschaft mit exogenen als auch mit endogenen Retroviren anderer Spezies. Die phylogenetische Zuordnung basiert auf der DNA-Sequenz der *pol*-Region (Xiong *et al.* 1988). Rot dargestellt sind Vertreter in Nagetieren, wie MLV (Klasse I) oder MMTV (Klasse II).

Die einzelnen HERV-Gruppen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Sequenz, sondern auch in der Anzahl der HERV Kopien im menschlichen Genom. So konnten beispielsweise 1000 provirale HERV-H, aber nur 60 provirale HERV-K(HML-2) und zehn HERV-KC4(HML-10) Elemente im Genom identifiziert werden (Mager *et al.* 2003).

1.2.2 LTR-Region und regulatorische Elemente

Die retroviralen LTRs („Long terminal Repeats“) enthalten alle regulatorischen Sequenzen, die für die Genexpression erforderlich sind. LTRs werden während der reversen Transkription durch Verdopplung der 5' und 3' terminalen Sequenzen der viralen RNA generiert (Coffin *et al.* 1997). Der hohe Anteil von HERVs im Genom ist zu etwa 10% auf provirale Elemente zurückzuführen. Den weitaus größeren Anteil von insgesamt 90% machen sogenannte solitäre LTRs aus (Mager *et al.* 2003). Diese einzelnen LTRs entstanden nach Rekombinationsereignissen zwischen der 5'- und der 3'-LTR von Proviren, was zum Verlust der internen kodierenden Sequenzen geführt hat. Im Gegensatz zu den viralen Genen haben die LTRs im Laufe der Evolution ihre regulatorische Funktion weitgehend behalten. Dies gilt auch für solitäre LTRs. Die meisten solitären LTRs sind, wie viele provirale Elemente, noch transkriptionell aktiv und zeigen je nach Herkunft eine unterschiedliche Gewebespezifität (Schön *et al.* 2001; Schön *et al.* 2009).

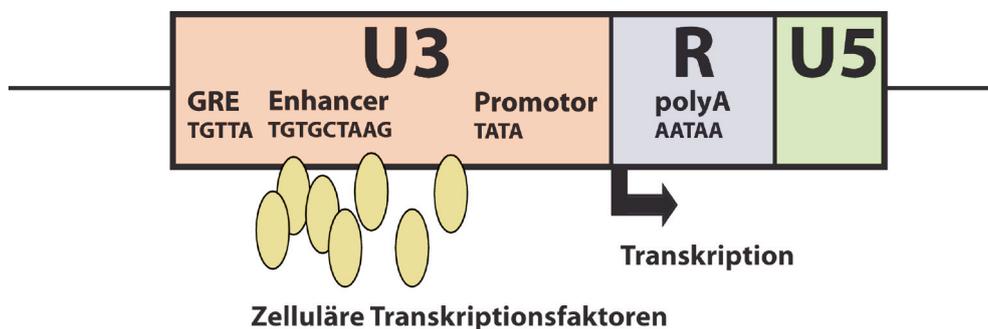


Abb. 3: Schematische Darstellung einer retroviralen LTR mit den Abschnitten U3, R und U5. Eingezeichnet ist auch die Lage der regulatorischen Sequenzen, wie Promotor, Enhancer und Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren. Zusätzlich ist die Nukleotid-Bindesequenz des GRE („Glucocorticoid-responsive element“), des Enhancers, des TATA-Bindeproteins und des Poly-A-Signals angegeben. Der Beginn der R-Region ist definiert durch den Startpunkt der Transkription innerhalb der 5'LTR. Innerhalb der U3 Region befinden sich verschiedene Transkriptionsfaktor-Bindestellen.

Die regulatorischen Sequenzen, die die gewebespezifische Expression vermitteln, wie z.B. Promotoren, Enhancer-Elemente und Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, befinden sich vorwiegend im U3-Bereich der LTRs (Abb. 3). Der Beginn der R-Region ist definiert durch den Startpunkt der Transkription innerhalb der 5'LTR und endet mit der Polyadenylierungsstelle an der Grenze zum U5-Bereich. Die proviralen und solitären HERV-LTRs stellen ein enormes Reservoir an mobilen regulatorischen Signalen dar, die die Expression benachbarter zellulärer Gene beeinflussen oder für die Generierung neuer Gene genutzt werden können (vgl. 1.2.3). Frühere Untersuchungen an

etwa 100 proviralen und solitären HERV-LTRs (HERV-H, K, T, E und L Gruppen) aller drei HERV-Klassen in einem promotorlosen Vektor haben ergeben, dass rund zwei Drittel der gemessenen LTRs noch aktiv sind und die Expression eines beliebigen Gens kontrollieren können (Schön *et al.* 2001; Schön *et al.* 2009). Die Expression der isolierten HERV-LTRs unterschied sich deutlich in den getesteten Zelllinien und es konnte eine Zelltypspezifität beobachtet werden, die der Gewebespezifität der Proviren entspricht (Seifarth *et al.* 2003; Seifarth *et al.* 2005).

Es gibt etwa 459.000 LTR-Elemente im menschlichen Genom, davon stellen HERVs der Klasse I mit 113.000 Kopien eine große Gruppe dar, gefolgt von HERVs der Klasse III mit 89.000 und Klasse II HERVs mit 8000 Kopien. Neben HERVs mit insgesamt 4,77% sind die MaLR („mammalian apparent LTR-Retrotransposons“) mit 3,78% bedeutende Vertreter der LTR-Elemente (Lander *et al.* 2001; Li *et al.* 2001; Waterston *et al.* 2002).

1.2.3 Einfluss von HERV LTRs auf die zelluläre Genexpression

Da die zahlreichen LTRs im Genom regulatorische Sequenzen beinhalten, ist ein Einfluss auf die Expression benachbarter Gene möglich. Dies kann auf unterschiedliche Weise geschehen (Landry *et al.* 2002; Jordan *et al.* 2003; Leib-Mösch *et al.* 2005; Jern *et al.* 2008).

Promotorfunktion von LTRs. Es sind mehrere Beispiele bekannt, in denen HERV-LTRs die Initiation zellulärer Gene bewirken. Die Transkription kann innerhalb einer 5'LTR (Landry *et al.* 2002) oder direkt am Promotor einer 3' oder solitären LTR (Medstrand *et al.* 2001) beginnen. Beispielsweise ist ein HERV-K(HML-10) Element an der Gewebe-spezifischen Expression des Gens INSL4, das vermutlich bei der Morphogenese der menschlichen Plazenta eine maßgebliche Rolle spielt, beteiligt. In diesem Fall beginnt die Initiation der Transkription in der 3'-LTR eines Provirus (Bieche *et al.* 2003).

Alternatives Spleißen. Die meisten HERVs enthalten in der Nähe der 5' LTR eine starke Spleiß-donorstelle (SD), die für die Expression des *env*-Gens essentiell ist. Fehlt jedoch die dazugehörige virale Spleißakzeptorstelle (SA) zwischen *pol* und *env* aufgrund von Mutationen oder Deletionen kann die HERV LTR Sequenz an ein Exon eines stromabwärts gelegenen Gens gespleißt werden. Ein Beispiel hierfür ist das HERV-R Element, ERV3, das stromabwärts des *H-plk* („Human provirus-linked Krüppel“) Gens integriert ist (Kato *et al.* 1987; Kato *et al.* 1990). Von diesem HERV-R Element lassen sich drei unterschiedliche Spleißprodukte ableiten.

Intergenes Spleißen. Als Beispiel sei das PLA2L Transkript genannt, das mit dem für ein Verdauungsenzym im Pankreas kodierenden Phospholipase A2-Gen verwandte Sequenzen enthält, (Feuchter-Murthy *et al.* 1993) und ausschließlich in Teratokarzinom-Zellen vorkommt. Ausgehend von der 5' LTR eines HERV-H Provirus wird das Transkript von der viralen Spleißdonorstelle in zwei stromabwärts liegende Gene gespleißt. Diese beiden Gene *hhla1* (HERV-H-LTR-associating 1) und *oc90* (cotoconin-90) liegen in unmittelbarer Nähe und werden normalerweise unabhängig voneinander von verschiedenen zellulären Promotoren exprimiert (Wang *et al.* 1998; Kowalski *et al.* 1999).

Enhancer Funktion und Gewebespezifität. HERV-LTRs können auch bestimmte Enhancer Funktionen übernehmen. Ein klassisches Beispiel, wie eine HERV-LTR die Gewebespezifität durch Bereitstellen von Transkriptionsfaktor-Bindestellen beeinflussen kann, ist die Regulation der Expression dreier Amylase Gene durch ein HERV-E Element (Samuelson *et al.* 1988; Ting *et al.* 1992; Meisler *et al.* 1993). Der Mensch besitzt einen Komplex aus fünf Amylasegenen mit unterschiedlichen gewebespezifischen Aktivitäten. Zwei sind im Pankreas (AMY2A, AMY2B) und drei in den Speicheldrüsen (AMY1A, AMY1B, AMY1C) aktiv (Samuelson *et al.* 1988). Bei den drei in der Speicheldrüse exprimierten Genen hat die Insertion eines HERV-E Elements in umgekehrter Orientierung „upstream“ eines Pankreasspezifischen Promotors eine Umwandlung in einen Speicheldrüsen-spezifischen Promotor bewirkt. Die Enhanceraktivität des HERV-LTR Elements ist unabhängig von seiner Orientierung. Die spezifische Expression des Amylasegens in der Speicheldrüse durch Insertion eines HERV-E Elements kann einen evolutionären Vorteile für die Erschließung neuer Nahrungsquellen bedeutet haben.

Polyadenylierung. Eine weitere Fähigkeit von LTRs ist die Polyadenylierung zellulärer Transkripte. Ein Beispiel ist das LEPR („human-leptin-receptor“)-Gen, dessen Transkription durch ein integriertes HERV-K(HML-2) Element beeinflusst wird (Kapitonov *et al.* 1999). In diesem Fall wird die Proteinsequenz von Exon 20 durch 67 Aminosäuren aus der HERV-K(HML-2) LTR-Region ersetzt. Während die ursprünglich längere Form in den JAK/STAT Signalweg involviert ist, könnte die kürzere Version für den Transport und die Regulation der Konzentration von freiem Leptin im Blut verantwortlich sein. Ein weiteres Beispiel ist ein durch eine HERV-K(HML-4) LTR Sequenz polyadenyliertes antisense-Transkript mit Homologie zu einem Exon des humanen Tyrosinphosphatase 1 Gens, das eine Rolle bei der Genregulation dieses Enzyms spielen könnte (Baust *et al.* 2000). Die oben genannten Beispiele zeigen, dass die Expression zellulärer Gene durch LTRs eine wichtige Bedeutung für den Menschen hat.

1.2.4 Endogene Retroviren in der Primatenevolution

Im Verlauf der Primatenevolution gelangten HERVs im Wesentlichen in zwei Schüben in das Genom (Abb. 4). Die erste Invasion erfolgte bereits vor über 40 Millionen Jahren, vor der Trennung der Linien der Altweltaffen (Catarrhine) und der Neuweltaffen (Platyrrhine). Die meisten im Menschen identifizierten HERV Elemente wurden jedoch nur in Altweltaffen gefunden (Greenwood *et al.* 2005). Von diesen wurden später einige Gruppen unabhängig voneinander in verschiedenen Primatenlinien amplifiziert. Die Vermehrung erfolgte entweder durch Retrotransposition wie bei einem Großteil der HERV-H Elemente (Belshaw *et al.* 2005) oder durch wiederholte Reinfektionen wie bei der HERV-K(HML-2) Gruppe (Belshaw *et al.* 2004). Die Analyse des Vorkommens von HERVs im Menschen und in verschiedenen Primaten kann damit zu phylogenetischen Studien herangezogen werden (Abb. 4).

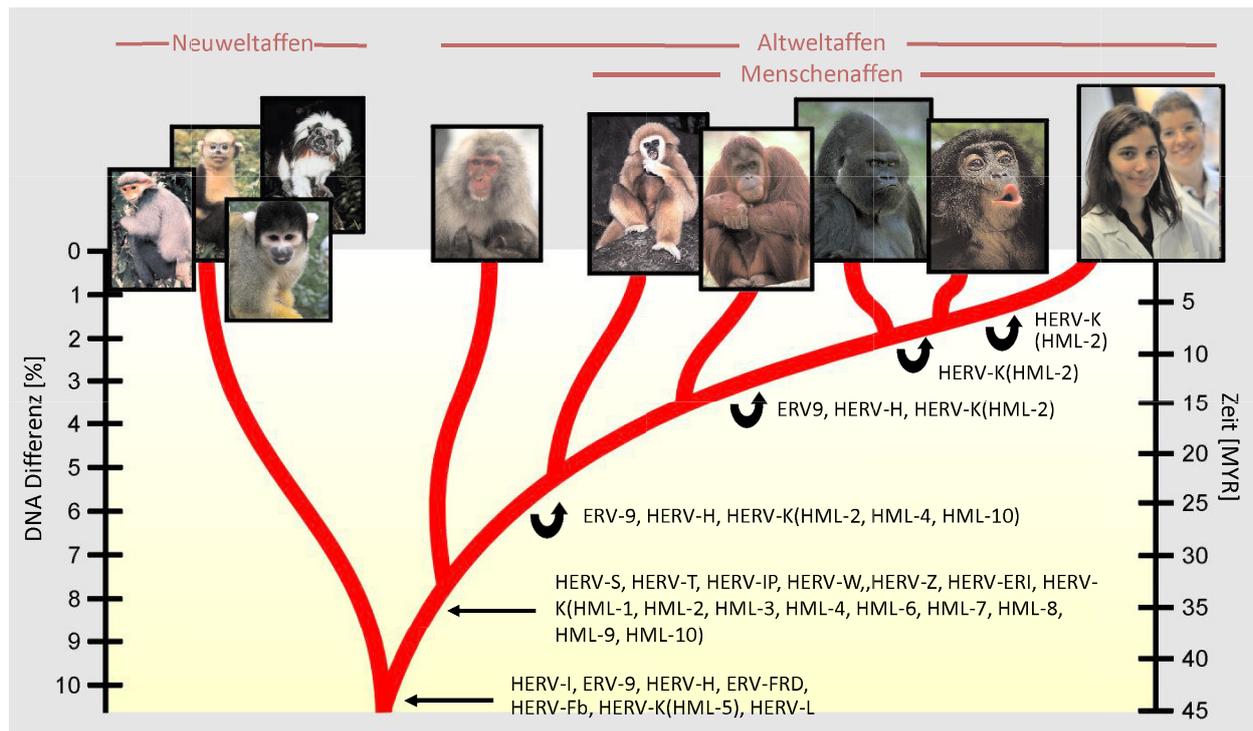


Abb. 4: Integration und Expansion von HERVs in der Primatenevolution. Es sind sowohl die vermuteten Zeitpunkte der Integration ins Genom als auch die Amplifikation im Genom dargestellt. Die Skala auf der rechten Seite zeigt die Zeit in Millionen Jahren, während an der linken Skala der Unterschied der Genome zwischen den einzelnen Spezies aufgetragen ist. Ein gerader Pfeil repräsentiert ein Integrations- und ein geschwungener Pfeil ein Amplifikationsereignis (Graphik verändert nach W. Seifarth).

Die jüngste Amplifikation von HERV-K(HML-2) geschah vor entwicklungsgeschichtlich kurzer Zeit, nämlich vor fünf Millionen Jahren, nach der evolutionären Trennung von Menschen und Schimpansen (Medstrand *et al.* 1998; Lebedev *et al.* 2000; Barbulescu *et al.* 2001). Dies erklärt warum auch HERV-K(HML-2) Polymorphismen im humanen Genom gefunden wurden, die auf Amplifikationsereignisse vor nicht allzu langer Zeit in der Entwicklungsgeschichte des Menschen hinweisen (Turner *et al.* 2001; Hughes *et al.* 2004; Macfarlane *et al.* 2004; Mamedov *et al.* 2004; Belshaw *et al.* 2005; Moyes *et al.* 2007).

Repräsentativ für Altweltaffen wurde das Genom von Rhesusaffen (*M. mulatta*) sequenziert (Gibbs *et al.* 2007). Es enthält wie das humane Genom rund 50% repetitive Sequenzen und knapp eine halbe Million LTR Elemente (7,7%) (Han *et al.* 2007). Mit Ausnahme der human-spezifischen HERV-K(HML-2) Integrationen enthält es dieselben HERV Elemente wie das humane Genom. Zusätzlich konnten horizontale Übertragungen von ERVs in dieser Abstammungslinie nachgewiesen werden, die ausschließlich in Altweltaffen vorkommen und in acht neuen HERV Gruppen (MacERVK1, MacERVK2, MacERV1, MacERV2, MacERV3, MacERV4, MacERV5a und MacERV 6) mit insgesamt 2750 proviralen Kopien resultierten (Han *et al.* 2007). Fünf der acht nach der Trennung von Altweltaffen und Hominoiden erworbenen ERV Gruppen gehören zu den Klasse I und die anderen drei zu den Klasse II Retroviren. Desweiteren wurden sieben (H)ERV Gruppen identifiziert, die in Altweltaffen nach der Trennung von den Menschenaffen aktiv waren und sich mit

über 3500 Kopien im Rhesusaffengenom präsentieren (Han *et al.* 2007). Da diese ERVs von Sequenzen abstammen, die bereits im Genom eines gemeinsamen Vorfahren von Hominoiden und Altweltaffen vorkamen, findet man Verwandte dieser Sequenzen auch im humanen Genom.

1.2.5 Repräsentative HERV-Gruppen

1.2.5.1 HERV-H

Ursprünglich als RTVL-H beschrieben (Mager *et al.* 1984) stellt HERV-H die größte HERV Gruppe dar und umfasst 1124 provirale Sequenzen und etwa 1000 solitäre LTRs (Mager *et al.* 2003; Jern *et al.* 2004). Ihr Vorkommen in Alt- und in Neuweltaffen zeigt, dass ihre Integration vor rund 40 Millionen Jahren stattgefunden haben muss. Seitdem haben sie sich mehrmals durch Retrotranspositionen vor circa 30 bis 15 Millionen Jahren im Genom vermehrt (Mager *et al.* 1995). Etwa 900 provirale HERV-H Sequenzen besitzen aufgrund einer 1,8 kb großen Deletion kein *env*-Gen. Diese *env*-Mutanten konnten nicht in Neuweltaffen, jedoch in allen Altweltaffen nachgewiesen werden (Wilkinson *et al.* 1993). Die HERV-H Familie ist in drei Subfamilien Typ I, Typ Ia und Typ II (Mager *et al.* 1989) unterteilt. Diese einzelnen Typen unterscheiden sich grundlegend in der Anzahl und Anordnung einzelner „Repeats“ in der U3-Region. Die Untersuchung der Promotoraktivität in Plasmidvektoren klonierter HERV-H LTRs anhand eines Luziferase Assays zeigte besonders hohe Aktivitäten (Schön *et al.* 2001). HERV-H-CL1 als Vertreter des Typ Ia ist vor allem in LC5-HeLa Zellen und Astrozyten (U-373MG), aber auch in Pankreaskarzinomzellen (MIAPaCa-2) und in Hautkeratinozyten (HaCaT) aktiv. HERV-H-MC16 gehört zum Typ I und zeigt eine etwas geringere Aktivität als HERV-H-CL1, ist aber ebenfalls in LC5-HeLa, U-373MG und HaCaT Zellen aktiv, am stärksten jedoch in MIAPaCa-2 Zellen (Schön *et al.* 2001; Schön *et al.* 2009). Insgesamt weisen die Mitglieder der gleichen Subfamilie deutliche Unterschiede in der Zelltypspezifität auf. HERV-H TypII ist weitgehend inaktiv (Feuchter *et al.* 1990). Die Zelltypspezifitäten der in Plasmide oder retroviralen Vektoren klonierten HERV-H LTRs spiegeln weitgehend die Gewebespezifität der endogen exprimierten Proviren wieder (Seifarth *et al.* 2005).

1.2.5.2 HERV-W

Mitglieder der HERV-W Gruppe (früher auch als Multiple Sklerose (MS) assoziierte Retroviren (MSRV) bekannt) wurden ursprünglich im Überstand kultivierter Zellen von Patienten mit MS isoliert und weiter charakterisiert (Perron *et al.* 1989; Perron *et al.* 1991). Als Vertreter der Gamma-retrovirus-Verwandten gehört HERV-W zu den Klasse I HERVs. Insgesamt sind in etwa 1140 HERV-W Elemente im menschlichen Genom bekannt, 40 davon enthalten interne Sequenzen, die kompletten oder partiellen retroviralen Genen (*gag*, *pol*, *env*) entsprechen (Mager *et al.* 2003). Alle übrigen HERV-W Elemente sind solitäre LTRs. Wie die meisten HERVs sind auch diese Vertreter der Klasse I HERV aufgrund von Deletionen oder Punktmutationen defekt. Bisher konnte kein Replikations-kompetentes HERV-W Provirus identifiziert werden (Laufer *et al.* 2009). Eine Analyse der transkriptionellen Aktivität in verschiedenen menschlichen Geweben mittels eines HERV-spezifischem Microarrays ergab, dass HERV-W in 17 von 19 untersuchten Geweben aktiv ist (Seifarth *et al.* 2005). Außerdem gibt es einen HERV-W *env* Locus, der ein komplettes offenes Leseraster

(ORF) für ein funktionales Env Protein, Syncytin-1 genannt, enthält (ERVWE1; Chromosom 7q21.2) (Bonnaud *et al.* 2004; Bonnaud *et al.* 2005). Syncytin-1 wird in plazentalen Syzytiotrophoblasten des Menschen exprimiert und spielt eine essentielle Rolle bei der Bildung der Plazenta (Mi *et al.* 2000).

1.2.5.3 ERV9

Ein anderer Vertreter der Klasse I HERVs ist die Gruppe ERV9, die nah mit HERV-W verwandt, jedoch evolutionär gesehen jünger ist. La Mantia *et al.* isolierten 1991 ERV9 als eine neue endogene retrovirale Sequenz aus einer humanen embryonalen Karzinom cDNA Bibliothek (La Mantia *et al.* 1991). Das menschliche Genom enthält in etwa 300 provirale Kopien und circa 5000 einzelne LTR Sequenzen (Mager *et al.* 2003). ERV9 Transkripte wurden zunächst in undifferenzierten embryonalen Karzinomzellen (NT2/D1) und in Gehirnzellen entdeckt (Lania *et al.* 1992; Lindeskog *et al.* 1993). Jedoch wurde später eine Aktivität in beinahe allen untersuchten Geweben mittels eines HERV-spezifischen Microarray nachgewiesen (Seifarth *et al.* 2005). Eine Besonderheit stellt die ERV9 LTR gesteuerte Expression des Zinkfinger *Gen*s *ZNF80* dar (Di Cristofano *et al.* 1995).

1.2.5.4 HERV-F

Phylogenetische Analysen haben ergeben, dass die Gammaretrovirus-verwandte HERV-F-Gruppe eng mit HERV-H verwandt ist (Patzke *et al.* 2002). Erstmals 1996 beschrieben (Widegren *et al.* 1996), konnten Kjellman *et al.* 1999 weitere Mitglieder der HERV-F Gruppe detektieren (Kjellman *et al.* 1999). Das haploide humane Genom enthält in etwa 100 provirale Sequenzen und 650 solitäre LTRs (Mager *et al.* 2003). HERV-F wird zusammen mit anderen HERV Gruppen ubiquitär im menschlichen Gehirn exprimiert (Frank *et al.* 2005). Außerdem repräsentiert HERV-F ein konstitutiv aktives Mitglied im Brustdrüsengewebe des Menschen, dessen Expression in Brusttumorgewebe mancher Patientinnen leicht erhöht war (Frank *et al.* 2008).

1.2.5.5 HERV-K(HML-1) - (HML-10)

Als Klasse II HERVs zusammengefasst werden die Beta-Retrovirus-verwandten HERVs, die fast alle durch eine PBS komplementär zur t-RNA für Lysin charakterisiert sind und daher früher auch als „HERV-K Superfamilie“ bezeichnet wurden. HERV-K Elemente werden in zehn Gruppen untergliedert, HML-1 bis HML-10 (Andersson *et al.* 1999), wobei HML für „human endogenous mouse mammary tumor (MMTV)-like“ steht (Medstrand *et al.* 1993). Die erste Beschreibung einer HERV-K Sequenz erfolgte 1982 von Callahan *et al.* aufgrund von Sequenz-Ähnlichkeiten zu dem murinen Mammatumovirus (MMTV) und konnte später der HERV-K(HML-2) Gruppe zugeordnet werden (Callahan *et al.* 1982). Insgesamt sind rund 550 HERV-K Proviren und 6350 solitäre LTRs im menschlichen Genom bekannt (Mager *et al.* 2003). Davon gehören circa 150 provirale Sequenzen und 700 LTRs zu HML-3. Den geringsten Anteil mit etwa 10 proviralen und 100 LTRs stellt HML-10 dar. Allgemein werden die meisten HERV-K Gruppen in menschlichem Gewebe exprimiert, wenn auch mit unterschiedlicher Häufigkeit (Medstrand *et al.* 1993; Seifarth *et al.* 2005). Von besonderer Bedeutung ist HERV-K(HML-2), da diese Gruppe mit am besten charakterisiert ist und die jüngste und aktivste HERV-Gruppe darstellt. Erstmals von Ono *et al.* 1986 isoliert (Ono *et al.* 1986), konnten insgesamt circa 60 provirale und rund 2500 LTR Mitglieder im menschlichen

Genom identifiziert werden (Reus *et al.* 2001; Mager *et al.* 2003). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass HML-2 immer noch eine relativ intakte HERV Gruppe mit ORFs für alle retroviralen Gene darstellt (Löwer *et al.* 1993; Mayer *et al.* 1997), obwohl die Integration ins Genom vor circa 35 Millionen Jahren nach der Trennung von Alt- und Neuweltaffen erfolgt sein muss. Ebenfalls außergewöhnlich ist die Tatsache, dass HML-2 polymorphe Integrationsorte im menschlichen Genom aufweist, was darauf hindeutet, dass einzelne HERV-K(HML-2) Elemente noch in jüngster Zeit, möglicherweise noch heute, menschliche Keimbahnzellen infiziert haben (Belshaw *et al.* 2004). Bis heute konnten 13 HERV-K Elemente mit variablem Vorkommen in der menschlichen Population identifiziert werden (Hughes *et al.* 2004; Macfarlane *et al.* 2004; Belshaw *et al.* 2005; Moyes *et al.* 2007).

In retroviralen Partikeln, die von der humanen Teratokarzinom-Zelllinie GH produziert werden, konnten HERV-K(HML-2) Gag Proteine durch Immunelektronenmikroskopie nachgewiesen werden (Boller *et al.* 1993). Außerdem könnten HML-2 Gag und Env Proteine möglicherweise als diagnostische Marker bei Keimzelltumoren dienen, da Patienten häufig einen erhöhten Antikörpertiter gegen diese Proteine aufweisen (Sauter *et al.* 1995; Sauter *et al.* 1996; Boller *et al.* 1997).

Generell sind bei HERV-K(HML-2) hauptsächlich zwei Deletionsereignisse, die unabhängig voneinander stattfanden, zu unterscheiden. Eine Variante mit einer 292 Basen Deletion am *pol-env* Übergang wird als Typ 1 bezeichnet, die Variante ohne Deletion als Typ 2 (Ono *et al.* 1986). Beide Provirus Typen wurden im Genom weiter amplifiziert. In etwa zur selben Zeit entstanden im Laufe der Evolution aus HERV-K(HML-2) Typ 2 (auch als HERV-K(OLD) bezeichnet) durch eine Deletion von 96 Basen im *gag* Bereich die moderne Variante mit Deletion, die für alle beim Menschen gefundenen Insertionspolymorphismen verantwortlich ist (Mayer *et al.* 1998; Reus *et al.* 2001).

HERV-K(HML-2) Elemente sind die bislang einzigen bekannten HERVs, die außer für Strukturproteine auch für regulatorische Proteine, Rec und Np9, kodieren (Armbruster *et al.* 2002; Mayer *et al.* 2004). Während HERV-K(HML-2) Typ 2 für Rec kodiert, stammt Np9 von der mutierten Form Typ 1. Rec zeigt ähnliche Eigenschaften wie HIV-Rev, da es ebenfalls im Nukleus lokalisiert ist und ungespleißte HERV-K(HML-2) RNA exportiert (Magin *et al.* 1999; Boese *et al.* 2000; Magin-Lachmann *et al.* 2001). Ein weiteres Protein Np9 wurde in verschiedenen Zelllinien im Nukleus exprimiert gefunden (Armbruster *et al.* 2002). Ferner wurde von einer Interaktion zwischen HERV-K Np9 und Rec mit PLZF („Promyelotic leukemia zinc finger“) (Denne *et al.* 2007) sowie von Np9 und dem Liganden Nump Protein X, das im Notch Signalweg eine Rolle spielt berichtet (Armbruster *et al.* 2004).

Nach einer aktuellen Studie wird die HERV-K(HML-2) LTR durch die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 reguliert (Fuchs *et al.* 2011). Obwohl manche HERV-K(HML-2) Elemente ORFs für alle essentiellen retroviralen Proteine besitzen, konnte bisher keine Infektiosität nachgewiesen werden (Mayer *et al.* 2005). Vor wenigen Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass nur wenige Mutationen nötig sind, um auf der Basis einer Konsensus-Sequenz dieser Proviren ein voll funktionstüchtiges und *in vitro* infektiöses Virus zu rekonstruieren (Dewannieux *et al.* 2006; Lee *et al.* 2007).

1.2.5.6 HERV-L

Als Vertreter der Klasse III HERVs sei die evolutionär betrachtet wesentlich ältere HERV Gruppe HERV-L erwähnt. Ihr Alter wird auf circa 100 Millionen Jahre geschätzt (Smit 1993; Benit *et al.* 1999). Im menschlichen Genom sind 200 provirale Elemente und etwa 6000 solitäre LTRs (Mager *et al.* 2003) bekannt. 1995 wurde zum ersten Mal ein HERV-L Provirus von Cordonnier *et al.* beschrieben (Cordonnier *et al.* 1995). Die codierende Region des HERV-L Prototyps wird von nur zu 82% identischen LTRs flankiert, was für ein hohes Alter dieses Provirus spricht. Verwandte HERV-L Elemente wurden in allen untersuchten Säugergenomen nachgewiesen (Herniou *et al.* 1998). Untersuchungen der HERV-Expression in humanen Geweben mittels HERV-Microarray-Analysen zeigen, dass HERV-L eine äußerst strikte Gewebespezifität aufweist und spezifisch nur in Haut, Uterus, Plazenta, Zervix und Schilddrüse aktiv ist (Seifarth *et al.* 2005). Diesen Ergebnissen entsprechend zeigen isolierte HERV-L LTRs vor allem in Zelllinien, die von diesen Geweben abgeleitet sind, hohe Aktivitäten. So sind HERV-L LTRs vor allem in HaCaT- (Ursprungsgewebe: Keratinozyten, Haut), aber auch in KLE- (Ursprungsgewebe: Uterus) und HeLa-Zellen (Ursprungsgewebe: Zervix) besonders aktiv. Aufgrund der signifikanten Gewebespezifität der einzelnen HERV-LTRs wurden für weitere Untersuchungen mit Hilfe von Promotor-konversionsvektoren sogenannte HERV-MLV-Hybridvektoren hergestellt, die die Promotorregion von HERVs enthalten (Schön *et al.* 2009). Dunn *et al.* konnten zeigen, dass die gewebespezifische Expression des β -Galactosyltransferasegens (β -3GAL-T5) im Darm durch eine HERV-L LTR ermöglicht wird (Dunn *et al.* 2003; Dunn *et al.* 2005).

1.2.6 Regulation von HERVs durch epigenetische Modifikationen

In den letzten Jahrhunderten trugen zahlreiche Entdeckungen und Entwicklungen dazu bei mehr über die Erbinformation zu erfahren. Angefangen über Mikroskopietechniken im 19. Jahrhundert, die erstmals einen Einblick in zelluläre Organellen wie den Nukleus und die Chromosomenstruktur ermöglichten, über G. Mendel und die Aufklärung der DNA Struktur von J. Watson und F. Crick 1953 (Watson *et al.* 1953). Basierend auf der Entdeckung von Restriktionsenzymen durch W. Arber und der Sequenziermethode von F. Sanger konnten komplette Genome inklusive das des Menschen entschlüsselt und Gene identifiziert werden (Lander *et al.* 2001; Venter *et al.* 2001). Die Gesamtheit der genetischen Information eines Organismus ist hinsichtlich der Expression von einzelnen Genen sehr heterogen. So werden manche Genabschnitte sehr häufig und andere eher selten transkribiert. Das Genom ist hoch organisiert und bald war ersichtlich, dass viele biologische Phänomene nicht allein anhand der DNA Sequenz zu erklären und zu verstehen sind. Beispielsweise gibt es unterschiedliche Phänotypen bei genetisch identischen Individuen.

Heute ist bekannt, dass die Genexpression auf verschiedenen Ebenen reguliert wird (Van Driel *et al.* 2003). Zum einen wird die Transkription auf DNA-Ebene gesteuert. Transkriptionsfaktoren mit unterschiedlicher Spezifität binden an regulative DNA Sequenzen wie Promotoren, „Enhancer“ und „Silencer“ und aktivieren bzw. reprimieren die Transkription. Dazu kommen epigenetische Mechanismen, die der eigentlichen Transkription eines Gens vorgeschaltet sind. Epigenetik wird definiert als vererbare Änderung der Genfunktion, die sich nicht durch Änderungen der primären

DNA-Sequenz erklären lässt (Sugimoto *et al.* 2009). Es gibt zwei Hauptkategorien der epigenetischen Modifikationen: Zum einen die DNA-Methylierung und zum anderen Histonmodifikationen (Abb. 5). Während die DNA durch Methylierung von Cytosin-Resten in CpG-Dinucleotiden modifiziert werden kann (Bird 2002), unterliegen die N-terminalen Reste der Histon-Proteine unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung (Kouzarides 2007). Der wesentliche Einfluss auf die Chromatin-Struktur und Genfunktion ist dabei abhängig von Typ und Lokalisierung der Modifikation. Während die meisten Formen der Histon-Modifikation dynamisch sind und damit leicht rückgängig gemacht werden können, führt eine DNA-Methylierung im Bereich von Promotoren zu einer stabilen langfristigen Inaktivierung der Genexpression (Kouzarides 2007).

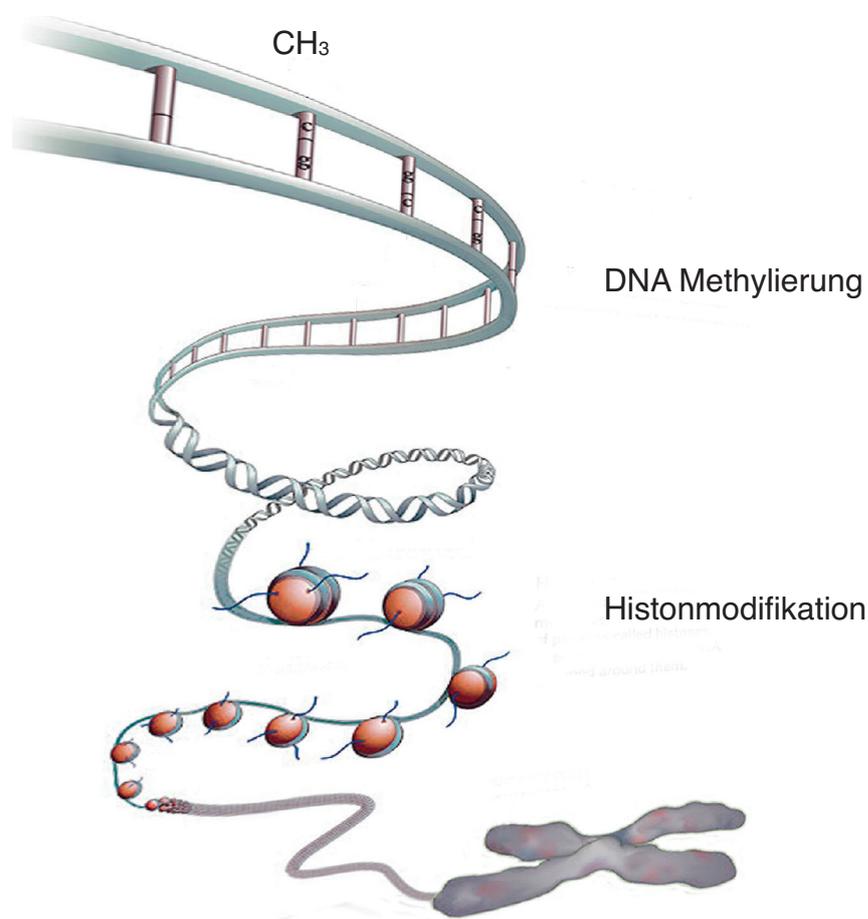


Abb. 5: Grundlegende Mechanismen der epigenetischen Regulation sind DNA-Methylierung und Histonmodifikationen am N-terminalen Rest. [Graphik verändert nach (Qiu 2006)].

1.2.6.1 DNA Methylierung von Retroelementen

Die Methylierung der DNA erfolgt am C5-Atom eines Cytosins in CpG Dinucleotiden durch mehrere DNA Methyltransferasen (DNMT) (Klose *et al.* 2006). Methyliertes Cytosin kann auf zwei Wegen die Transkription inhibieren, zum einen direkt durch das Blockieren der Bindung von Transkriptionsfaktoren (Watt *et al.* 1988) und zum anderen indirekt durch Methyl-CpG-bindende Pro-

teine, die Repressoren der Transkription rekrutieren (Nan *et al.* 1997). Damit hat die DNA-Methylierung einen erheblichen Einfluss auf die zelluläre Genexpression (Razin 1998). In menschlichen somatischen Zellen sind in etwa 80% aller CpG-Dinukleotide methyliert (Jaenisch *et al.* 2003). CpG-Dinukleotide sind oft in sogenannten CpG-Inseln zusammengefasst, die häufig im 5' Bereich von Genen liegen und möglicherweise für die Gewebespezifität der Genexpression von Bedeutung sind (Bird 1986; Costello *et al.* 2001; Bird 2006). Bei der semikonservativen Replikation der DNA kopiert die Methyltransferase DNMT1 das Methylierungsmuster vom parentalen Strang auf den neu entstehenden DNA-Strang und gibt das Methylierungsmuster so an die Tochterzellen weiter (Klose *et al.* 2006). Die Methylierung von DNA spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, dem genomischen Imprinting, der X-Chromosom-Inaktivierung, sowie der Suppression repetitiver Sequenzen im Genom (Bird 2006). So ist in den meisten Fällen die Aktivität von Retroelementen wie LINEs, SINEs oder HERVs aufgrund von DNA Methylierung supprimiert (Khodosevich *et al.* 2004; Lavie *et al.* 2005; Shen *et al.* 2006; Reiss *et al.* 2007; Stengel *et al.* 2010), d.h. die Methylierung dient möglicherweise als Abwehrmechanismus von Seiten des Wirtes gegen „Parasiten“ innerhalb des Genoms (Yoder *et al.* 1997; Romanish *et al.* 2010).

Es gibt mehrere Studien, die berichten, dass das Stilllegen von repetitiven Sequenzen im menschlichen Genom bzw. in allen Zellen eines Organismus nicht homogen erfolgt. So gibt es durchaus Unterschiede für HERV-K oder HERV-E Elemente, die einen unterschiedlichen Methylierungsstatus einzelner Loci in verschiedenen Zelltypen aufweisen (Lavie *et al.* 2005; Shen *et al.* 2006; Reiss *et al.* 2007). Auch die Promotorregion von ERVWE1, einem HERV-W Locus der für Syncytin-1 kodiert, ist in der menschlichen Plazenta hypomethyliert und in anderen Geweben methyliert (Matoušková *et al.* 2006).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Behandlung der HERV-K(HML-2) exprimierenden Teratokarzinom-Zelllinie Tera-1 mit dem demethylierenden Agens 5-Azacytidin die Expression des HERV-K(HML-2) Gag Proteins steigert (Gotzinger *et al.* 1996). Lavie *et al.* untersuchten die Rolle der DNA-Methylierung von CpG Dinukleotiden in Bezug auf die transkriptionelle Aktivität von HERV-K(HML-2) LTRs in der Teratokarzinom-Zelllinie Tera-1 und der Brustkrebs-Zelllinie T47D. Dabei konnte eine inverse Korrelation des Methylierungsstatus und der Expressionsaktivität verschiedener Proviren festgestellt werden (Lavie *et al.* 2005). Jedoch wurde auch gezeigt, dass der CpG Methylierungsstatus wahrscheinlich nicht allein die Aktivität der HERV-K (HML-2) 5'LTR reguliert.

Stengel *et al.* untersuchten die Aktivität von HERV-K(HML-2) Elementen in Melanomzellen (Stengel *et al.* 2010). In Zellen ohne HERV-K(HML-2) Expression fanden sie eine deutlich stärkere Methylierung der HERV-K(HML-2) 5'LTRs als in exprimierenden Zellen. Eine Behandlung dieser Zellen mit 5-Azacytidin resultierte ebenfalls in einer gesteigerten HERV-K Expression.

Ein ungewöhnlicher Methylierungsstatus sowohl von zellulären Genen als auch von Retroelementen wurde bereits mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. Abweichende epigenetische Modifikationen, wie z.B. eine globale Demethylierung von CpG Dinukleotiden oder die Hypermethylierung der Promotorregion von Tumor-Suppressorgenen könnten eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebs spielen (Feinberg 2007; Jones *et al.* 2007; Romanish *et al.* 2010).

Veränderungen der DNA-Methylierungsmuster wurden nicht nur in Tumoren, sondern auch in einigen vererbten Krankheiten gefunden (Bickmore *et al.* 2003). Mentale Dysfunktion ist eines der Hauptsymptome bei Erkrankungen aufgrund von epigenetischen Abweichungen (Shen *et al.* 2006). Die neuronale Fehlentwicklung des Rett-Syndroms wird zum Beispiel durch Mutationen in dem methyl-CpG-bindenden Protein MeCP2 hervorgerufen. Die charakteristischen klinischen Merkmale ähneln dabei partiell denen von autistischen und schizophrenen Patienten (Robertson *et al.* 2000; Shahbazian *et al.* 2002). Das Rett-Syndrom repräsentiert ein typisches Beispiel dafür, welche Folgen epigenetische Modifikationen wie DNA-Methylierung haben können, und deutet auf ein epigenetisches „Fine-Tuning“ hin, das essentiell bei der Entwicklung der gesunden Gehirnfunktion ist. Es ist erwiesen, dass Schizophrenie und bipolare Krankheiten auf einem Zusammenspiel von genetischen Faktoren, aber auch von Umweltfaktoren beruht (vgl. 1.2.8.3). Shen *et al.* postulieren, dass DNA Methylierung sowohl die unklare Vererbung als auch die Rolle der Umweltfaktoren während der Krankheitsentstehung erklären könnte (Shen *et al.* 2006).

1.2.6.2 Chromatin-Modifikationen

Die Erbinformation einer eukaryotischen Zelle liegt im Zellkern in Form des Chromatins vor, das aus DNA und DNA-bindenden Proteinen besteht. Dieser DNA-Protein Komplex gewährleistet einerseits die Stabilität gegen Nukleasen und hat aber auch andererseits Einfluss auf den Kondensation- und Verpackungsgrad der DNA und somit indirekt auch auf die Genexpression. Die grundlegende Einheit bildet ein sogenanntes Nucleosom, das etwa 147 Basenpaare superhelikale DNA enthält, die linksgängig ein „Core“-Histon in 1,65 Windungen umwickelt (Li *et al.* 2007). Das „Core“-Histon ist ein Oktamer und besteht aus jeweils zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4 (Szyf 2009). Das Linker-Histon H1 schließt das Nucleosom ab und stabilisiert die zu Nucleosomenfilamenten aneinander gereihten Nucleosomen. In weiteren Verpackungsschritten werden die DNA-Protein-Komplexe zu hoch geordneten Gebilden verpackt. Chromatin liegt im Kern in zwei unterschiedlichen Formen vor, dem stärker kondensierten Heterochromatin, das hauptsächlich transkriptionell inaktive DNA enthält und dem weniger stark kondensierten und transkriptionell aktiven Euchromatin.

So werden zwei Meter linearer DNA-Strang äußerst effizient in zehn μm verpackt, jedoch muss die DNA auch unter anderem für Transkription und Replikation zugänglich sein. Hierfür müssen die Nucleosomen neu positioniert werden. Ein wichtiger Mechanismus, der die Zugänglichkeit der DNA regelt, ist die Histon-Modifikation, die im Folgenden näher erläutert werden soll. Das Core-Histon Oktamer bildet eine kompakte Struktur mit einem N-terminalen Ende, das weniger strukturiert ist und hervorragt. Diese N-Termini werden posttranslational beispielsweise durch Acetylierung, Phosphorylierung oder Methylierung modifiziert und können direkt die Chromatinstruktur beeinflussen.

Die Acetylierung von Histon-Proteinen durch Histonacetyltransferasen (HATs) findet überwiegend an Lysinresten der Histone H3 und H4 statt. Dies führt zu einer Neutralisation der positiven Ladung und die Interaktion mit der negativ geladenen DNA wird aufgehoben. Diese Auflockerung der Chromatin-Struktur ermöglicht den Zugang für Transkriptionsfaktoren und hat somit eine tran-

skriptionelle Aktivierung lokaler Gene zur Folge (Li *et al.* 2007). Die Entfernung der Acetylgruppen von Histon-assoziierten Lysinresten erfolgt durch spezifische Histondeacetylasen (HDACs) und führt zu einer Kondensation des Chromatins (Heterochromatin). Diese steht in Zusammenhang mit der transkriptionellen Repression bestimmter Genabschnitte (Kouzarides 2007).

Die Regulation der HERV-Expression durch Modifizierung der Histone wurde bislang noch nicht untersucht, jedoch ist anzunehmen, dass sie ähnlich verläuft wie bei zellulären Genen oder bei Retroelementen der Maus (Li *et al.* 2007). Untersuchungen in embryonalen Stammzellen der Maus haben ergeben, dass H3K9me3 und H4K20me3 eine wichtige Rolle bei dem „Silencingprozess“ von ERVs während der Embryogenese spielen können (Martens *et al.* 2005; Mikkelsen *et al.* 2007; Maksakova *et al.* 2008).

1.2.7 Aktivierung reprimierter HERVs

Da „epigenetisches Silencing“ von Genen in der Regel reversibel ist, kann vermutet werden, dass auch ein Großteil der inaktivierten HERV Sequenzen im menschlichen Genom reaktiviert werden kann, sofern sie noch aktive Promotoren besitzen. Eine Aktivierung von HERVs kann sich lediglich in einer Erhöhung der Transkriptmenge bemerkbar machen, kann aber auch eine Expression der Env oder Gag Proteine zur Folge haben bzw. zur Bildung retroviraler Partikel führen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von HERVs durch bestimmte Faktoren von außen, wie z.B. UVB-Strahlung (Hohenadl *et al.* 1999), aber auch durch interne Signale erfolgen kann (Katsumata *et al.* 1999). So, wie spezifische Moleküle die Expression verschiedener Gene beeinflussen können, können auch HERVs stimuliert werden. Beispielsweise können HERVs durch Cytokine aktiviert werden, die z. B. in Autoimmunerkrankungen stets präsent sind. Während Interferon (INF)-Alpha die HERV-K Expression aktivieren kann, zeigt INF-Beta eine eher antiretrovirale Wirkung, da es *in vitro* die HIV Replikation inhibiert, aber auch die Antikörperlast gegen HERV-W und HERV-H Env als Konsequenz einer INF-Beta Therapie bei MS Patienten reduziert (Petersen *et al.* 2009; Christensen 2010). Einige HERVs besitzen in der Promotorregion ein „Glucocorticoid-responsive Element (GRE) und werden durch Steroidhormone aktiviert. So kann die HERV-K(HML-2) und (HML-4) Expression in menschlichen Brustkrebszellen durch Zugabe von Estradiol und Progesteron stimuliert werden (Ono *et al.* 1987; Seifarth *et al.* 1995). Zur Vervollständigung seien noch Phorbol-12 Myristat-13 Acetat (PMA) mit einem stimulierenden Einfluss auf die HERV-L Expression (Diem, unveröffentlicht) und Retinolsäure (Kannan *et al.* 1991) genannt, welche wahrscheinlich über die Aktivierung verschiedener zellulärer Transkriptionsfaktoren die HERV LTRs beeinflussen können. 5-Azacytidin, schließlich, bewirkt als Inhibitor von Methyltransferasen meist eine Erhöhung der HERV Expression (Gotzinger *et al.* 1996; Fuchs *et al.* 2011).

Außerdem können HERVs durch exogene Viren, wie zum Beispiel HIV induziert werden (Contreras-Galindo *et al.* 2006; 2007; Laderoute *et al.* 2007). Aber auch Vertreter der Herpesviren, wie Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1), humanes Herpesvirus 6 (HHV6) oder Varizella-Zoster Viren (VZV) können zu einer Aktivierung von HERV Elementen führen (Sutkowski *et al.* 2004; Hsiao *et al.* 2006; Nellaker *et al.* 2006; Ruprecht *et al.* 2006; Hsiao *et al.* 2009; Tai *et al.* 2009; Turcanova

et al. 2009). Sutkowski *et al.* z. B. demonstrierten eine Erhöhung der HERV-K *env* Expression nach einer Epstein-Barr Virus (EBV) Infektion (Sutkowski *et al.* 2001). Bemerkenswert ist das von Perron *et al.* postulierte Modell, wie eine Aktivierung von HERV-W durch Umweltfaktoren, wie exogene Viren (HHV-6, VZV, HHV1, EBV) oder Bakterien (*Chlamydia pneumoniae*) einen pathogenen Prozess bis hin zum Ausbruch von MS in genetisch prädisponierte Individuen bewirken könnte (Perron *et al.* 2010). Darüber hinaus wurde ein aktivierender Effekt des protozoischen Parasiten *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) nachgewiesen (Frank *et al.* 2006). In diesem Fall war eine erhöhte transkriptionelle Aktivität von Klasse I, II und III HERVs in einer infizierten Gehirnzelllinie zu verzeichnen.

1.2.8 HERVs und Erkrankungen des Menschen

Bis heute wurden zahlreiche Untersuchungen veröffentlicht, die HERVs mit einer Vielzahl von Erkrankungen des Menschen in Verbindung bringen (Portis 2002; Colmegna *et al.* 2006; Balada *et al.* 2009; Perron *et al.* 2009; Christensen 2010; Romanish *et al.* 2010; Antony 2011). Diese können in drei Haupt-Kategorien, Krebs- und Autoimmunerkrankungen sowie psychische Störungen eingeteilt werden. Zwar sind die meisten HERVs mutiert oder weisen Deletionen auf, jedoch sind viele noch transkriptionell aktiv und zeigen Expressionsunterschiede in verschiedenen Individuen. Generell können drei Formen genannt werden, die das pathogene Potential von HERVs erklären (Christensen 2010). Als genetisch mobile Elemente haben HERVs prinzipiell die Fähigkeit neu ins menschliche Genom zu integrieren und dadurch zelluläre Gene zu beeinflussen (Brady *et al.* 2009). Somit könnten HERVs durch Insertionsmutagenese an der Karzinogenese beteiligt sein. *De novo* Insertionen mit Krankheitsfolge konnten beim Menschen bislang jedoch nur für nicht-LTR Retrotransposons gezeigt werden (Babushok *et al.* 2007). Jedoch enthält das menschliche Genom bereits rund eine halbe Million retroviraler LTRs mit regulatorischen Sequenzen, die auch über einen längeren Genomabschnitt Einfluss auf benachbarte Gene ausüben können (Lamprecht *et al.* 2010) (vgl. 1.2.3). Zuletzt seien die Transkription und die Translation HERV kodierter Proteine genannt. So besitzen beispielsweise mehrere HERVs wie z. B. HERV-H, -W, -T, -FRD, -F, -R und HERV-K ORFs und können komplette retrovirale Proteine exprimieren (de Parseval *et al.* 2003).

1.2.8.1 HERVs und Krebs

Bislang ist die Rolle von HERVs bei der Karzinogenese nicht vollständig geklärt, obwohl mehrere Studien gute Argumente für eine krankheitsrelevante Beteiligung von HERVs in bösartigen Tumoren liefern (Bannert *et al.* 2004; Romanish *et al.* 2010). Viele Studien dokumentieren eine erhöhte transkriptionelle Aktivität von HERVs in Tumoren, wie z. B. Brustkrebs, Leukämien und Melanome (Depil *et al.* 2002; Buscher *et al.* 2005; Contreras-Galindo *et al.* 2008; Frank *et al.* 2008; Prusty *et al.* 2008). In den meisten Fällen konnte eine Assoziation mit der HERV-K(HML-2) Gruppe nachgewiesen werden (Romanish *et al.* 2010). Am besten untersucht ist die Rolle von HERV-K(HML-2) in Seminom-Patienten, da in diesen Tumoren HERV-K Proteine identifiziert werden konnten (Sauter *et al.* 1995). Löwer *et al.* entdeckten 1993 retrovirale Partikel in Teratokarzinom-Zelllinien, die

HERV-K(HML-2) Gag-Protein enthalten (Löwer *et al.* 1993). Die Bildung von HERV-kodierten Proteinen wurde ebenfalls in Brustkrebs- und Melanom-Zelllinien beobachtet (Muster *et al.* 2003; Golan *et al.* 2008). Darüber hinaus werden auch eine Reaktivierung und Hypomethylierung von HERVs mit chromosomaler Instabilität in Verbindung gebracht (Schulz *et al.* 2006; Romanish *et al.* 2010). Im Allgemeinen sind HERVs in Krebszellen eher demethyliert und weisen beispielsweise einen geringeren Methylierungsstatus im Kopf-Hals Karzinom auf als im gesunden Gewebe (Szpakowski *et al.* 2009).

1.2.8.2 HERVs und Autoimmunerkrankungen

Ein Zusammenhang von HERVs mit Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel Gelenkrheumatismus (RA), Psoriasis (Schuppenflechte) oder Multiple Sklerose (MS) wurde in zahlreichen Studien diskutiert (Clausen 2003; Colmegna *et al.* 2006; Antony 2011). Die Behauptungen stützen sich vor allem darauf, dass Antikörper gegen retrovirale HERV-Proteine und überdurchschnittlich viele HERV Transkripte in Patienten mit Autoimmunerkrankungen gefunden wurden (Colmegna *et al.* 2006). Zum Beispiel wurden im Blut und in der Gelenksflüssigkeit von RA Patienten erhöhte Transkriptmengen von HERV-K(HML-2) detektiert (Nakagawa *et al.* 1997). MS ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems mit unterschiedlichem, meist progressivem Verlauf (Christensen 2010; Antony 2011). Die Autoimmunreaktion richtet sich gegen die Nervenfasern isolierenden Myelinscheiden und führt zu einer Verlangsamung oder fehlenden Weiterleitung von Nervenimpulsen.

Die Ätiopathogenese von MS ist komplex und verbindet sehr wahrscheinlich genetische Prädisposition mit Umweltfaktoren (Mameli *et al.* 2009; Christensen 2010). Als hypothetische Faktoren werden Infektionen mit Viren (Moyes *et al.* 2007; Antony 2011), aber zum Beispiel auch Vitamin-D Mangel diskutiert (Mameli *et al.* 2009; Antony 2011). Als möglicherweise involvierte exogene Viren werden Herpesviren und Epstein-Barr Viren postuliert. 1991 wurden retrovirale Partikel in MS gefunden (Perron *et al.* 1991) und sechs Jahre später erstmals das MS-assoziierte Retrovirus (MSRV) beschrieben (Perron *et al.* 1997), das sich später als Mitglied der HERV-W Gruppe herausstellte. Seitdem gibt es zahlreiche Untersuchungen über eine Rolle von HERVs bei der Krankheitsentstehung (Antony 2011). Neben HERV-W werden noch weitere HERV-Gruppen wie HERV-H und ERV9 spezifisch mit MS in Verbindung gebracht (Christensen *et al.* 2000). Erhöhte Transkriptmengen von HERV-H, -K(HML-2) und HERV-W wurden in Gehirngewebe von MS Patienten gefunden (Johnston *et al.* 2001). Ebenso wurde kürzlich die Subgruppe HERV-Fc1 mit MS assoziiert (Nexø *et al.* 2011). Außerdem produzieren Lymphozyten von MS Patienten in Kultur RT-positive Retrovirus-ähnliche Partikel, die HERV-H und/oder HERV-W Sequenzen enthalten. Ähnliche Partikel wurden in vielen MS Patienten gefunden, aber nur selten in gesunden Kontrollen. Bemerkenswert ist, dass HERV-W/MSRV Sequenzen in CSF („Cerebro-Spinal-Fluid“) von MS Patienten möglicherweise als Marker für ein schnelles Voranschreiten der Erkrankung dienen könnten (Sotgiu *et al.* 2002).

1.2.8.3 HERVs und psychische Störungen

Schizophrenie und bipolare Störungen sind komplexe psychische Erkrankungen mit einer vielfältigen Symptomatik. Die Krankheitsursachen sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Jedoch sprechen Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien dafür, dass die Ätiopathogenesen sowohl eine deutliche genetische Komponente als auch Umweltfaktoren vereinen (Yolken *et al.* 1995; 2000; 2001; Christensen 2010).

Patienten mit bipolaren Störungen sind extremen Stimmungsschwankungen ausgesetzt (Leboyer *et al.* 2010). Schätzungen zufolge leiden etwa zwei Millionen Menschen in Deutschland an dieser Erkrankung. Kennzeichnend sind Phasen von Manie, die in unregelmäßigen Abständen von depressiven Stimmungslagen, aber auch von symptomfreien Intervallen abgelöst werden.

Rund 1% der Bevölkerung erkrankt weltweit an Schizophrenie, meistens im Alter zwischen 20 und 35 Jahren (Frangou 2008). Bei Schizophrenie kommt es zu Störungen der Wahrnehmung, des Denkens und der Affektivität. Grundsätzlich wird zwischen der Positiv- und der Negativsymptomatik unterschieden (Frangou *et al.* 2004). Die Positivsymptomatik bezeichnet Verhaltensmerkmale, die über das Verhalten von Gesunden hinausgehen, wie Wahn und Halluzinationen und findet besonders in der akuten Phase der Krankheit statt. Die Negativsymptomatik tritt besonders bei einem chronischen Krankheitsverlauf auf und zeichnet sich durch ein Verhalten aus, welches im Vergleich zu Gesunden Defizite aufweist, wie beispielsweise Motivationslosigkeit, sozialer Rückzug und sprachliche Verarmung. Zusätzlich leiden viele Patienten an Stimmungsschwankungen, Depressionen und Angstzuständen, die zu einer Suizid-Rate mit tödlichem Ausgang von bis zu 10% führen. Die Wahrscheinlichkeit an Schizophrenie zu erkranken liegt bei etwa 7%, wenn ein Elternteil schizophren ist (Mortensen *et al.* 1999). Zum heutigen Zeitpunkt sind 14 Kandidatengene bekannt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>), die mit Schizophrenie in Verbindung stehen. Demzufolge scheint Schizophrenie eine komplexe Erkrankung zu sein, die polygenetische Einflüsse und Risikofaktoren aus der Umwelt vereint. Die Komplexität dieser potentiellen Interaktionen erschweren die Erforschung krankheitsinduzierender Einflüsse. Jedoch haben epidemiologische Studien eine Reihe von Umweltfaktoren identifiziert, die eine Rolle bei der Krankheitsentstehung von prädisponierten Individuen spielen könnten. Yolken *et al.* korrelierten ein vermehrtes Auftreten der Erkrankung unter anderem mit Geburten im Frühjahr oder Winter, perinatale Infektionen, Aufwachsen mit Geschwistern oder in der Stadt (Yolken *et al.* 1995; Mortensen *et al.* 1999).

All diese Faktoren unterstützen die Idee, dass Infektionen bei der Entstehung eine Rolle spielen können (O'Reilly *et al.* 1996; Yolken 2004; Brown 2006; Fatemi *et al.* 2009). Diese können Entwicklungsstörungen, genetische Mutationen oder persistente Infektionen hervorrufen. Bislang wurde mehrfach die Hypothese aufgestellt, dass neben Herpesviren (Yolken 2004; Yolken *et al.* 2011) vor allem Retroviren für die Ätiopathogenese von Schizophrenie verantwortlich sein könnten (Crow 1984; Yolken *et al.* 2000; Yolken *et al.* 2001; Christensen 2010). Es gibt mehrere Gründe, warum Retroviren von besonderem Interesse sind. Aufgrund ihrer Fähigkeiten zum Neurotropismus, zur Integration ins Wirtsgenom und zur Latenz sind Retroviren potentielle infektiöse Erreger von Krankheiten des zentralen Nervensystems und können Langzeitveränderungen in der Gehirn-

funktion hervorrufen (Yolken *et al.* 2001). Zum Beispiel können Infektionen mit HIV oder HTLV eine Reihe von psychischen Symptomen wie Depression, Manie oder kognitive Schädigung zur Folge haben (Yolken *et al.* 2000; Albright *et al.* 2003; Huang *et al.* 2006). Das gilt in besonderem Maße auch für endogene Retroviren.

Zum Einen wurde auf Proteinebene die Expression von HERV-W Gag in *postmortem* Gehirn-Proben von Patienten mit Schizophrenie und bipolaren Erkrankungen untersucht und eine deutliche Reduktion in Patienten im Vergleich zu Gesunden gefunden (Weis *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu zeigte die Untersuchung von Blut-Proben (Serum) mit anti HERV-W Gag und Env Antikörpern ein erhöhtes Auftreten reaktiver Antigene in Proben von Schizophrenie-Patienten in Relation zu gesunden Kontrollpersonen (Perron *et al.* 2008). Außerdem wurden Antikörper gegen ERV9 Pol im Serum von Schizophrenen detektiert (Huang *et al.* 2006).

Zum Anderen wurden in verschiedenen Untersuchungen retrovirale RNA Sequenzen im Gehirn, in CSF oder im Plasma von Patienten mit Schizophrenie identifiziert, die auf eine erhöhte Aktivität der HERV Gruppen HERV-W, ERV9 und HERV-K(HML-2) hinweisen. So wurden vermehrt HERV-W *gag*, aber keine *env* Transkripte in Schizophreniepatienten festgestellt (Yao *et al.* 2008). Huang *et al.* fanden bei erkrankten Personen in 35% aller untersuchten Blutproben RNA des ERV9 *pol* Gens, jedoch in keiner Probe der gesunden Kontrollen (Huang *et al.* 2006).

Außerdem wurden erhöhte Transkriptmengen von HERV-W *pol*, sowie HERV-K(HML-2) *pol* im frontalen Kortex von *postmortem* Proben gefunden (Karlsson *et al.* 2001; Karlsson *et al.* 2004). Karlsson *et al.* fanden retrovirale Sequenzen in zehn von 35 CSF Proben (29%) schizophrener Patienten in der Akutphase mit Erstdiagnose. Davon konnten sieben der Gruppe HERV-W, zwei ERV9 und eine ERV-FRD zugeordnet werden. Zusätzlich wurde eine HERV-W Sequenz in einem chronisch Kranken gefunden. In keiner der 30 Kontrollproben wurde eine retrovirale Sequenz detektiert. In einer darauffolgenden Studie wurde im Plasma von Patienten mit Erstdiagnose HERV-W RNA identifiziert (Karlsson *et al.* 2004).

Um mit einem Experiment einen umfassenden Überblick über das Transkriptionsprofil einer Vielzahl von HERVs in einem bestimmten Gewebetyp zu bekommen, wurde von Seifarth *et al.* ein Retrovirus-spezifischer Microarray entwickelt (Seifarth *et al.* 2003; Seifarth *et al.* 2005). Frank *et al.* untersuchten mit Hilfe dieses Microarrays insgesamt 215 Gehirnproben (Frank *et al.* 2005) von Patienten mit Schizophrenie, bipolaren Erkrankungen und gesunden Kontrollen. Dabei wurde ein charakteristisches, gehirnspezifisches retrovirales Aktivitätsprofil detektiert, welches aus Mitgliedern der Klasse I Gruppen HERV-E, HERV-F und ERV9, sowie Mitgliedern der HERV-K Taxa (Klasse II HERVs) besteht. Zusätzlich wurden einige differentiell aktive HERV Elementen in allen Gehirnproben, unabhängig vom Krankheitsbild identifiziert. Diese spiegeln wahrscheinlich Unterschiede im genetischen und epigenetischen Hintergrund der getesteten Personen wieder. Dabei konnte eine Subgruppe von HERV-K(HML-2), repräsentiert durch den HERV-K10 Locus (c5_A) auf Chromosom 5q33.3, identifiziert werden, die in beiden Patientengruppen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant überrepräsentiert war (Frank *et al.* 2005). Dies lässt auf eine potentielle Verbindung mit der Krankheit schließen.

Um provirale Loci der differentiell exprimierten HERV-K(HML-2) Subgruppe zu identifizieren, wurden *gag* Transkripte von je fünf Gehirnproben von Patienten mit Schizophrenie, Bipolaren Störungen und einer Gesunden Kontrollgruppe untersucht (Flockerzi *et al.* 2008). Insgesamt wurden 16 im Gehirn aktive HERV-K(HML-2) Loci identifiziert. Zwei HERV-K(HML-2) Loci, c6_A und c7_A, wurden nur in einem Patienten mit Schizophrenie und c6_A zusätzlich in einem Patienten mit Bipolaren Störungen detektiert. Beide Loci besitzen ORFs für *gag* und *env* und könnten daher von besonderem Interesse für weitere Untersuchungen auf Proteinebene sein (Flockerzi *et al.* 2008). Insgesamt lässt der Nachweis von HERV Aktivitäten in Patientenproben vermuten, dass eine Aktivierung oder eine Hochregulierung einzelner HERV Sequenzen eine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen könnte.

In einer anderen Studie wurden mittels RT-PCR zwei im Gehirn aktive HERV Loci der Gruppen HERV-K(HML-2) und HERV-H identifiziert, die in den mit Schizophrenie assoziierten Genbereichen SCZD9 und SCZD4 liegen und diese möglicherweise beeinflussen (Nakamura *et al.* 2003). Desweiteren wurde von Huang *et al.* gezeigt, dass die Überexpression von HERV-W Env Proteine die Expression zellulärer Gene, wie BDNF („Brain derived neurotrophic factor“), NTRK2 („neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2“) oder DRD3 (Dopamin Rezeptor 3) in der menschlichen Glioblastom-Zelllinie U-251MG erhöht (Huang *et al.* 2010). Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Aktivierung von HERVs durch infektiöse Agenzien wie Viren, diverse Umweltfaktoren oder genetische Variationen zu einer Expression von HERV-W Env Proteinen führt und diese wiederum die Promotoraktivität von Schizophrenie-assoziierten Genen stimulieren können (Huang *et al.* 2010). Das hätte zur Folge, dass die Expression von BDNF, NTRK2 und DRD3 erhöht und somit die Ätiopathogenese der Krankheit begünstigt wird.

1.2.9 Antipsychotische Medikamente

Schizophrenie, eine der schwerwiegendsten psychischen Erkrankungen weltweit, ist bis heute nicht heilbar. Jedoch kann eine symptomatische Behandlung mit Hilfe von Medikamenten und begleitender Psycho- und Soziotherapie gute Resultate erzielen. Während sich die Psychose bei rund einem Drittel der Patienten zurückbildet, kann es beim Rest erneut zu akuten Schüben oder einem chronischen Verlauf mit schwereren psychosozialen Einschränkungen kommen. Im Vordergrund einer wirksamen Therapie steht oft eine medikamentöse Behandlung mit Neuroleptika. Allerdings sind mitunter belastende Nebenwirkungen und Residualsymptome nicht ausgeschlossen. Neuroleptika, auch Antipsychotika genannt sind eine chemisch heterogene Gruppe von Medikamenten, die antipsychotische Wirkung aufweisen und ein unterschiedliches Nebenwirkungsprofil zeigen. Generell werden Antipsychotika zur Behandlung psychischer Erkrankungen wie Schizophrenie, Manie, Verhaltensstörungen und Dämpfung von krankhaften Unruhezuständen bei Psychosen eingesetzt. Eine Einteilung kann anhand der Zugehörigkeit zu den klassischen (typischen) oder atypischen Antipsychotika erfolgen (Worrel *et al.* 2000). Während typische Neuroleptika weitgehend auf die Positivsymptomatik der Schizophrenie wirken, greifen atypische auch in die Negativsymptomatik ein und verursachen oft weniger extrapyramidal-motorische Nebenwirkungen. Im Allgemeinen dämpfen Neuroleptika psychomotorische Erregungszustände und verringern

affektive Spannungen, sowie Angst- und Trugwahrnehmungen. Jedoch ist eine Neuroleptikatherapie nicht unproblematisch, da unterschiedliche Nebenwirkungen wie Dyskinesien auftreten können. Diese parkinsonähnlichen Symptome mit unkontrollierten und sich wiederholenden Bewegungen können irreversibel sein. Die Wirkungsweisen dieser Medikamente sind noch nicht endgültig geklärt, jedoch werden mehrere Wirkmechanismen in Zusammenhang mit Rezeptorblockaden (unter anderem Dopamin) diskutiert.

1.2.9.1 Haloperidol - ein typisches Neuroleptikum

Haloperidol ist ein typisches, hochpotentes Neuroleptikum aus der Gruppe der Butyrophenone und wird unter anderem wegen seiner sedierenden Wirkung zur symptomatischen Behandlung von Wahn und Halluzinationen eingesetzt (Abb. 6 A). Die Wirkung von Haloperidol begründet sich wahrscheinlich überwiegend in der Blockade von Dopamin-Rezeptoren (D1-D3), allen voran D2 (Leysen *et al.* 1994). Studien in Ratten und Mäusen haben gezeigt, dass Haloperidol die Expression verschiedener Gene verändern kann (Fasulo *et al.* 2003; Narayan *et al.* 2007; Pillai *et al.* 2008). So zeigten beispielsweise Chong *et al.*, dass das Gen Synapsin II, welches mit Schizophrenie in Zusammenhang stehen soll, nach einer Haloperidol-Behandlung signifikant hochreguliert wurde (Chong *et al.* 2002). Haloperidol-bedingte Effekte auf DNA-Methylierung oder Chromatin-Modifikationen in Nagern wurden ebenfalls berichtet (Li *et al.* 2004; Shimabukuro *et al.* 2006). Als Vertreter von hochpotenten Neuroleptika bedingt Haloperidol unerwünschte, teils schwerwiegende Nebenwirkungen, wie Bewegungsstörungen oder Parkinsonoid (Rosebush *et al.* 1999). In einer kürzlich veröffentlichten Studie fanden Tost *et al.* heraus, dass sich bei jungen, gesunden Männern nach einer einzigen Gabe von Haloperidol innerhalb von Stunden die graue Gehirns substanz in einer für die Motorik wichtigen Gehirnregion (Putamen) reduzierte (Tost *et al.* 2010). Bei dieser plastischen Veränderung soll Dopamin eine wesentliche Rolle spielen. Der Volumenverlust des Gehirns war reversibel und normalisierte sich innerhalb von 24 h. Desweiteren konnte ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß an Reduktion des Gehirnvolumens und der Schwere der Bewegungsstörungen gezeigt werden.

1.2.9.2 Risperidon und Clozapin - zwei atypische Neuroleptika

Risperidon ist ein atypisches, hochpotentes Neuroleptikum und gehört zu den Benzisoxazol-Derivaten (Abb. 6B). In den letzten Jahren wurden vermehrt risperidonhaltige Arzneimittel bei Schizophrenie verordnet (Arzneimittelverordnung 2010). Seine Wirkung beruht auf einer ausgeprägten antagonistischen Wirkung an einem breiten Spektrum von Rezeptoren (Benkert 2005). Es besitzt unter anderem eine hohe Affinität zu Serotonin-(5HT_{2A})-, sowie eine mittlere Affinität zu Dopamin (D2) - und Histamin (H1)-Rezeptoren (Leysen *et al.* 1994). Somit kommt es zur Besserung sowohl der Positiv als auch der Negativsymptomatik. Im Allgemeinen ist wenig über Risperidon in Bezug auf Veränderungen der Genexpression oder epigenetischen Modifikationen bekannt. Allerdings wurde Risperidon von Li *et al.* mit einer Phosphorylierung sowie einer Acetylierung von Histon H3 in der Maus in Verbindung gebracht (Li *et al.* 2004).

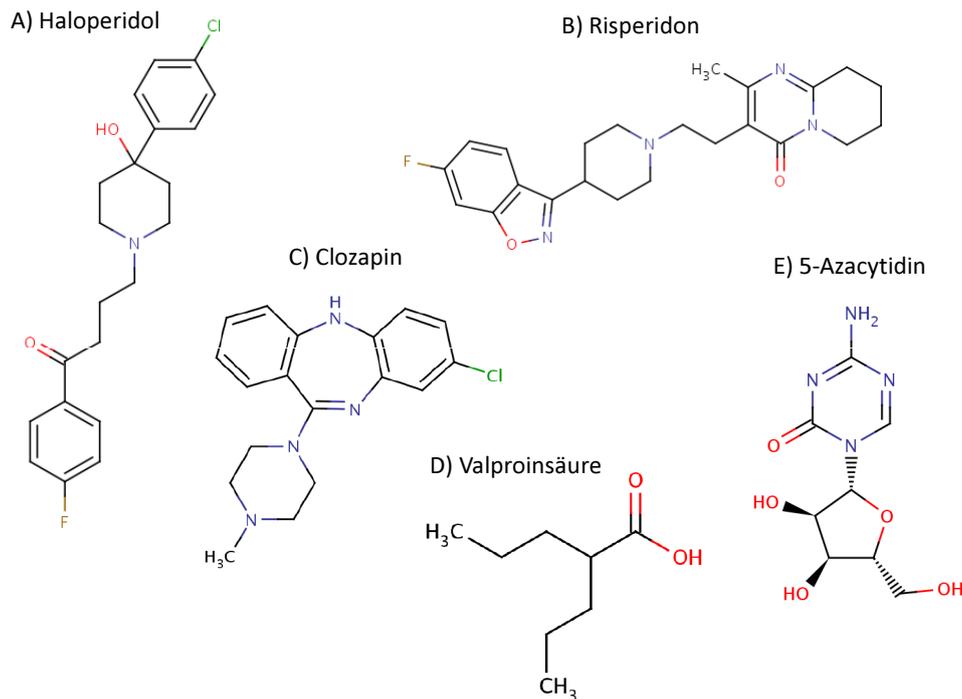


Abb. 6: Chemische Strukturformeln der Medikamente Haloperidol (A), Risperidon (B), Clozapin (C), VPA (D) und 5-Azacytidin (E). (Quelle: //www.drugbank.ca/drugs).

Ein weiterer Vertreter der atypischen Neuroleptika ist Clozapin, ein mittelpotentes Medikament und trizyklisches Dibenzodiazepin-Derivat (Abb. 6C). Eine Medikation ist bei akuten und chronischen Schizophrenien, psychotischen Episoden im Rahmen eines Parkinsonsyndroms und akuten Manien angezeigt, da Clozapin unter anderem sedativ wirkt. Wie Risperidon ist auch Clozapin ein potenter Antagonist verschiedener Rezeptoren, mit einer hohen Affinität vor allem zu muskarinischen Acetylcholin (M1)-, Histamin (H1) und Serotonin (5HT_{2A})-Rezeptoren (Leysen *et al.* 1994; Schotte *et al.* 1996). Bis heute wurde eine Reihe von Untersuchungen mit Clozapin veröffentlicht. Mit am interessantesten ist eine Studie, die belegt, dass Clozapin antivirale Eigenschaften aufweist und die Replikation von HIV-1 inhibiert (Jones-Brando *et al.* 1997). Mehrfach wurde von einem Einfluss auf die Expression verschiedener Gene berichtet (Takahashi *et al.* 2004; MacDonald *et al.* 2005; O'Connor *et al.* 2007). Eine kortikale GABA-Dysfunktion ist ein Kennzeichen von Schizophrenie und Bipolaren Erkrankungen und konnte mit einer Hypermethylierung der GABA-Genpromotoren wie zum Beispiel *reelin* und *GAD67* in Verbindung gebracht werden (Dong *et al.* 2008). Um einen möglichen Einfluss von Clozapin auf die DNA Demethylase Aktivität zu testen, wurden das Verhältnis von 5-Methyl-Cytosin zu nicht methylierten Cytosinen im *reelin*- und *GAD67*-Promotor des präfrontalen Kortex und Striatum der Maus gemessen. Ein Teil der Mäuse wurde vorher sieben Tage mit L-Methionin behandelt, um eine Hypermethylierung des *reelin*-Promotors zu bewirken. Diese Hypermethylierung konnte durch dreitägige Behandlung mit Clozapin alleine oder besonders in Kombination mit Valproinsäure deutlich reduziert werden. Dies weist darauf hin, dass die gleichzeitige Gabe von VPA und Clozapin unter anderem eine *reelin*- und *GAD67*-Promotordemethylierung durch die Aktivierung einer DNA-Demethylase induziert. Dies wiederum könnte erklären, warum diese Kombinationstherapie psychische Symptome bessert (Dong *et al.* 2008).

1.2.9.3 Valproinsäure

Valproinsäure (VPA) ist eine verzweigte Carbon-Fettsäure und wird formal den Antiepileptika zugeordnet (Camphausen *et al.* 2005) (Abb. 6D). Aufgrund der krampflösenden Wirkung wird VPA häufig bei Epileptikern eingesetzt, findet aber auch Anwendung bei Patienten mit Schizophrenien, Bipolaren Störungen oder Manien (Citrome 2003; Schwarz *et al.* 2008). In Kombination mit Neuroleptika konnte das Krankheitsbild von Schizophrenen mit aggressivem Verhalten verbessert werden (Schwarz *et al.* 2008; Szyf 2009). Wie bereits erwähnt, werden die beiden Gene *reelin* und *GAD67* der GABA-Neurotransmission aufgrund ihrer Hypermethylierung im Promotorbereich mit der Pathogenese von Schizophrenie in Verbindung gebracht. Deren Herunterregulation könnte für die komplexen Symptome verantwortlich sein (Guidotti *et al.* 2010). Es wurde gezeigt, dass VPA vor allem in Kombination mit Clozapin die Expression von *reelin* induzieren kann, und dies wiederum könnte die Krankheit positiv beeinflussen (Szyf 2009). Ein besonderes Merkmal von VPA ist seine inhibierende Eigenschaft auf die Histon-Deacetylase (HDAC), ein Enzym, das bei der posttranslationalen Chromatin-Modifikation eine wichtige Rolle spielt und eine Repression der Genexpression bedingt (Camphausen *et al.* 2005) (Abb 7). VPA bewirkt eine Hyperacetylierung der N-terminalen Reste von H3 und H4 Histonen *in vitro* und *in vivo* (Gottlicher *et al.* 2001; Das *et al.* 2007). Im Gegensatz zu den meisten anderen HDAC Inhibitoren kann VPA die Blut-Hirn Schranke überwinden (Snead *et al.* 1985; Camphausen *et al.* 2005). Eine Vielzahl von Genen, die bei der Zellzykluskontrolle wichtig sind, wird ebenfalls durch diesen Mechanismus reguliert (Das *et al.* 2007). So induziert VPA nachweislich p21 und wirkt somit auch indirekt auf den Zellzyklus. Außerdem kann VPA neuronale Zellen beeinflussen (Dragunow *et al.* 2006), die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* steigern (Camphausen *et al.* 2005) und wie andere Histon-Deacetylase-Inhibitoren aufgrund des möglichen Einflusses auf das „Chromatin-Remodelling“, Aktivierung von Tumor-Repressorgenen oder auf die Differenzierung und Apoptose als Antikrebsmittel eingesetzt werden (Liu *et al.* 2006; Monneret 2007). Von besonderer Bedeutung ist seine Fähigkeit, eine latente HIV Expression zu induzieren (Jennings *et al.* 1999).

1.2.9.4 5-Azacytidin

Das Cytidin-Analogon 5-Azacytidin (Abb. 6E) wurde erstmals 1964 von Sorm *et al.* synthetisiert (Sorm *et al.* 1964) und ist ein äußerst wirksamer Inhibitor der DNA Methylierung (Abb 7). Nach erfolgter Einlagerung in die DNA sich replizierender Zellen kommt es zu einer Interaktion mit allen drei DNA Methyltransferasen (DNMT) (Santi *et al.* 1984; Christman 2002). Die irreversible kovalente Bindung zwischen dem Enzym (Cysteinrest) und 5-Azacytidin (C6 Atom) führt zu einer passiven Inhibierung der DNA Methylierung bei darauffolgenden DNA Synthesen (Christman 2002). 5-Azacytidin wird unter anderem auch als Medikament für die epigenetische Krebstherapie eingesetzt. Bisher wurde des Öfteren ein verändertes Methylierungsmuster in Tumorzellen beobachtet (Robertson 2005). Interessanterweise wurde auch mehrfach über einen Einfluss von 5-Azacytidin auf die HERV-K Expression berichtet (Göttinger *et al.* 1996; Stengel *et al.* 2010; Fuchs *et al.* 2011). So konnten Göttinger *et al.* zeigen, dass eine mittels 5-Azacytidin induzierte Demethylierung die HERV-K Gag Expression in Tera-1 Zellen erhöht. Ebenso konnte eine Behandlung mit dem demethylierenden Agens die Expression von HERV-K in Melanom-Zelllinien ohne HERV-K Expression stimulieren (Stengel *et al.* 2010). Generell besteht eine inverse Korre-

lation zwischen HERV-K Transkription und dem CpG Methylierungsgrad verschiedener Promotoren in Melanom-Zelllinien (Lavie *et al.* 2005; Stengel *et al.* 2010).

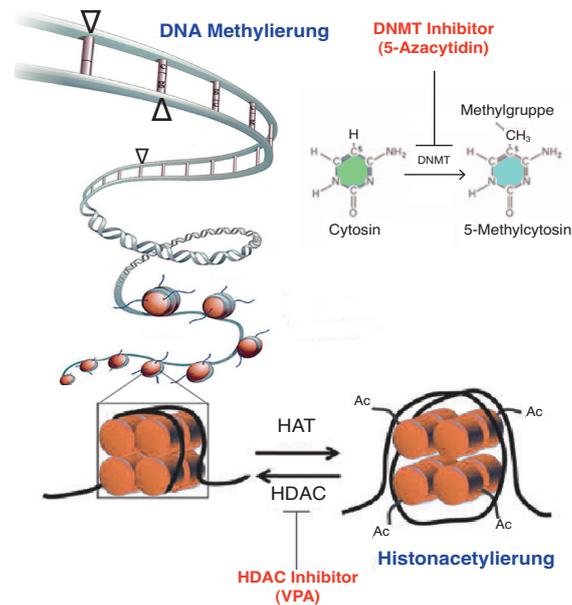


Abb. 7: Epigenetische Einflüsse von VPA und 5-Azacytidin. Durch Inhibierung der DNA Methyltransferase (DNMT) kann 5-Azacytidin auf die DNA-Methylierung einwirken. Histon-deacetylase Inhibitoren (HDACi), wie VPA verhindern die Deacetylierung des Chromatins [Graphik verändert nach Narayan *et al.* 2010 und Qiu 2006].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Reihe von antipsychotischen Medikamenten über epigenetische Mechanismen die Expression von zellulären Genen verändern können, und somit auch, wie für 5-Azacytidin bereits gezeigt, Einfluss auf die Expression endogener retroviraler Elemente nehmen können.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Untersuchungen mit dem Retrovirus-spezifischen Microarray haben gezeigt, dass eine Subgruppe von HERV-K(HML-2), HERV-K10, in *postmortem* Gehirnproben von Patienten mit Schizophrenie und Bipolaren Störungen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe signifikant überrepräsentiert ist (Frank *et al.* 2005). Dies deutet auf eine mögliche Assoziation von HERV-K10 mit der Erkrankung hin. So könnte zum Beispiel eine Aktivierung oder auch eine Hochregulierung von verschiedenen HERVs eine Rolle bei der Ätiopathogenese spielen. Da jedoch die Mehrheit aller Patienten mit psychischen Störungen medikamentös behandelt wird und manche dieser Medikamente über epigenetische Mechanismen Einfluss auf zelluläre Gene ausüben können, sind auch Auswirkungen der Medikation auf die Expression von HERVs nicht auszuschließen.

Deshalb soll im Folgenden untersucht werden, ob antipsychotische Medikamente die Aktivität von HERVs beeinflussen können. Um einen umfassenden Überblick zu bekommen, soll dies anhand eines geeigneten Zellkulturmodells und eines Retrovirus-spezifischen Microarrays unter-

sucht werden. Außerdem soll festgestellt werden, ob die Überrepräsentation von HERV-K(HML-2) in Patienten mit Schizophrenie möglicherweise auf einen Effekt der Medikation zurückzuführen ist oder ob diese vielmehr mit der Erkrankung als solches in Zusammenhang steht.

Anhand der von Frank *et al.* ermittelten Microarray-Daten wurden in einer weiterführenden Studie 15 der oben genannten *postmortem* Gehirnproben verwendet, um transkriptionell aktive HERV-K(HML-2) Loci zu identifizieren (Flockerzi *et al.* 2008). Insgesamt wurden 16 aktive Loci im menschlichen Gehirn gefunden, die in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert wurden. Transkripte von zwei Loci wurden nur in einem Patienten mit Schizophrenie ermittelt. Dies wirft die Frage auf, warum manche HERV-K(HML-2) Loci in einigen Patienten transkriptionell aktiv sind und wie solche Loci reguliert werden. Deshalb soll der Methylierungsstatus einer repräsentativen Auswahl von LTRs differentiell exprimierter HERV-K(HML-2) Loci in *postmortem* Gehirnproben analysiert werden. Es soll untersucht werden, ob Unterschiede im Methylierungsmuster ausgewählter Loci in Gehirnproben einer gesunden Kontrolle im Vergleich zu einem Schizophreniepatienten existieren. Als Vergleich wird die Teratokarzinom-Zelllinien Tera-1 verwendet, da in diesen Zellen HERV-K(HML-2) hoch exprimiert wird.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, zu prüfen inwieweit Neuroleptika die Aktivität einzelner HERV-K(HML-2) Loci in einer geeigneten Modellzelllinie beeinflussen können. Dies soll anhand des Methylierungs- und Chromatin-Status ausgewählter HERV-K(HML-2) Loci experimentell erfasst werden.

Zuletzt gilt es zu prüfen, wie neu ins Genom eingebrachte HERV-Sequenzen im Vergleich zu bereits seit Millionen Jahren stabil im Genom integrierten HERV-Elementen reguliert werden. Hierfür soll die HERV-LTR gesteuerte Expression des Reportergens *egfp* in acht Zellklonen über einen Zeitraum von sechs Monaten verfolgt und die HERV Promotoraktivität bestimmt werden.

Die geplanten Experimente sollen dazu beitragen, die in vorausgegangenen Studien erhaltenen Daten zu interpretieren. Von besonderem Interesse ist der bisher völlig unbekannte Einfluss von antipsychotischen Medikamenten auf die HERV-Expression, sowie deren Auswirkungen auf epigenetischer Ebene. Die Ergebnisse sollen helfen, die Regulation von HERVs im Gehirn des Menschen besser zu verstehen. Letztlich soll dazu beigetragen werden, krankheitsrelevante Unterschiede im HERV Transkriptionsprofil von denen, die möglicherweise auf medikamentöse Einflüsse zurückzuführen sind, zu differenzieren. Dies kann weiter dazu führen, die potentielle Rolle der HERV-Aktivität in der Ätiopathogenese psychischer Störungen näher zu beleuchten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Name	Hersteller
Expand High Fidelity Enzyme Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
EZ DNA Methylation-Gold™ Kit	ZYMO Research, Freiburg
GoTaq® PCR System	Promega, Mannheim
Imprint™ Chromatin Immunoprecipitation Kit	Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, USA
KAPA2G Robust PCR Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
LC480 DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
MethylDetector™ Bisulfite Modification Kit	Active Motif Chromeon GmbH, Tegernheim
Nucleo Spin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Nucleo Spin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
pGEM®-T Vector Systems	Promega, Mannheim
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RQ1 DNase Kit	Promega, Mannheim
SuperScript™ II First-Strand Synthesis	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Oligonukleotide

2.1.2.1 „Mixed oligonucleotide primers“ (MOP) für die Multiplex-PCR

Alle Cy3-modifizierte MOP-Oligonukleotide müssen aufgrund von Stabilitätsproblemen in 10 mM PO_4^- Puffer gelagert werden. 5'-aminomodifizierte Oligonukleotide (45mere; „Capture Probes“) werden grundsätzlich in 3xSSC auf eine Konzentration von 100 μM eingestellt. Zum Befüllen einer 384-Well Platte werden jeweils 34 μl eines jeden 45mers mit 12 μl 20xSSC gemischt und je 50 μl dieser Mischung (Endkonzentration: 42,5 pmol/ μl) in ein Well pipettiert. Die Lokalisator-Oligonukleotid-Lösung besteht aus einer Mischung von 45 μl 20xSSC, 60 μl Cy3-Oligonukleotid

(20mer) und 195 μ l MilliQ Wasser. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion, Martinsried bezogen. Zur Amplifizierung der Altweltaffen-spezifischen ERVs wurden ebenfalls die humanen MOP-Cocktails (Tab. 1) verwendet.

Tab. 1: Humane “Mixed oligonucleotide primers” (MOPs) für die Multiplex-PCR

HERV Gruppe	Quelle	Orientierung	5'-Modifikation	Oligonukleotid-Sequenz	Degeneration
Typ ABD Primer-Cocktail (MOP-A)					
HML-1	U35102	forward	-	<u>GGAGAAAA</u> AGTACTGCCACAAGGC ^A	-
		reverse	Cy3	GGAGAA <u>CAGA</u> AATATCATCCATGTA	-
HML-2	M14123	forward	-	<u>GGAGAAAA</u> AGTGTTACCTCAGGGA	-
		reverse	Cy3	GGAGAATAAAATATCATCAATATA	-
HML-3	U35236	forward	-	<u>GGAGAAAA</u> AGTGTTGTACAGGGC	-
		reverse	Cy3	GGAGAA <u>GTATAT</u> ATCATCCATATA	-
HML-4	AF020092	forward	-	<u>GGAGAAAA</u> AGTCCTACCACAAGGC	-
		reverse	Cy3	GGAGAA <u>GAGGAG</u> ATCATCCATGTA	-
HML-5	U35161	forward	-	<u>GGAGAA</u> GTGCTTCCTGAAGGGATG	-
		reverse	Cy3	GGAGAATAAAATATCATCCATAAA	-
HML-6	U60269	forward	-	<u>GGAGAA</u> AGAGTTTTACCCCAAGGC	-
		reverse	Cy3	GGAGAAAAGAATATCATCCATATA	-
HML-7	AP003171	forward	-	<u>GGAGAA</u> GTTTTTACCTCAAGGAATG	-
		reverse	Cy3	GGAGAA <u>CAGTAT</u> ATCATCCATATA	-
HML-8	AL513321	forward	-	<u>GGAGAA</u> GTACTTCCTCAGGGAATG	-
		reverse	Cy3	GGAGAATAAAATATCATCAATATA	-
HML-9	AC025569	forward	-	<u>GGAGAA</u> GTCTACCCCAAGAGATG	-
		reverse	Cy3	GGAGAA <u>CAAA</u> AATATCATCCACATA	-
HML-10	U07856	forward	-	<u>GGAGAAA</u> AGTTTTGCCCCAGGGT	-
		reverse	Cy3	GGAGAA <u>TCTACT</u> TTTTGCTGCACA	-

^{A)}Unterstrichene 5'-Nukleotid-Sequenzen, so genannte „Clamp“-Sequenzen fungieren als Abstandshalter, und sorgen für eine sterische Hinderung der Primerbindung.

HERV Gruppe	Quelle	Orientierung	5'-Modifikation	Oligonukleotid-Sequenz	Degeneration
MMTV	M15122	forward	-	<u>GGAGA</u> ATAGGTTTTGCCCCAGGGT ^A	-
		reverse	Cy3	<u>GGAGAA</u> AAGAGGATGTCATCCATGTA	-
Type C Primer-Cocktail (MOP-C)					
Type C	(Shih <i>et al.</i> 1989)	forward	-	<u>GGAGA</u> ATGGAAAGTGYTRCCMCARGG	8
		reverse	Cy3	<u>GGAGAA</u> CAGCAGSAKGTCATCCAYGTA	8
HERV-I	M92067	forward	-	<u>GGAGA</u> ATKKACMSKMYTRCYCARGGG	1072
HERV-L	G895836	reverse	Cy3	<u>GGAGAA</u> AKMWKRYCATCMAYRTAMTG	8192
HERV-H	AF026252	forward	-	<u>GGAGA</u> AGTACTGCTGCAAAGCTTCA	-
		reverse	Cy3	<u>GGAGAA</u> CACACGATCGGCAGGGAGA	-
RGH2	D11078	forward	-	<u>GGAGA</u> AGTAATGCTGCAAGTTTC	-
		reverse	Cy3	<u>GGAGAA</u> GAAGAACATCACCAATATA	-
HERV-F	AC000378 Z94277	forward	-	<u>GGAGA</u> ARTMCTMCMYCARGGGTT	64
		reverse	Cy3	<u>GGAGAA</u> AAGGAGGTCATCTAGATAT	-

^{A)}Unterstrichene 5'-Nukleotid-Sequenzen, so genannte „Clamp“-Sequenzen fungieren als Abstandshalter, und sorgen für eine sterische Hinderung der Primerbindung.

HERV Gruppe	Quelle	Orientierung	5'-Modifikation	Oligonukleotid-Sequenz	Degeneration
„Housekeeping“ Gen Primer-Cocktail (MOP-HKG)					
β-Actin	E01094	forward	-	ATGATGATATCGCCGCGCTCG	-
		reverse	Cy3	CATGTCGTCCCAGTTGGTGACG	-
Ubiquitin	U49869	forward	-	GTTGGCTTTCTTGGGTGAGCTTG	-
		reverse	Cy3	AAGAGTACGGCCATCTTCCAGCTG	-
RPL19	NM_ 000981	forward	-	CCCGAATGCCAGAGAAGG	-
		reverse	Cy3	CTTCCTTGGTCTTAGACCTG	-
GAPDH	NM_ 002046.1	forward	-	AGTCAACGGATTTGGTCGTATTGG	-
		reverse	Cy3	ACGTA CT CAGCGCCAGCATCG	-
HPRT	NM_ 000194	forward	-	GTGATGATGAACCAGGTTATGACCT	-
		reverse	Cy3	CTACAGTCATAGGAATGGATCTATC	-

2.1.2.2 Oligonukleotide des Retrovirus-spezifischen Microarray („Capture Probes“)

Die Sequenzen der „Capture Probes“ sind im Anhang Tab. 10 abgebildet.

Tab. 2: Klassifizierung, und Lokalisation der Retrovirus-spezifischen „Capture Probes“ auf dem Microarray^{a)}

Retrovirus-Klasse	Gruppe	RepBase* Name ^{b)}	Genbank-ID	Lokalisierung auf dem Microarray	
Klasse I Retroviren (Gamma-Retrovirus- verwandt)	HERV-I	HERV-I	HERV-I (M92067)	E9	
		HERVIP10F	HERV-IP-T47D (U27241)	E10	
			Seq65 (AP000842)	E11	
	HERV-S	HERV18		HERV-S (Z84470)	E7
				Seq77 (AC005040)	E8
	HERV-T	HERVS71		S71pCRTK6 (U12969)	F1
				S71pCRTK1 (U12970)	F2
	HERV-FRD	MER50I		ERV-FRD (U27240)	F3
				HS49C23 (Z93019)	F4
				HERV-Z (Z69907)	F5
	HERV-R	HERV-R		ERV3 (AC004609)	F6
	HERV-E	HERV-E		E4-1 (M10976)	F7
				Seq32 (AC010636)	F8
	HERV-H	HERV-H		RGH2 (D11078)	F9
				HERV-H (AF026252)	F10
				Seq66 (AL359740)	F11
	HERV-F	HERVH48I		HERV-F2 (AC002416)	G9
		HERV-FH19I		HERV-F (Z94277)	G10
		HERV-FH21		HERV-Fb (AC00378)	G11
	HERV-W	HERV17		HERV-W (AF009668)	G3
ERV9		HERV9	Seq64 (AC005253)	G4	
		HERV17	Seq63 (AC018926)	G5	
			ERV9 (X57147)	G6	
		HERV9	Seq59 (AC006397)	G7	
		HERFFH19I	Seq60 (AL135749)	G8	

Retrovirus-Klasse	Gruppe	RepBase* Name ^{b)}	Genbank-ID	Lokalisierung auf dem Microarray	
Klasse II Retroviren (β-Retrovirus- verwandt)	HML-1	HERVK14I	HML-1 (U35102)	A8	
			Seq29 (S77579)	A9	
	HML-2	HERVK	HERV-K10 (M14123)		
			HERV-K2.HOM (U87592)	B1	
			HERV-K(HP1) (U87588)	B2	
			HERV-K(D1.2) (U87595)	B3	
			HERV-K(D1.2) (U87595)	B4	
			HERV-K10 (U39937)	B5	
	HML-3	HERVK9I	Seq26 (AC073115)	B6	
			Seq34 (AL592449)	B7	
			HML-3 (U35236)	B8	
			HERV1 (S66676)	B9	
	HML-4	HERVK13I	Seq43 (AF047595)	B10	
			Seq10 (AF047591)	B11	
	HML-5	HERVK22I	HERV-K-T47D (AF020092)	B12	
	HML-6	HERVK3I	HML-5 (U35161)	A10	
HML-6 (U60269)			A11		
		Seq38 (AC010328)	A12		
		Seq56 (AC018558)	C12		
HML-7	HERVK11DI	NM WV7 (AP003171)	C11		
HML-8	HERVK11I	NM WV3 (AL513321)	C10		
HML-9	-	NM WV9 (AC025569)	C8		
HML-10	HERVKC4	HERV-KC4 (U07856)	C9		
		Seq31 (AL162734)	E2		
Klasse III Retroviren (Spumavirus- verwandt)	HERV-L	HERV-L =MLT2	HERV-L (G895836)	E3	
			Seq39 (AC091914)	E4	
			Seq45 (AC006971)	E5	
			Seq51 (AL353741)	E6	
			Seq58 (AL590730)		

Retrovirus-Klasse	Gruppe	RepBase* Name ^{b)}	Genbank-ID	Lokalisierung auf dem Microarray
Humane „Housekeeping“ Gene			Ubiquitin (U49869)	A2
			GAPD (NM_002046.1)	A3
			RPL19 (NM_000981)	A4
			β -Actin (E01094)	A5
			HPRT (NM_000194)	A6
Altweltaffen- spezifische Retroviren	MacERV- MacERVK		MacERV1	H7
			MacERV2	H8
			MacERV3	H9
			MacERV4	H10
			MacERV5	H11
			MacERV6	C3
			MacERVK1	C1
MacERVK2	C2			
Lokalisierungs- Punkte^a			Cy3 -markierte Oligonukleotide	A1, A7, D1, E1, E12, H1

^{a)}vollständige Oligonukleotidsequenz ist im Anhang Tab. 11 aufgeführt, ^{b)}RepBase, Genetic Information Research Institute, Sunnyvale, California (<http://www.girinst.org>) (Jurka *et al.* 2005).

2.1.2.3 Kontroll-Oligonukleotide zur Qualitätssicherung des Retrovirus-spezifischen Microarrays

Kontrolle	Name	Genbank-ID	Oligomer	Lokalisierung auf dem Microarray
Kontrolle 1	antisense-MMTV	M15122 ^a	42-mer	D2
Kontrolle 2	antisense-HML-1	U35102 ^a	36-mer	A6
Kontrolle 3	antisense-HML-5	U35161 ^a	42-mer	B12
Kontrolle 4	antisense-2HOM	AF298587 ^a	36-mer	E5
Kontrolle 5	antisense-HERV-W	AF009668 ^a	42-mer	G3

^{a)} vollständige Sequenzen sind dem Anhang Tab. 12 zu entnehmen

2.1.2.4 Primer-Sequenzen für die Kontroll-PCR nach dem DNase Verdau

Primer		Oligonukleotid-Sequenz (5'→3')	Genbank-ID	Beschreibung	Tm
HERV-L	For	ATCTGGGTGGGCACCATCAAGTTA	X89211	HERV-L LTR U5	59°C
LTR	Rev	TCTCACAATAGGCCATCTGCAAGC	X89211	HERV-L LTR U5	59°C

2.1.2.5 Primer-Sequenzen für die quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Primer		Oligonukleotid-Sequenz (5'→3')
ERV9(ERV9)	For	CCTCAACTGTTTTAATGTCTTAGGGCGAGG ^A
	Rev	CCCTCATCTGTTTGGTCAGGCC ^A
HERV-F	For	CCTCCAGTCACAACAAC ^B
	Rev	TATTGAAGAAGGCGGCTGG ^B
HERV-W	For	TGAGTCAATTCTCATACTG ^B
	Rev	AGTTAAGAGTTCTTGGGTGG ^B
HML-2	For	GGCCATCAGAGTCTAAAC ^A
	Rev	CTGACTTTCTGGGGGTGGCCG ^A
Seq26(HML-3)	For	CTGCAGCCTGCTAAGCG ^B
	Rev	CACTGTGAAAATTTTTACGAG ^B
HERV-KC4(HML-10)	For	GAATCTTTCTAATTTGAACCTTTTGAGG ^A
	Rev	CCCACAGTTTGTCAAACCTTTTGTAGGC ^A
p21	For	GGAAGACCATGTGGACCTGT ^D
	Rev	AAGATGTAGAGCGGGCCTTT ^D
RPII	For	GCACCACGTCCAATGACAT ^C
	Rev	GTGCGGCTGCTTCCATAA ^C
egfp	For	ACGTAAACGGCCACAAGTTC ^E
	Rev	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG ^E
Beta-Globin	For	ACACAACTGTGTTCACTAGC ^F
	Rev	CAACTTCATCCACGTTCCACC ^F

^A Sequenzen nach Vincendeau (unveröffentlicht); ^B Sequenzen nach (Seifarth *et al.* 2005);

^C Sequenzen nach (Radonic *et al.* 2004); ^D Sequenzen nach (Chen *et al.* 2004); ^E Sequenzen nach Meggen-dorfer (unveröffentlicht); ^F Sequenzen nach Baay *et al.* 1996.

2.1.2.6 Primer-Sequenzen für die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Primer		Oligonukleotid-Sequenz (5'→3')
GAPDH	For	CAATTCCCATCTCAGTCGT
	Rev	TAGTAGCCGGGCCCTACTTT
ChIP_C3_BI	For	CTGTTTCTCTTTGGCTGGTGTGG
ChIP_C5_A	For	ATGATCTCAACTCACTGCTGTGG
ChIP_C6_A	For	ACTGCCAGTCTCAGGTGTTTGGAT
ChIP_C7_A	For	AGTAGCTAGGGTTACAGGAGTGC
ChIP_rev	Rev	AGATGCCTTCCTCTTGTCTCAACT
ChIP_p21	For	CGTGGTGGTGGTGAGCTAGA ^A
ChIP_p21	Rev	CTGTCTGCACCTTCGCTCCT ^A

^A Sequenzen nach (Chen *et al.* 2004)

2.1.2.7 Primer-Sequenzen für die Methylierungsanalysen

Primer		Oligonukleotid-Sequenz (5'→3')
cB_I	For	GTTTTTTTTTGGTTGGTGTGG
cB_II	For	ATTTGATTTTTATAATGGTATAAGTTAA
cB_III	For	TTTTTTTTAGTTTTTGTGGAGAG
c5_A	For	TGGTATGATTTTAATTTATTGTTGTGG
c7_A	For	AGTAGTTAGGGTTATAGGAGTG ^A
c11_A	For	TGTTTAGAAAGGAAATAAAATAGGA ^A
c12_A	For	TTAAGGTAGGGAGGATAAGGAA ^A
c22_A	For	GTTTGGTTGTGTTATTTAGTGTGT
c6_A	For	ATTGTTAGTTTTAGGTGTTTGGAT ^A
RP1	Rev	CCATTATCACCTAACTTCTTC ^A
RP2	Rev	AATACCTTCCTCTTATCTCAACT ^A

^A Sequenzen nach (Lavie *et al.* 2005)

2.1.2.8 Primer-Sequenzen für die Mutationsanalyse

Primer		Oligonukleotid-Sequenz (5'→3')
HERV-L_U3	For	TGATGATTAATACCAAGTCTCGACTTGATTG
HERV-H-CL-MC	For	TGTCAGGCCTCTGAGCCAA
eGFP_67	Rev	CTTGCTCACCATGGTGGC
egfp	For	GGTGCAGGAGTGAGCAAGGGCGAGGAG ^A
egfp	Rev	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTGAGT ^A

^A Sequenzen nach Megendorfer (unveröffentlicht)

2.1.3 Das Plasmid - pLXSNEGFP

Dieser MLV basierte Vektor enthält das Reporterogen *egfp* („enhanced green fluorescence protein“), das von einer MLV LTR ausgehend reguliert wird, sowie ein Neomycin Resistenzgen mit einem SV40 Promotor („Simian virus 40“) (Klein *et al.* 1997; Schön *et al.* 2009).

2.1.4 Prokaryotische Zellen und Bakterienmedien

Für die Transformation wurden kompetente JM109 (Stratagene) oder „E. coli Competent Cells“ (Promega, Niederlande) verwendet.

LB-Amp-Medium (nach Luria-Bertani)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 100 µg/ml Ampicillin ad 1 l MilliQ-Wasser pH 7,5; autoklaviert
LB-Agar	LB-Medium +1,5% Agar (15 g/l)
LB-Amp-IPTG-X-Gal-Platten	LB-Agar 100 µg/ml Ampicillin 20 mM IPTG-Lösung 80 µg/ml X-Gal
SOC Vollmedium (Life Technologies, Invitrogen)	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 ml 0,25 M KCl 5 ml 2 M MgCl ₂ 20 ml 1 M Glucose ad 1 l mit MilliQ-Wasser pH 7,0; autoklaviert

2.1.5 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen für die Zellkultur wurden mit MilliQ-Wasser angesetzt und autoklaviert oder steril filtriert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Reduktionslösung (NaBH₄-Lösung)	Wurde grundsätzlich kurz vor Gebrauch frisch angesetzt (Für 42 Objektträger), da Knallgasentwicklung (H ₂)! NaBH ₄ 2 g 1x PBS 600 ml 100 % Ethanol 200 ml
Vorhybridisierungslösung	6x SSC 15 ml (20x) 0,5 % SDS 2.5 ml (10 %) 1% BSA 0,5 g MilliQ-Wasser ad 50 ml
Hybridisierungslösung	3x SSC 150 µl (20x) 0.2x SDS 20 µl (10x) 50 % Formamid 500 µl (100 %) MilliQ-Wasser 230 µl
10x SDS	100 g Natriumdodecylsulfat in 1000 ml MilliQ-Wasser
Waschlösung 1	1x SSC 0.1 % (w/v) SDS
Waschlösung 2	0.1x SSC 0.1 % (w/v) SDS
Waschlösung 3	0.1x SSC
Ethanol (75-95%)	100% Ethanol verdünnt mit MilliQ-Wasser
Gel-Ladepuffer	15% Ficoll 5 mM EDTA 0,01% Bromphenolblau 0,01% Xylencyanol
Lyselösung	DMSO 99,4 ml Essig- oder Salzsäure 0,6 ml SDS 10 g
MTT-Stammlösung	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) 25 mg PBS pH 7,4 5 ml
Natrium-Acetat (3 M), pH 5,2	3 M Lösung, pH mit Essigsäure eingestellt
TAE-Puffer (50x): Tris Acetat EDTA Puffer	2 M Tris-Acetat 1 mM Eisessig 0,1 M EDTA
SSC (20x) pH 7,0	175,3 g NaCl 3M 88,2 g NaCitrat 300mM Ad 1l MilliQ-Wasser
PBS-Puffer (Phosphat gepufferte Natriumchloridlösung, pH 7,4)	140 mM NaCl 5,4 mM KCl 9,7 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 2 mM KH ₂ PO ₄

Trypsin-EDTA Lösung (Gibco, Paisley; UK)	140 mM NaCl 5,4 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 2,2 mM KH ₂ PO ₄ 0,05% Trypsin 0,54% EDTA
DNA-Auftragspuffer für Gelelektrophorese	15% Ficoll 5 mM EDTA 0,01% Bromphenolblau 0,01% Xylenyanol
Lösung für Agarosegele (1,0%)	1g Agarose 100 ml TAE-Puffer 5 µl Ethidiumbromid

Alle nicht aufgelisteten Puffer und Lösungen sind in den einzelnen gebrauchsfertigen Reaktionssystemen (Kits) enthalten und in deren Protokollen beschrieben.

2.1.6 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
2-log-DNA Längenstandard	New England Biolabs, Schwalbach
5-Azacytidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampuwa®	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Aqua <i>bidest.</i> (Milli-Q)	Millipore Water System, Eschborn
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Clozapin	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	AppliChem, Darmstadt
dNTPS (10 mM)	New England Biolabs, Schwalbach
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (absolut zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 1% (w/v in Aqua dest.)	Serva, Heidelberg
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötale Kälber Serum, FCS	GIBCO, Paisley, UK

Geneticin	GIBCO, Paisley, UK
Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
Glutaraldehyd 2,5%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Haloperidol	Sigma-Aldrich, Steinheim
IPTG, 0,2% in aqua dest.	Roche Diagnostics, Mannheim
Isopropanol (absolut zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
MTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
N ₂ -Supplement (100x)	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumborhydrid (NaBH ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Selenit (30 nM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin und Streptomycin	GIBCO, Paisley, UK
Polybren	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyfect	Qiagen, Hilden
Poly-Ornithin-Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Risperidon	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS	Merck, Darmstadt
Sodium Acetat 3M	Merck, Steinheim
Valproinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
X-Gal	Roche Diagnostics, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

Alle nicht aufgelisteten Reagenzien sind in den einzelnen gebrauchsfertigen Reaktionssystemen (Kits) enthalten und in deren Protokollen beschrieben.

2.1.7 Enzyme, Proteine und Antikörper

Name	Hersteller
Accutase	PAA, Cölbe
Antikörper	Millipore, Schwalbach; Sigma-Aldrich, Steinheim
bFGF (100 ng/ml)	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
BPE	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EGF (100 ng/ml)	Millipore, Schwalbach
Heparin (2 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin (5 µg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Laminin	Sigma-Aldrich, Steinheim
LIF (10 ⁷ U/ml)	Chemicon, Millipore, Schwalbach
NEAA ("Non-essential Amino-Acids")	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Progesteron (20 nM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Putrescein (100 µM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
RNase H (2 u/µl)	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
RNaseOUT™ [40 U/µl]	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
SuperScript™ II RT [50 U/µl]	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
T4 DNA Ligase [3 U/µl]	Promega, Mannheim
Transferrin (100 µg)	Serological Corporation
Trypsin-EDTA	GIBCO, Paisley, UK
ZymoTaq DNA Polymerase [5 U/µl]	ZYMO Research Europe, Freiburg

2.1.8 Sonstige Labormaterialien

Name	Hersteller
384 Well Platten mit Deckel, steril	Genetix Limited, New Milton, United Kingdom
96 Well-Platte	BD Biosciences, Heidelberg
BiZell Einfrierbehälter	Nihon Freezer Co, Tokyo, Japan
Cellstar® Pipetten, diverse Größen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CSS-100 Silylierte Slides	ArrayIt-CEL-Associates, Los Angeles, USA
Deckgläser Lifter-Slip 22x22	Erie Scientific Company, Portsmouth, USA
Eppendorf tubes 0,5 ml, 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	BD Falcon, Düren
Falcon® tubes 15 ml, 50 ml	BD Falcon, Düren
Filter für Sterilfiltration	Millipore, Schwalbach
Filterpapier, Whatman	Schleicher und Schuell, Dassel
Fixogum	Marabu GmbH & Co. KG, Tamm
Hybridisierungskammer für Microarray	Greiner, Nürtingen
Injektionskanüle	ROSE GmbH, Trier
Lichtgeschützte Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Multiwell® 6/12 und 24-Well-Platte	BD Falcon, Düren
Nunc Cryotubes Vials	Nalge Nunc International, USA
PCR Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pechiney Parafilm M PM996	Alcan Inc., Canada
Pipetten Pipetman® Gilson	Gilson Inc., USA
Plastikkammer (für Hybridisierung)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Plastikmaterial für Zellkultur	Greiner Labortechnik, Frickenhausen; BD und Thermo, Fisher Scientific (Nunc, Langenselbold)
Skalpell (steril)	Aesculap AG, Tuttlingen
Slide-Transportbox	Greiner, Nürtingen
Spritze, 10ml	Becton Dickinson, Temse, Belgien
Whatman Papier	Whatman, Maidstone, UK
Zählkammer Fast Read 10	Madaus Urotech, München
Zellkulturflasche T25, T75, T185	Thermo Fisher Scientific (Nunc GmbH & Co. KG), Langenselbold

Sonstige Verbrauchsmaterialien wurden von Becton Dickinson (Düren), Nunc International (Wiesbaden), Eppendorf (Hamburg), Gilson (Den Haag, Niederlande) oder Sarstedt (Newton, USA) bezogen.

2.1.9 Zelllinien und Kulturmedien

Bei allen Zelllinien handelt es sich um adhären wachsende Zellen, die bezüglich ihres Wachstumsverhaltens und ihren morphologischen Eigenschaften regelmäßig kontrolliert wurden. Allen verwendeten Medien wurde 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin sowie Fötale Kälber Serum (FCS), das vor Gebrauch 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert wurde, zugesetzt.

Verwendete Zelllinien

U-138MG	Humane Glioblastom-Zelllinie (ATCC HTB 16);
U-251MG	Humane Glioblastom-Zelllinie (JCRB, IFO50285);
85HG66	Humane Glioblastom-Zelllinie;
SK-N-SH	Neuroblastom-Zelllinie (ATCC HTB-11);
SK-N-MC	Neuroepitheliom-Zelllinie (ATCC HTB-10);
U-373MG	Glioblastom-Zelllinie;
HNSC.100	Humane neurale Stammzelllinie (Villa <i>et al.</i> 2000);
ANBC	Adulte neurale Gehirnzellen, (freundlicherweise von Dr Coras, Uniklinikum Erlangen zur Verfügung gestellt);
Tera-1	Teratokarzinom-Zelllinie (HTB-105), (freundlicherweise von Jens Mayer, Uniklinik Saarland zur Verfügung gestellt);
HaCaT	Humane Keratinozytenzelllinie;
HeLa	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie (DSMZ ACC 057);
LC5-HeLa	Humane epitheloide Zervixkarzinomzelllinie aus einem HeLa-Subklon entstanden (DSMZ ACC 057); Ursprüngliche Bezeichnung L-132 (ATCC CCL-5),(Mellert <i>et al.</i> 1990);
MIAPaCa-2	Humane Pankreaskarzinomzelllinie
pA317	Amphotrophe murine Verpackungszelllinie (CRL-9078)

Mit pLXSN-HERV-H oder pLXSN-HERV-L-CordR infizierte Zellklone

Sieben der verwendeten Zellklone wurde freundlicherweise von Laura Leitner zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um HeLa, HaCaT, MIAPaCa-2 und LC5-HeLa Zellen, die mit den Vektoren pLXSN-HERV-H-MC16, pLXSN-HERV-H-MC16R, pLXSN-HERV-H-CL-1 oder pLXSN-HERV-L-CordR infiziert worden waren (Schön *et al.* 2009). Ein Zellklon (LXSN-HERV-H-MC16R/LC5-HeLa) wurde in einer früheren Untersuchung von mir selbst generiert.

Zellkulturmedium für U-138MG, U-251MG, 85HG66, U-373MG, HaCaT, HeLa, LC5-HeLa, MIAPaCa-2 und pA317

D-MEM (Dulbecco's modified eagle's medium) mit Glutamax I (L-Analyl-L-Glutamin), Pyruvat und 4,5 g/l Glucose (Gibco) unter Zugabe von 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin.

Zellkulturmedium für SK-N-SH

MEM (Minimal Essential Medium, Gibco) mit 2 mM L-Glutamin, 1,5 g/l Natriumbikarbonat, nicht-essentielle Aminosäuren (0,1 mM) und Natriumpyruvat (1 mM).

Zellkulturmedium für SK-N-MC

Advanced MEM (Minimal Essential Medium, Gibco) mit 110 mg/l sodium pyruvat und nicht-essentielle Aminosäuren unter Zugabe von 2 mM L-Glutamine (Gibco), 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin.

Zellkulturmedium HNSC.100

D-MEM/F-12 GlutaMAX-I 1:1 (Gibco) unter Zugabe von 1% BSA (Sigma Nr. A9647), 1x N₂-Supplement und 5 mM Hepes-Puffer (Invitrogen). Außerdem wurde 0,5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 20 ng/ml FGF (gelöst in PBS + 0,1% BSA+ 1 mM DTT), sowie 20 ng/ml EGF (gelöst in 10 mM Essigsäure + 0,1% BSA) hinzugegeben und sterilfiltriert. Für die Kultivierung von HNSC.100 wurden Poly-Ornithin-beschichtete Zellkulturflaschen verwendet.

Grundmedium für ANBC

DMEM-F12 (Gibco), Zugabe von 1% Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin (Gibco); Insgesamt wurden 190 ml Zellkulturmedium mit 10 ml FCS, 200 µl Insulin, 200 µl Progesteron und 200 µl Transferrin/Putrescine/Natrium-Selenit versetzt und anschließend steril filtriert. Dem Grundmedium mussten alle drei Tage stets Wachstumsfaktoren (EF und LIF) zugegeben werden. Nach Mediumwechsel wurde zusätzlich BPE („Bovine Pituitary Extract“, Gibco) zugesetzt. Für die Kultivierung wurden spezielle Zellkulturflaschen verwendet. Hierfür wurden die Flaschen über Nacht bei 37°C mit 250 µg/ml Poly-Ornithin-Lösung beschichtet, anschließend dreimal mit PBS gespült und wieder 2 h bei 37°C mit 15 µg/ml Laminin-Lösung inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS können die Flaschen direkt verwendet werden oder mit Parafilm verschlossen bei 4°C gelagert werden.

EF: 9,4 ml Grundmedium ohne FCS
200 µl FGF
200 µl EGF
200 µl Heparin

LIF: 9 ml Grundmedium mit FCS
1 ml LIF (Recombinant human LIF, Chemicon)

Zellkulturmedium für Tera-1

McCoy's 5A Medium (modified), (Gibco), Zugabe von 15% FCS und L-Glutamin (Gibco).

Einfriermedium für eukaryotische Zellen

Entsprechendes Zellkulturmedium, Zugabe von 20% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 10% DMSO.

Selektionsmedium

Entsprechendes Zellkulturmedium, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und Zugabe von 8,8 µl/ml Geneticin (50 mg/ml, Gibco).

2.1.10 *Postmortem* Gehirnproben

Humane *postmortem* Gehirn-RNA-Proben wurden vom „Stanley Medical Research Institut“, Bethesda, MD, USA bezogen. Es handelt sich dabei um 105 Proben aus dem präfrontalen Cortex (Brodmann´s Areal 46) aus drei gut abgeglichenen Patientengruppen. Jede Gruppe umfasst Proben von je 35 Personen mit Schizophrenie, Bipolaren Störungen oder gesunden Kontrollpersonen (Miller *et al.*, 2004; Torrey *et al.*, 2000). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten cDNAs wurden im Forschungslabor der Universitätsmedizin Mannheim aus RNA generiert und in dieser Arbeit anhand der Medikation, die die Patienten in ihrem Krankheitsverlauf erhalten hatten, für quantitative RT-PCR Experimente ausgewählt.

Aus der gleichen Sammlung („Stanley Medical Research Institut“) stammten die Proben genomischer DNA eines Gesunden und eines Schizophreniepatienten, die für die Methylierungsanalysen verwendet wurden.

2.1.11 Makaken-Gehirnproben

RNA-Extrakte eingefrorener Gewebeproben des motorischen Kortex von 30 Rhesus-Affen (*M. mulatta*) wurden von S. E. Hemby, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, USA zur Verfügung gestellt. Während jeweils 10 Affen mit Haloperidol (0,07 mg/kg; b.i.d.) bzw. Clozapin (2,6 mg/kg; b.i.d.) behandelt worden waren, dienten 10 unbehandelte Affen als Kontrollen. Die cDNA wurden freundlicherweise von Marc Frohnmeyer, Universitätsklinikum Mannheim hergestellt.

2.1.12 Geräte

Name	Hersteller
Agarosegelapparaturen	Owl Separation Systems, Portsmouth, USA
Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
ChemiDoc Geldokumentationsanlage	BioRad, München
Elektrophorese Power PAC300	BioRad, München
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
FACScalibur Durchflusszytometrie	BD Biosciences, Düren Ausstattung: Anregungsfilter (488 nm, 15mW für FL-1) Fluoreszenzdetektoren FL-1 (BP 530/30)
Feinwaage AC 100	Mettler, Waagenbau Werkstätten, Utting
GMS 418 Arrayer	Affymetrix, Santa Clara, USA
GMS 418 Array-Scanner	Affymetrix, Santa Clara, USA
Hera cell 150 CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific
Heraeus Fresco 17 Kühlzentrifuge	Thermo Scientific
Herolab Clean Cab Arbeitsbench	Herolab Laborgeräte, Wiesbach
Inkubator	Memmert, Schwabach
LightCycler 480 System	Roche, Mannheim
Schüttelinkubator	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
Sigma 1-15 Mikrozentrifuge	Sigma GmbH, Oserode
Spektrophotometer Smart Spec Plus	BiaRad, München
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Instrument, Hanau
Tecan infinite m200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall Homogenisator	Bandelin Sonoplus, Berlin
UV-Tisch	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wasser-Schüttelbad	Köttermann Labortechnik, Hannover

2.1.13 Software und Datenbanken

Name	Hersteller
Adobe Acrobat CS3	Adobe systems, USA
Adobe Illustrator CS3	Adobe systems, USA
Adobe Photoshop CS3	Adobe systems, USA
Alignment-Program	http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast
Cell Quest Pro	BD Biosciences, Düren
Endnote X1	Thomson ISI ResearchSoft
FlowJo	Tree Star, USA
Icontrol 5,0	Tecan, Männedorf, Schweiz
ImaGene Version Software tool package	BioDiscovery Inc., Los Angeles, USA
Light Cycler 480 Software	Roche Diagnostics, Mannheim
Medline	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed
Microsoft Office 2007	Microsoft Corp., USA
Prism 4,0	GraphPad, San Diego, USA
QuarkXPress	Quark Deutschland, Hamburg
RepeatMasker	http://www.repeatmasker.com
Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
Software Gel-Doc Quantity One	Version 2.4.1 Build 008 BioRad, München
UCSC Genome Bioinformatics	http://www.genome.ucsc.edu

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechniken

2.2.1.1 Auftauen und Kultivierung adhärenter humaner Zellen

Mit Ausnahme der Zellen ANBC und HNSC.100 (siehe folgendes Kapitel) wurden alle übrigen Zellen (U-138MG, U-251MG, 85HG66, U-373MG, SK-N-SH, SK-N-MC, Tera-1, LC5-HeLa, MIAPaCa-2, HeLa, HaCaT und pA317) wie folgt kultiviert. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in eine Zellkulturflasche (Nunc, 75 cm²) mit 10 ml entsprechendem Medium überführt (vgl. 2.1.9). Für einen optimalen pH-Wert wurden die Flaschen einschließlich Medium vorher 15 min bei 5% CO₂-Konzentration im Brutschrank gelagert. Das Medium wurde am nächsten Tag gewechselt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Inkubatoren mit wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C. Bei einer Zelldichte von 80-90% wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen, um tote Zellen und Zellbestandteile zu entfernen und mit Trypsin-EDTA vom Untergrund gelöst, um anschließend durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt in Zellkulturmedium wieder aufgenommen zu werden. Überschüssiges Trypsin wurde durch Zugabe von Kulturmedium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) inaktiviert. Je nach Bedarf wurden die Zellen bis maximal 1:15 verdünnt. Alle Zellen wurden zu Beginn der Experimente auf Mycoplasmen (Look Out Mycoplasma PCR Detection Kit, Sigma) getestet. Verwendete Zelllinien wurden entweder bei „American Type Culture Collection“ (ATCC) gekauft oder bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) authentifiziert. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten stets unter sterilen Bedingungen.

2.2.1.2 Kultivierung von humanen primären Gehirnzellen (ANBC)

Die zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetauten ANBC Zellen wurden in 10 ml Grundmedium aufgenommen und anschließend für 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Zellpellet erneut in Grundmedium resuspendiert und unter Zugabe von EF (50 µl/ml Medium), LIF (10 µl/ml Medium) (vgl. 2.1.9) und BPE (6,3 µl/ml Medium) in Laminin-beschichtete Nunc-Flaschen (75 cm²) überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Inkubatoren mit wassergesättigter Atmosphäre und 5% CO₂ bei 37°C. Alle drei bis fünf Tage wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit neuem Medium inklusive Wachstumsfaktoren EF, LIF (siehe auch Grundmedium für ANBC) und BPE (Gibco) versorgt. Zum Passagieren wurden die Zellen vorsichtig mit PBS abgewaschen, mit 1 ml Accutase 7 min bei 37°C inkubiert und mit Kulturmedium resuspendiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 800 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in Grundmedium resuspendiert.

2.2.1.3 Kultivierung der humanen neuralen Stammzelllinie HNSC.100

Die Zelllinie HNSC.100 wurde unter standardisierten Bedingungen auf Poly-D-Lysin beschichteten Zellkulturgefäßen der Firma BD Bioscience in Proliferationsmedium kultiviert. Zum Passagieren wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend

mit 0,5-3 ml Trypsin-EDTA für 10 min im Brutschrank inkubiert. Aufgrund des geringen Anteils von 0,5% FCS im Kulturmedium wurden die HNSC.100 Zellen bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Aufnahme der Zellen mit Kulturmedium wurden die Zellen je nach Bedarf maximal 1:10 verdünnt.

2.2.1.4 Aussäen von Zellen

Für die meisten Experimente wird eine bestimmte Zelldichte am Versuchstag vorausgesetzt. Zu diesem Zweck wurden am Vorabend die Zellen vom Untergrund gelöst, mit Medium resuspendiert und 10 μ l Zellsuspension in eine Zählkammer pipettiert. Drei der darin enthaltenen Großquadrate wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Der errechnete Mittelwert multipliziert mit 10^4 gibt die Anzahl der Zellen pro ml an.

2.2.1.5 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden alle Zellen einer T-75-Zellkulturflasche zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA (Ausnahme ANBC: Accutase) vom Untergrund abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in einem 15 ml Falcon Gefäß bei 800-1000 rpm 10 min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 4 ml Einfriermedium resuspendiert, je 1 ml der gelösten Zellen (mind. 10^6 Zellen) in Nunc-Cryo-Röhrchen überführt und diese in „Bizell“-Einfrierbehälter bei -80°C gelagert. Am Folgetag wurde ein Teil der Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.6 MTT Assay

Der MTT-Assay wurde erstmals von Mosmann 1983 beschrieben und ist ein photometrischer Proliferations- und Zytotoxizitäts-Assay (Mosmann *et al.* 1983). Der Nachweis der Zellvitalität beruht dabei auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Sigma) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Insgesamt wurden 5×10^3 - 1×10^5 Zellen/well in 96-well Platten ausgesät und am Folgetag mit absteigenden Konzentrationsreihen (mit 10 mM VPA, 10 μ M 5-Azacytidin und je 10 μ M Haloperidol, Risperidon und Clozapin beginnend und in 1:2 Verdünnungen folgend) behandelt. Nach 24 h, 48 h bzw. 72 h wurde das Medium vorsichtig abgeschüttet und 10% MTT-Stammlösung (1:10 verdünnt mit Medium) ersetzt und für 4 h im Brutschrank inkubiert. Währenddessen erfolgte die Reduktion zu lilafarbenen Formazan Kristallen, die wasserunlöslich sind. Anschließend wurde das MTT-haltige Medium entfernt und die Zellen mit 100 μ l Lyselösung pro Well lysiert. Die Intensität des gelösten Formazans kann photospektrometrisch bei 570 nm Testwellenlänge und 630 nm Referenzwellenlänge gemessen werden. Die Reduktion findet nur in stoffwechselaktiven Zellen statt, daher ist der gemessene Wert proportional zur Vitalität der Zellen und spiegelt die Zytotoxizität der getesteten Medikamente wieder.

2.2.1.7 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Medikamenten

Am Vorabend wurden je nach Zelltyp und Behandlungsdauer $0,5$ - 5×10^6 Zellen in T-75 Flaschen ausgesät und über Nacht inkubiert. Jede Behandlungsreihe eines Zelltyps beinhaltete eine unbe-

handelte Flasche derselben Zellpassage und wurde später zur Normierung herangezogen. Um herauszufinden, ob antipsychotische Medikamenten einen Einfluss auf die HERV Aktivität haben, wurden folgenden Konzentrationen verwendet: 1 und 5 mM Valproinsäure (VPA) und jeweils 0,1; 1, und 10 μ M der Medikamente Haloperidol, Risperidon und Clozapin verwendet. Die Behandlungsdauer lag bei 24 h oder 72 h.

Für den Reaktivierungsversuch des teilweise inaktivierten Zellklons LXS_N-HERV-H-MC16R/MIAPaCa-2 wurde neben 1 mM VPA und 5 μ M Haloperidol, Risperidon und Clozapin zusätzlich eine Behandlung mit 1 μ M 5-Azacytidin als Einzeldosis oder in Kombination mit 1 mM VPA für eine Zeitraum von 24 h, 48 h oder 72 h gewählt. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von 5-Azacytidin wurde das Medium täglich neu verdünnt. Nach erfolgter Inkubation wurde die Reportergenaktivität der Zellen mittels FACS Analyse bestimmt.

2.2.1.8 Transfektion eukaryotischer Zellen mit gereinigter Plasmid-DNA.

Alle Transfektionsversuche wurden in 6-well Platten in Parallelansätzen durchgeführt. Am Vortag wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen der murinen Verpackungszelllinie pA317 ausgesät. Die transiente Transfektion erfolgte mittels Polyfect (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers. Hierbei wird aufgrund von Interaktionen eines Dendrimers mit negativ geladenen Phosphatgruppen die DNA komplexiert und über Endozytose in die Zellen aufgenommen. Eingesetzt wurden 4 μ g Plasmid DNA (pLXS_NEGFP) mit einer Inkubationszeit von 48 h.

2.2.1.9 Infektion von Zellen mit rekombinanten Viruspartikeln

Am Vorabend wurden $2,2 \times 10^5$ Zellen (LC5-HeLa, HaCaT, MIAPaCa-2 und HeLa) in 6-well Platten ausgesät, die zu Versuchsbeginn nicht mehr als 70-80% konfluent sein sollten, da MLV-Vektoren als typische Vertreter der γ -Retroviren für eine erfolgreiche Infektion Zellteilungen benötigen. Die Infektion der Zielzellen erfolgte 48 h nach der Transfektion der Verpackungszelllinie pA317. Hierfür wurden die Virusüberstände mit einer Spritze aufgezogen und einem Filter der Porengröße 0,45 μ m filtriert. Je 1 ml des Virusfiltrats wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 1 μ l Polybren versetzt, um die Infektionsrate zu steigern. Nachdem bei den Empfängerzellen das Medium entfernt worden war, wurde das Infektionsgemisch vorsichtig zugetropft. Nach 6 h Inkubation bei 37°C wurde Kulturmedium zugegeben. Nach weiteren 3 h wurden die Zellen trypaniniert und je ein Viertel auf 10 cm Kulturschalen aufgeteilt. Zwei Tage nach der Infektion wurden alle Ansätze über einen Zeitraum von zwei Wochen mit Geneticin-haltigem Selektionsmedium behandelt, da Geneticin alle eukaryotischen Zellen abtötet, die nicht das Neomycin-Resistenzgen (*neoR*) des Vektors exprimieren.

2.2.1.10 Isolierung von Zellklonen

Nach Entfernen des Selektionsmediums wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dieses wieder vollständig entfernt. Um die Kolonie wurde ein autoklavierter Metallring mit etwa 7 mm Durchmesser gelegt und leicht mit einer Pipettenspitze festgedrückt. In den Ring wurden 20 μ l Trypsin-EDTA pipettiert und die gelösten Zellen anschließend in 200 μ l Selektionsmedium resuspendiert. Die gesamte Kolonie wurde in ein Well einer 24-Well-Platte überführt und weiter stetig kultiviert, bis eine ausreichende Zellmenge für weiterführende Experimente zur Verfügung stand.

2.2.1.11 FACS-Analyse (“Fluorescence activated cell sorting”)

Die FACS Analyse wurde verwendet, um eine große Zellzahl über einen Zeitraum von sechs Monaten auf ihre Fluoreszenz zu untersuchen. Hierfür wurden sowohl infizierte als auch zur Kontrolle nicht infizierte Zellen trypsinisiert und in frisches Medium aufgenommen. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 1300 g wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in 500 μ l PBS gelöst und bis zur Analyse auf Eis gestellt. Es wurden jeweils 5×10^5 Zellen gemäß den Angaben des Herstellers durch eine Kapillare gesaugt und diese passierten im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl (Kanal FL-1, Grünfluoreszenz). Die Zellen streuten dabei Licht und emittierten Fluoreszenz. Das Vorwärtsstreulicht FSC ist ein Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht SSC ein Maß für die Granularität. Anhand dieser Parameter der unbehandelten Kontrolle wurde die zu untersuchende Population festgelegt und ein Schwellenwert bestimmt, ab welcher Intensität eine Grünfluoreszenz gewertet wurde. Zur Auswertung wurde die Software FlowJo von Tree Star verwendet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus humanen Zellen

Zur Gewinnung genomischer DNA aus humanen Zellen wurden diese geerntet, die Zellzahl beim Passagieren bestimmt und maximal 5×10^6 Zellen pelletiert bis zur Isolierung auf Eis aufbewahrt. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen). Die DNA wurde mit 200 μ l Ampuwa Wasser eluiert und deren Konzentration bzw. Reinheit photometrisch bestimmt. Alle DNA Proben wurden anschließend bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.2 RNA Isolierung aus humanen Zellen

Die Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) gewonnen. Nach der Zellernte wurden maximal 1×10^7 Zellen pelletiert, direkt auf Eis gestellt und zeitnah dem Herstellerprotokoll entsprechend isoliert. Die gewonnene RNA wurde mit 30-50 μ l RNase freiem Wasser eluiert und nach spektrophotometrischer Bestimmung der Konzentration bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nach jeder DNA bzw. RNA Präparation wurde die Konzentration und Reinheit der Nukleinsäure bestimmt. Dazu wurde diese 1:100 mit Wasser verdünnt und die optische Dichte (OD) im Spektrophotometer bestimmt. Die gemessene OD bei 260 nm wird bei DNA mit 5 und für RNA mit Faktor 4 multipliziert und gibt die Konzentration der Nukleinsäure in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ an. Das Verhältnis $\text{OD}(260) \text{ nm}/\text{OD}(280) \text{ nm}$ spiegelt die Reinheit wieder und sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.2.4 DNase Verdau und Kontroll-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Um sicherzustellen, dass die gewonnene RNA nicht mit genomischer DNA verunreinigt ist, wurden die Proben mit einer RNase-freien DNase nach Protokoll des RQ1 DNase Kits (Promega) behandelt. Hierfür wurden 2 μg RNA mit Ampuwa Wasser verdünnt (Endvolumen 7 ml) und je 1 U/ μg DNase eingesetzt.

DNase Verdau:	2 μ g RNA
	1 μ l RQ1 DNase Puffer
	2 μ l DNase
	Nuklease-freies Wasser ad 10 μ l

Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit der Zugabe von 1 μ l RQ1DNase Stop Solution und 10 minütiger Inkubation bei 65°C gestoppt. Anschließend wurden 0,5 μ l der verdauten RNA verwendet, um deren Reinheit mittels PCR zu überprüfen. Hierfür wurden HERV-L LTR spezifische Primer verwendet (vgl. 2.1.2.4), da diese eine große Anzahl der etwa 6000 HERV-L LTRs im Genom amplifizieren sollten. Optional konnten auch bei der Detektion geringster Spuren genomischer DNA MOP („Mixed Oligonukleotid Primer“)-Primer verwendet werden (vgl. 2.1.2.1). Nach einer Auftrennung der PCR Produkte mittels Gelelektrophorese war in den meisten Fällen nur in der Positivkontrolle mit genomischer DNA als Template eine Bande von 650 Basen zu erkennen. War auch in einer RNA Probe ein Amplifikat aufgetreten, musste der DNase-Verdau wiederholt werden. Grundsätzlich wurden nur DNA-freie RNA Proben in cDNA umgeschrieben.

Reaktionsansatz für die Kontroll-PCR (GoTaq PCR System)

GoTaq Reaktions-Puffer (5x)	5,0 μ l
dNTPs (10 mM)	1,0 μ l
HERV-L LTR for (10 μ M)	1,0 μ l
HERV-L LTR rev (10 μ M)	1,0 μ l
GoTaq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,2 μ l
Template RNA (DNase verdaut)	0,5 μ l
Ampuwa Wasser	ad 25 μ l Gesamtvolumen

Das PCR Programm beinhaltete einen einmaligen zweiminütigen Denaturierungsschritt von 95°C, gefolgt von 30 Zyklen bestehend aus 95°C für 30 s, der Primer entsprechenden „Annealing“ Temperatur 30 s und einer einminütigen Elongation bei 72°C. Die Elongation wurde bei 72°C 5 min vervollständigt und der Reaktionsansatz bis zur weiteren Verwendung auf 4°C gekühlt.

2.2.2.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die reverse Transkription von RNA in cDNA erfolgte mit dem SuperScript™ II First Strand Synthesis System (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers in zwei Schritten. Zuerst wurden stets 7 μ l DNase verdaute RNA mit 2 μ l Random Hexamers und 1 μ l dNTPs (10 mM) angesetzt, 5 min bei 65°C und anschließend 1 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein zweiter Reaktionsansatz, unter Zugabe von 2 μ l RT Puffer (10x), 4 μ l MgCl₂ (25 mM), 2 μ l DTT (0,1) und 1 μ l RNase Out (40 U/ μ l). Nach erfolgter cDNA Synthese in einem finalen Endvolumen von 20 μ l erfolgte zuletzt der Abbau des RNA Anteils in einer RNA-cDNA Hybride durch 0,5 μ l RNase H (5 U/ μ l). Die gewonnene einzelsträngige cDNA kann für weiterführende Experimente genutzt werden.

2.2.2.6 Retrovirus-spezifischer Microarray

Die Retrovirus-spezifische Microarray Analyse wurde wie bei Seifarth *et al.* (Seifarth *et al.* 2003; Seifarth *et al.* 2005) beschrieben durchgeführt. Alle folgenden Schritte wurden in abgedunkelten Räumen, am besten unter Verwendung lichtgeschützter Eppendorf-Reaktionsgefäße, vollzogen. Dieser Microarray basiert im ersten Schritt auf einer Multiplex-PCR mit Fluorochrom-modifizierten Primern (Cy3), die hochkonservierte Bereiche im *pol*-Gen einer jeden HERV-Gruppe erkennen und im zweiten Schritt aus einer DNA Chip Hybridisierung mit Retrovirus-spezifischen Oligonukleotiden auf Glasobjektträgern (Abb. 8). Die verschiedenen mit dem Microarray detektierten Retrovirus-Gruppen und Gene, ihre Sequenz-Quellen und Lokalisierung auf dem Microarray sind dem Abschnitt 2.1.2.2 Tab. 2 zu entnehmen. Die kompletten Sequenzen sind im Anhang (Tab. 10) aufgeführt.

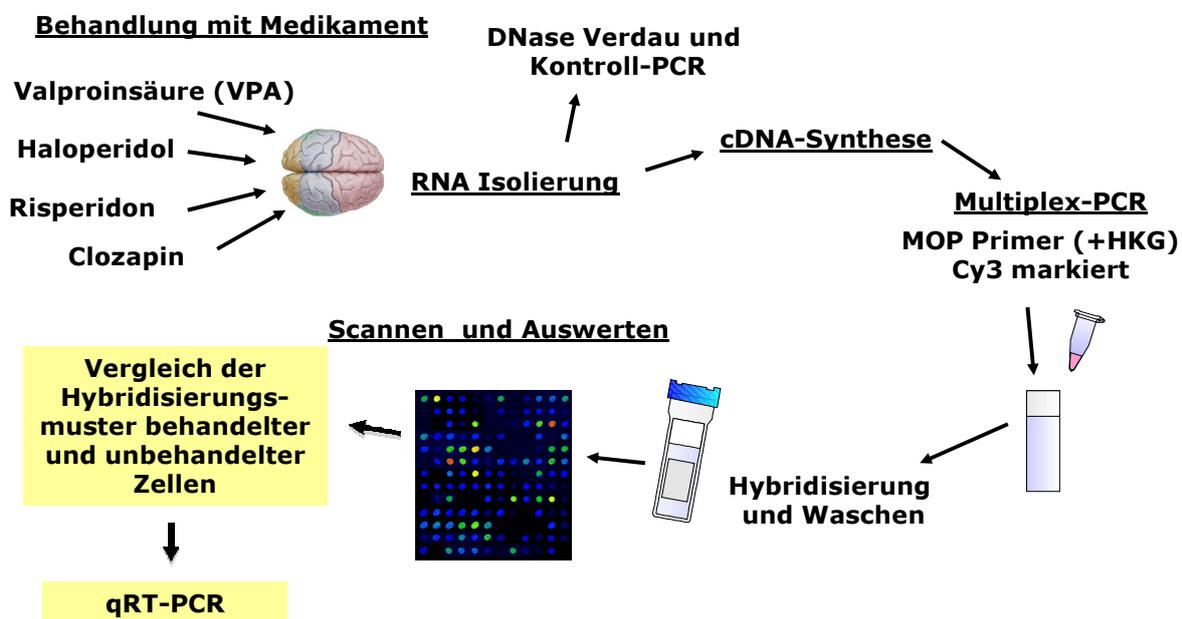


Abb. 8: Schematischer Überblick über den Ablauf der medikamentösen Behandlung, Isolierung der RNA, gefolgt von cDNAs Synthese und Retrovirus-spezifischem Microarray.

Lokalisation der Oligonukleotide

Alle Cy3-modifizierte Oligonukleotide wurden aufgrund von Stabilitätsproblemen in 10 mM PO_4^- Puffer gelagert. 5'-aminomodifizierte Oligonukleotide wurden in 3xSSC auf eine Konzentration von 100 μM eingestellt. Die Retrovirus-spezifischen Oligonukleotide, auch „Capture Probes“ genannt, wurden als 45-Oligomer-Paare hergestellt (Metabion, Martinsried). Ihre Sequenzen (90 Basen) leiten sich von dem Sequenzbereich zwischen zwei hoch konservierten Motiven des *pol*-Gens (VLPQG und YM/VDD) ab. Anhand der großen Variabilität (50-85%) dieser Sequenzen kann zwischen verschiedenen Retrovirusgruppen und -subgruppen diskriminiert werden (Abb. 9B). Somit ist eine spezifische Detektion unterschiedlicher HERV-Transkripte gewährleistet. Die 5'-Enden sind zusätzlich NH_2 -(C6)-modifiziert, um eine kovalente Bindung an die Aldehyd-aktivierte Oberfläche der Objektträger zu gewährleisten (Seifarth *et al.* 2003).

Konservierte Sequenzbereiche im retroviralen Genom

Homologie <<< RT – EN – NC – RNase H – CA – PR – TM – MA – SU >>> Divergenz

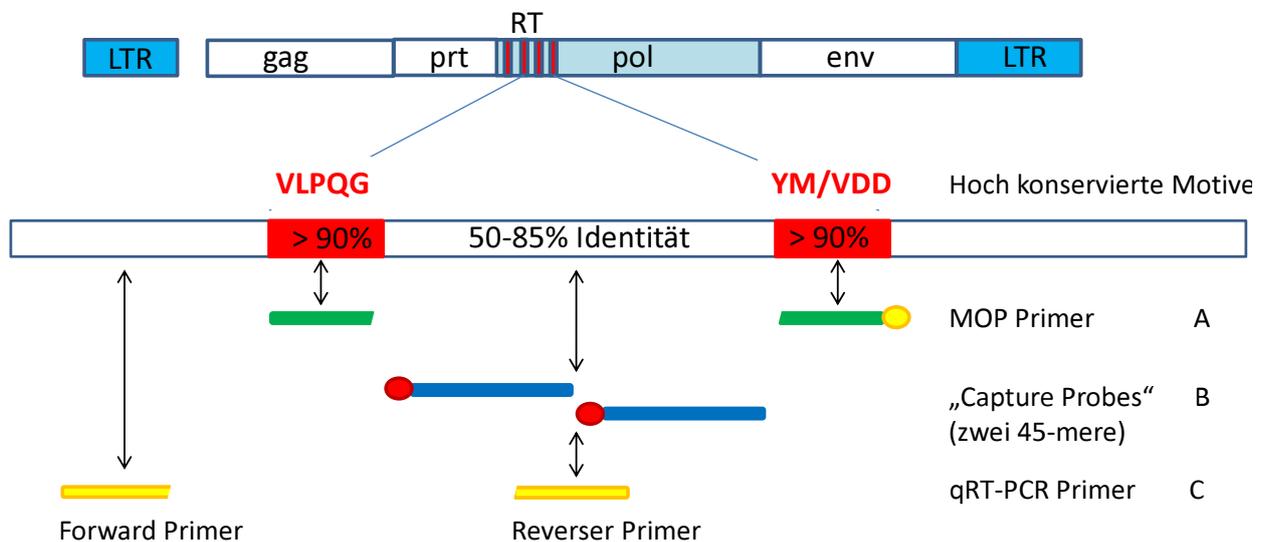


Abb. 9: Lokalisation der für die MOP PCR verwendeten Primer (A, in Grün) sowie der auf den Objektträger gedruckten 90 Basen langen „Capture Probes“ (B, in Blau; Roter Kreis: C6 „Spacer“). Unter allen retroviralen Genen ist das im *pol*-Abschnitt kodierte RT Gen die am besten konservierte Region aller Retroviren. Die MOP Primer liegen in den beiden Aminosäuremotifen VLPQG und YM/VDD, wobei der „reverse“ Primer mit Cy3 (A, gelber Kreis) markiert ist. Für die Bestätigung der Microarrayergebnisse mittels qRT-PCR (vgl. 2.1.2.5) wurde in der Regel ein Primer aus dem Bereich der „Capture Probes“ (C, in Gelb) verwendet und mit einem etwa 150 Basen entfernten Primer „up- oder downstream“ kombiniert [Verändert nach (Seifarth *et al.* 2009)].

Spotten der „Capture Probes“

Zur Herstellung der Microarrays wurden silylierte CSS-100 Objektträger (Silane mit Aldehydgruppen) verwendet. Mit dem GMS 417 Arrayer wurden die Oligonukleotide mit drei „Hits pro Dot“ nach dem in Abb. 10 gezeigten Muster auf den Objektträger gespottet. Hierfür wurden die zuvor gelösten Oligonukleotide (je 34 μ l) zusammen mit 12 μ l 20x SSC in eine 384-Well Platte pipettiert. Aufgetragene „Capture-Probes“ bilden durch Interaktion von primären Aminogruppen mit der Objektträger-Oberfläche kovalente Bindungen aus und werden somit fixiert. Jeder Array wurde als Triplikat auf Objektträger gespottet. Nach dem Spotten wurden die Objektträger für 2-4 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend mindestens 14 h im Dunklen getrocknet.

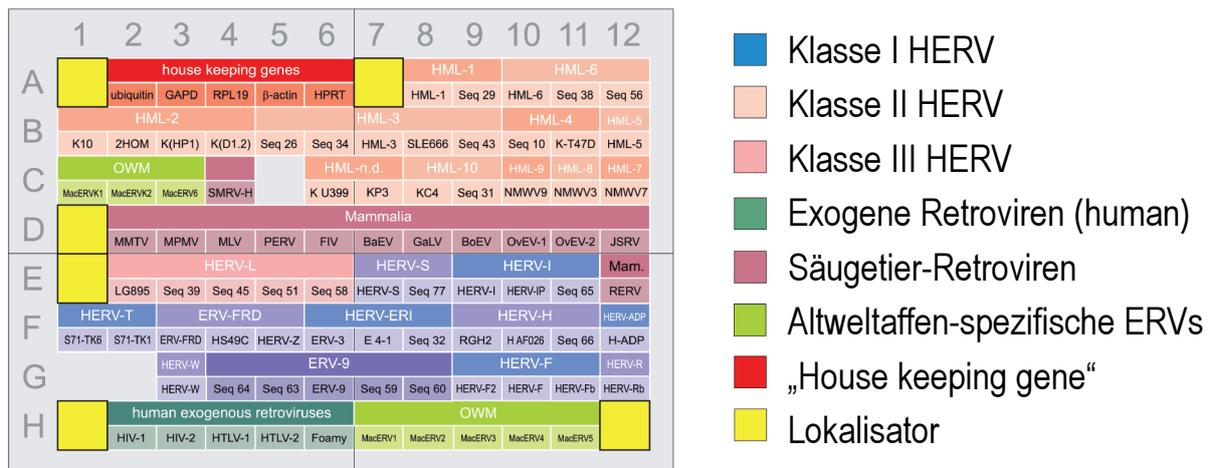


Abb. 10: Anordnung der Retrovirus- und Gen-spezifischen Oligonukleotide auf einem Microarray. Die Kombination aus Buchstabe und Zahl beschreibt die genaue Position jeder HERV-Gruppe. Jeder Array wurde als Triplikat auf Objektträger gespottet. Die Lokalisationspunkte (Farbstoffmarker) sind gelb gekennzeichnet und erleichtern die Orientierung beim Scannen der Hybridisierungsmuster [Verändert nach (Seifarth *et al.* 2009)].

Nachbehandeln der Microarrays

Zuerst wurden die „Slides“ mit 0,2% SDS 2 min und dann zweimal je 1 min in MilliQ Wasser unter heftigem Schütteln gewaschen. Um überschüssige Bindungsstellen auf dem aldehydaktivierten Objektträger zu inaktivieren, wurden die Objektträger genau 5 min in frisch angesetzter NaBH_4^- Lösung reduziert und leicht geklopft, um das Festsetzen von Luftblasen zu verhindern. Anschließend folgten 3 weitere Waschschrte mit 0,2% SDS (1 min) und MilliQ Wasser (zweimal 2 min). Das Trockenzentrifugieren erfolgte in 50 ml Falcongefäßen 2 min bei 1200 rpm. Die nachbehandelten „Slides“ können bei RT in dunklen und trockenen Räumen circa 5 Monate gelagert werden.

Vorhybridisierung

Vor jedem Experiment wurde eine entsprechende Anzahl nachbehandelter Objektträger 3 h bei 50°C in proteinhaltiger Blockierungslösung inkubiert (Vorhybridisierung, vgl. 2.1.5). Die Zugabe von Protein (BSA) dient dem Blockieren unspezifischer Bindungen und trägt somit zur Verminderung der Hintergrundfluoreszenz bei. Abschließend wurden die Objektträger fünfmal je 10 min in MilliQ Wasser schüttelnd gewaschen und 1 min bei 1200 rpm trocken zentrifugiert.

Qualitätskontrolle mit antisense Kontrolloligonukleotiden

Zur standardisierten Überprüfung der HERV-Chip-Qualität wurde der jeweils erste und letzte Objektträger einer Serie verwendet. Die Probehybridisierung erfolgte mit fünf antisense Kontroll-Oligonukleotiden (MMTV, HML-5, HERV-W, HML-1, 2HOM; 50 pmol/ μl) vgl 2.1.2.3), die eine 5' Cy3 Modifikation aufweisen und komplementär zu den entsprechenden „Capture Probes“ auf dem Objektträger sind. Pro Ansatz wurden je 0,5 μl der Kontroll-Oligonukleotide verwendet, 23 μl Hybridisierungslösung zugegeben und der Ansatz bei 95°C 5 min denaturiert. Anschließend wurden

die Kontroll-Oligonukleotide sofort auf die vorhybridisierten Objektträger appliziert. Die Hybridisierung erfolgte wie unten beschrieben. Nur Chips aus Serien mit runden, gleichmäßigen „Dots“ und gleichmäßigem, dunklen Hintergrund wurden für die späteren cDNA-Hybridisierungen verwendet.

cDNA Amplifikation und Markierung von PCR-Produkten (Multiplex-PCR)

Die Multiplex-PCR beinhaltet eine cDNA-Amplifikation mit Markierung der PCR-Produkte durch eine mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Oligonukleotidprimer-Mischung. Diese Markierung erfolgt am 5'-Ende des "reversen" Primers durch das Fluorochrom Cy3 und ermöglicht später die Visualisierung eines hybridisierten PCR-Produkts. Es wurden drei Primer-Gemische verwendet: Mixed-Oligonukleotid-Primer I (MOP-ABD-Mischung), Mixed-Oligonukleotid-Primer II (MOP-CHA-Mischung) und zur Kontrolle für die RNA-Qualität bzw. aus Gründen der Reproduzierbarkeit die „House-Keeping“-Gen-Mischung HKG (vgl.: 2.1.2.1). Beide MOP-Mischungen stellen Gemische aus hochdegenerierten Primern dar und liegen im *pol*-Bereich in hochkonservierten Sequenzabschnitten (VLPQG und YM/VDD) (Seifarth *et al.* 2000) (Abb. 9A). Das 90 Basenpaar-lange Zwischenstück entspricht den sogenannten „Capture Probes“. Durch die Degeneration der Primer können HERV-Gruppen mit einer Abweichung bis zu 20% erkannt werden. Während die MOP-ABD-Mischung 16 verschiedene Primerpaare enthält und vor allem humane β -retrovirale RT-Sequenzen amplifiziert, enthält die MOP-CHA-Mischung 12 Primerpaare und ermöglicht eine Vervielfältigung von γ -Retroviren, sowie ggf. von Spumaviren und diversen humanen exogenen Retroviren (Seifarth *et al.* 2003).

Der PCR Ansatz für jede Primermischung wurde separat ausgeführt, um eine optimale Amplifikation zu ermöglichen (Seifarth *et al.* 2000). Als optimales PCR System für die Amplifikation von Gehirnzellmaterial stellte sich der KAPA2G Robust PCR Kit (peqlab) heraus, deshalb wurden die MOP-PCR Ansätze strikt nach der darin beschriebenen Anleitung auf Eis durchgeführt.

Im Folgenden ist ein typischer MOP-PCR-Ansatz (KAPA2G Robust PCR Kit) aufgelistet

5x KAPA 2G Puffer A	10 μ l
MgCl ₂	2 μ l
dNTPs (10 mM)	1 μ l
Primer ABD oder CHA	2 μ l
Primer HKG	1 μ l
5x Enhancer 1	10 μ l
25x Enhancer 2	2 μ l
Template cDNA	2 μ l
KAPA2G DNA-Polymerase	0,2 μ l
MilliQ Wasser	ad 50 μ l Gesamtvolumen

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	1,0 min	1 x
Denaturierung	94 °C	0,5 min	3 x
Bindung der Primer (Annealing)	45 °C	3,0 min	
Elongation	72 °C	2,0 min	
Denaturierung	94 °C	0,5 min	30 x
Bindung der Primer (Annealing)	50 °C	2,0 min	
Elongation	72 °C	2,0 min	
Vervollständigung der Elongation	72 °C	7,0 min	
	4 °C	∞	

Nach Beendigung der PCR wurden stets 5 μ l eines jeden Ansatzes auf erfolgreiche Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments durch eine Gelelektrophorese (vgl. 2.2.2.9) überprüft. HERV-Amplifikate ergaben ein Produkt der Länge 125 -150 bp, während HKG-Amplifikate ein Produkt von 250 bp Länge aufwiesen.

Hybridisierung von Microarrays mit Deckglas-Methode

Auf die gespotteten Flächen der vorhybridisierten Objektträger wurden Deckgläser, die an zwei gegenüberliegenden Seiten mit Leisten versehen waren, aufgelegt und mit Fixogum fixiert. Die Cy3-markierten Produkte beider MOP-PCR Ansätze der gleichen Ausgangsprobe wurden vereinigt und unter Zugabe von 9 μ l 3M Na-Acetat (pH 5,2) und 287 μ l 4° kaltem EtOH bei -80°C für 30 min gefällt. Nach 25-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm wurde der Überstand gründlich entfernt und das Pellet bei 37°C getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 23 μ l frisch angesetzter Hybridisierungslösung resuspendiert und 5 min bei RT leicht geschüttelt. Nach 5 minütiger Denaturierung bei 95°C und kurzer Abzentrifugation wurde die Probe sofort unter die Deckglaskammer appliziert und durch Kapillarkräfte verteilt. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden die restlichen zwei Seiten verklebt, mit Parafilm umwickelt und in eine Hybridisierungskammer mit feuchtem Whatman-Papier gelegt. Die Hybridisierung erfolgte ausnahmslos über Nacht bei 42°C in einem Wasserschüttelbad (Abb. 11).

Waschen und Trocknen der hybridisierten Microarray Chips

Zum Waschen der hybridisierten Objektträger wurden drei Waschlösungen mit zunehmender Stringenz unter heftigem Schütteln verwendet (vgl. 2.1.5). Zuerst wurde das Deckglas mit einem Skalpell vorsichtig in 42°C warmer Waschlösung 1 entfernt und anschließend 2 mal je 2 min in mit Waschlösung 1 gefüllten 50 ml Falconröhrchen per Hand geschüttelt. Die gleiche Prozedur wurde je 2 mal 2 min mit Waschlösung 2 und 3 wiederholt. Nach zweimaligem Tauchen in MilliQ Wasser wurden die Objektträger bei 1200 rpm 2 min in 50 ml Röhrchen trocken zentrifugiert.

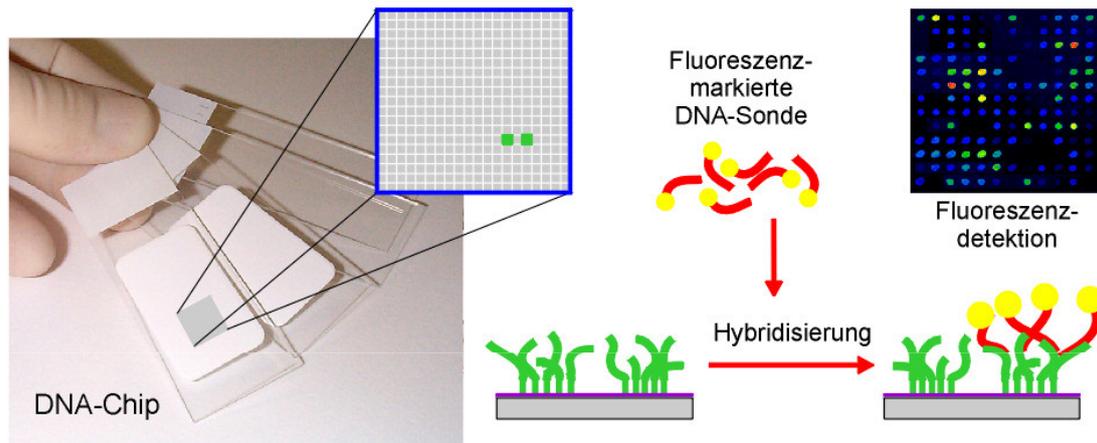


Abb. 11: Schematischer Überblick über die Hybridisierung markierter PCR Produkte auf einem zuvor gespotteten HERV spezifischen Objektträger [Verändert nach Seifarth (unveröffentlicht)].

Scannen und Auswerten

Alle Chips wurden mit dem Affymetrix GMS 418 Array Scanner eingelesen (Laserpower 100%, Gain 50-60) und die registrierte Lichtemission mittels ImaGene Software in ein Falschfarbenbild umgewandelt. Dies ermöglicht eine qualitative und semi-quantitative Auswertung der hybridisierten Microarrays mittels Adobe Photoshop CS3 und Adobe Illustrator CS3.

2.2.2.7 Quantitative Reverse Transkriptase-PCR

Um die Mengen an DNA oder RNA in einer Ausgangsprobe quantitativ zu erfassen, bedient man sich der Methode der quantitativen Reversen Transkriptase-PCR (qRT-PCR) unter Verwendung des Cyaninfluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I. Aufgrund seiner hohen Spezifität für doppelsträngige DNA kann der Amplifikationsverlauf eines Templates über die Zeit durch Messung der Fluoreszenz verfolgt werden. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten verhalten sich proportional zu der entstehenden Menge an Amplifikat und damit auch zur Menge an Ausgangsmaterial. Der berechnete Cp-Wert („crossing point“) gibt den Zyklus an, an dem ein festgelegter Schwellenwert an Produkt erreicht wird. Allgemein gilt, je höher der Cp-Wert, desto weniger Template war im Ausgangsmaterial.

Alle Experimente wurden nach dem Roche Standardprotokoll des LightCycler System 480 I unter Verwendung von LC480 DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostik) durchgeführt. Zur Quantifizierung der einzelnen HERV-Gruppen wurden in der Regel Primer in der *pol*(RT)-Sequenz verwendet. Jeweils ein Primer lag in der gleichen Region wie die „Capture Probes“, die im Retrovirus-spezifischen Microarray verwendet wurden, während der zweite Primer in einer Region 100-150 bp „up- oder downstream“ davon entfernt lokalisiert war (Seifarth *et al.* 2003; Vincendeau, unveröffentlicht). Eine Ausnahme stellte die Quantifizierung der HERV Gruppe HERV-K(HML-2) dar. Aufgrund der Ähnlichkeit im *pol*-Bereich von HERV-K(HML-2) und HERV-K(HML-3) wurden

spezifische Primer aus dem *gag*-Bereich verwendet, da alle getesteten Primer aus dem *pol*-Bereich keine ausreichende Diskriminierung ermöglichten.

Durch die Analyse der Schmelzkurve und das Auftragen der Proben auf ein Agarosegel konnte die spezifische Amplifikation nur eines Produktes nachgewiesen werden. Zur Standardisierung wurde das „House-Keeping“ Gen RNA Polymerase II (RPII) gewählt (Radonic *et al.* 2004). Der errechnete Cp-Wert des „House-Keeping“ Gens wurde später zur Standardisierung der Cp-Werte der einzelnen HERV Proben herangezogen (Δ Cp). Pro Ansatz wurden 19 μ l des folgenden Mastermixes in 96-well Platten vorgelegt und 1 μ l der revers transkribierten RNA (cDNA) oder genomische DNA zugesetzt. Jedes Experiment wurde in Triplikaten aus zwei unabhängigen Präparationen durchgeführt (insgesamt sechs Experimente).

Light Cycler Ansatz und Amplifikationsprogramm

1 μ l	5'-Primer (10 μ M)
1 μ l	3'-Primer (10 μ M)
10 μ l	Roche Master Mix
7 μ l	Roche Light Cycler Wasser
1 μ l	Template

	Temperatur [°C]	Zeit	"Ramp Rate" [°C/s]	Anzahl der Zyklen	Aquisitionsmodus
Initiale Denaturierung	95	10 Min	4,4	1x	keiner
Denaturierung	95	10 sec	4,4	50x	keiner
Annealing	60	5 sec	2,2		keiner
Elongation	72	10 sec	4,4		single
Schmelzkurve	95	1 sec	4,4	1x	keiner
	65	15 sec	2,2		keiner
	95		0,11		kontinuierlich
Kühlung	40	30 sec	2,2	on	keiner

Bei der verwendeten Methode der relativen Quantifizierung handelte es sich um die Berechnung der x-fach höheren relativen HERV-Expression in behandelten Zellen im Vergleich zur relativen HERV-Expression einer unbehandelten Probe, jeweils bezogen auf die Expression eines internen Standards. Als interner Standard diente dabei die Transkriptmenge der RNA-Polymerase II (RPII). Es wurde stets von einer Primereffizienz von 2 ausgegangen. Die Berechnung erfolgt nach der Formel $2^{(-\Delta\Delta C_p)} = 2^{-[(TB-RB)-(TU-RU)]} = 2^{RB} \times 2^{TU} / 2^{TB} \times 2^{RU} = 2^{TU-TB} / 2^{RU-RB}$ nach Livak und Schmittgen (Livak *et al.* 2001) (TB: target behandelt, RB: Referenz behandelt, TU: target unbehandelt, RU: Referenz unbehandelt). Der $\Delta\Delta C_p$ Wert errechnet sich einerseits aus der Differenz des Targets (HERV) von unbehandelt und behandelt, sowie aus der Differenz der Referenz (RPII) von unbehandelt und behandelt. Bei der quantitativen RT-PCR von *postmortem* Proben sowie

zum Nachweis des integrierten HERV-MLV Hybridvektors in MIAPaCa-2 Zellen wurden die Cp-Werte von Target (HERV) und Referenz (RPII) herangezogen und nach Pfaffl *et al.* wie folgt berechnet: $2^{-\Delta C_p} = 2^{-[C_p(RPII) - C_p(target)]} = \text{Ratio}$ (Pfaffl 2001). Die statistische Berechnung bzgl. der Signifikanz erfolgte mittels Student's t-Test unter Verwendung des Signifikanzniveaus von 95% für signifikant und 99% für hochsignifikant.

2.2.2.8 Bisulfit Sequenzierung

Um den Methylierungsstatus einzelner HERV-Loci zu analysieren, wurden 0,5-1,0 μg genomische DNA für das Verfahren der Bisulfit Sequenzierung verwendet. Die Bisulfit-Konvertierung einschließlich Aufreinigung erfolgte mit dem MethylDetector Kit (Active Motif) oder dem Conversion Reagent EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo) mit einer Ausnahme exakt nach Herstellerangaben. Abweichend vom Protokoll des EZ DNA Methylation-Gold Kit wurde bei der Herstellung des CT Conversion Reagent die Inkubationszeit mit heftigem Schütteln von 10 auf mindestens 15 Minuten erhöht. Zur Kontrolle der erfolgreichen Konvertierung wurde stets der im MethylDetector Kit beschriebene optionale Schritt einer „nested PCR“ mit p16 Primern (im Kit enthalten), die nur einen konvertierten DNA Abschnitt amplifizieren können, durchgeführt. Die Detektierung eines PCR Produkts mit einer Länge von 190 Basen mittels Gelelektrophorese zeigte eine gelungene Konvertierung an. Diese wurde nach erfolgreicher Optimierung Locus-spezifischer Primer (Tab vgl. 2.1.2.7) zur Amplifikation einzelner HERV Loci herangezogen, um deren Methylierungsgrad zu untersuchen. Hierfür wurde in zwei aufeinanderfolgenden PCR Ansätzen der Expand High Fidelity Kit (Roche) verwendet, da dieser eine Enzymmischung enthält, die sowohl eine „Proof Reading“ Eigenschaft aufweist als auch eine TA-Klonierung ermöglicht. Als Standardprotokoll wurden folgende „Nested-PCR“ Ansätze zur Amplifikation einzelner Loci verwendet. Die Locus spezifische Primerkombination, sowie die optimale „Annealing“-Temperatur ist in Tab. 3 aufgeführt.

Nested PCR 1	c3_B	c5_A	c7_A	c11_A	c12_A	c22_A	c6_A
"forward" Primer	BIII	c5_A	c7_A	c11_A	c12_A	c22_A	c6_A
"reverse" Primer	RP2	RP2	RP1	RP2	RP2	RP2	RP1
Temperatur [°C]	56,3	59,0	59,0	56,3	56,3	61,2	59,0

Nested PCR 2	c3_B	c5_A	c7_A	c11_A	c12_A	c22_A	c6_A
"forward" Primer	BI	c5_A	c7_A	c11_A	c12_A	c22_A	c6_A
"reverse" Primer	RP2	RP2	RP2	RP2	RP2	RP2	RP2
Temperatur [°C]	56,3	59,0	59,0	56,3	56,3	61,2	59,0

Tab. 3: Locus spezifische Primerkombinationen und optimierte „Annealing“-Temperatur.

Nested PCR 1

MilliQ Wasser
dNTPs (10 mM)
Primer 1
Primer 2
Template (konvertierte DNA)

Mater Mix 1:

18 μ l
1 μ l
1 μ l
1 μ l
4 μ l

Master Mix 2:

19,65 μ l	MilliQ Wasser
5 μ l	Puffer mit $MgCl_2$
0,35 μ l	Polymerase

Nested PCR 2

MilliQ Wasser
dNTPs (10 mM)
Primer 1
Primer 2
Template (Produkt aus PCR 1)

Mater Mix 1:

20 μ l
1 μ l
1 μ l
1 μ l
2 μ l

Master Mix 2:

19,65 μ l	MilliQ Wasser
5 μ l	Puffer mit $MgCl_2$
0,35 μ l	Polymerase

PCR Programm für Methylierungsanalysen

95°C	5 Minuten	Denaturierung der DNA-Matrize	
94°C	30 Sekunden	Denaturierung	
60°C	45 Sekunden	Gradient $G=4^\circ C$; $R=0,3^\circ/s$	25 und 33 Zyklen
72°C	45 Sekunden	Elongation	
72°C	10 Minuten	Vervollständigung der Elongation	
4°C	unbegrenzt	Kühlung	

2.2.2.9 Agarosegelelektrophorese

Mit der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt werden (Sambrook *et al.* 1989). Abhängig von der zu erwartenden Fragmentgröße wurden unterschiedliche Agarosekonzentrationen verwendet. Bei einer Fragmentgröße von 125-150 bp (z.B. MOP-PCR Produkte) wurde ein 2%iges Agarosegel gewählt. Um die DNA-Banden im Gel später unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurden 7 μ l Ethidiumbromid (EtBr)/100 ml Gel hinzupipettiert. Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein und wird bei Bestrahlung mit UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Vor dem Auftragen der Proben wurde 1/6 Volumen an Auftragspuffer zugesetzt. Die Gele wurden in 1x TAE-Laufpuffer gelegt und die Elektrophoresekammer an ein Netzgerät mit 70-100 Volt angeschlossen. Die Fragmentgröße [kb] bzw. die DNA-Menge [ng] wurden anhand eines Längenstandards (2 log Standard) ermittelt. Das Bandenmuster konnte in der ChemiDoc Geldokumentationsanlage mit UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

2.2.2.10 DNA Isolierung aus Agarosegelen

Wurde das gewünschte PCR Produkt für eine weitere Klonierung benötigt, musste das DNA Fragment nach erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel (1,5-2%) aufgereinigt werden. Hierfür wurde den Herstellerangaben entsprechend der Nucleo Spin Extract II Kit verwen-

det und die entsprechenden DNA-Banden so kurz wie möglich dem schädlichen UV-Licht ausgesetzt. Die aufgereinigte DNA wurde in 30 μ l Ampuwa Wasser gelöst.

2.2.2.11 Klonierung von PCR-Fragmenten in den pGEMT-Vektor

Die zu sequenzierenden PCR-Fragmente wurden unter Verwendung des pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) kloniert. Der linearisierte Vektor besitzt einen einzelnen 3'-terminalen Thyminüberhang an beiden Seiten und verbessert somit wesentlich die Effizienz der Ligation mit dem PCR-Fragment, das einen 5'-komplementären Adeninüberhang aufweist. Dies wird durch die Terminaltransferase-Aktivität der in der PCR verwendeten Taq-Polymerase ermöglicht. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert, um eine maximale Anzahl von transformierten Zellen zu erhalten.

2x Rapid Ligation Puffer	5 μ l
pGEMT-T Vector (50 ng)	1 μ l
PCR Produkt (je nach DNA Menge)	1-3 μ l
T4 DNA Ligase (3 U/ μ l)	1 μ l
Ampuwa Wasser	ad 10 μ l Gesamtvolumen

2.2.2.12 Transformation von E.coli-Bakterien mit Plasmid-DNA

Zur Amplifikation von zirkulärer Plasmid-DNA muss nach der Ligation eine Transformation in Bakterien erfolgen. Dafür wurde die chemische Transformation in „JM109 Competent Cells“ (Stratagene) oder „E. coli Competent Cells“ (Promega) gemäß Herstellerprotokoll unter Zugabe von β -Mercaptoethanol (1,42 M) durchgeführt. Zugegeben wurde 3 μ l Ligationsansatz, gefolgt von einem Hitzeschock bei 42°C für 45 s mit sofortiger Abkühlung auf Eis und anschließender Kultivierung der Bakterien mit 400 μ l SOC-Medium. Zuletzt wurden 100 μ l Plasmid-Bakteriensuspension auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Zusätzlich zu dem entsprechenden Resistenz-Antibiotikum (100 μ g/ml Ampicillin) wurde IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid; 20 mM) und X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid; 80 μ g/ml) für die Blau-Weiß Selektion auf die LB-Agarplatten gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Weiße Kolonien wurden am Folgetag mittels „Colony-PCR-Screening“ (Gotaq Polymerase, Promega) auf korrekte „Insert“-Größe überprüft. Plasmid-tragende Einzelkolonien wurden in 3,5 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht in einem 37°C Schüttler (250 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Übernachtskulturen für eine Miniplasmidpräparation verwendet und die „Plasmidinserts“ durch Restriktionverdau überprüft.

Ansatz einer „Colony-PCR“ zum Überprüfen erfolgreicher Insertion

GoTaq Polymerase Reaction Buffer (5x)	5 μ l
dNTPs (10 mM)	0,5 μ l
Primer 1	1 μ l
Primer 2	1 μ l
GoTaq Polymerase (5 U/ μ l)	0,2 μ l
Template	Abstrich einer Einzelkolonie
Ampuwa Wasser	ad 25 μ l Gesamtvolumen

2.2.2.13 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

Die Plasmidminipräparation wurde durchgeführt, um den Klonierungserfolg zu überprüfen. Es wurden je 2 ml Bakterienkultur nach schüttelnder Inkubation über Nacht verwendet, um Plasmid-DNA mit dem Nucleo Spin Plasmid Kit (Macherey Nagel) nach Herstellerangaben zu isolieren. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde mit 40 μ l Ampuwa Wasser eluiert.

2.2.2.14 DNA-Restriktionsverdau

Um die richtige Größe des pGEMT Vektors und dessen Insert zu bestimmen, wurde 0,5-1,0 μ g Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *Sac* I und *Sac* II (3 U) den Herstellerangaben (NEW England Biolab) folgend geschnitten. Die Inkubationszeit betrug jeweils 1 Stunde bei 37°C. Anschließend wurden die entstandenen Fragmentgrößen mit Hilfe der Gelelektrophorese überprüft. Plasmide mit korrekter Insertgröße wurden zum Sequenzieren geschickt.

2.2.2.15 Sequenzierungen

Das Grundprinzip der Sequenzanalyse ist die Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (Sanger *et al.* 1977). Die Sequenzierungsreaktionen wurden von Seq-IT GmbH & Co. KG (Kaiserslautern) ausgeführt.

2.2.2.16 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die ChIP Methode stellt ein Verfahren dar, die Bindung von Proteinen (Histonen) an DNA nachzuweisen. Die DNA gebundenen Proteine werden durch eine Formaldehydfixierung mit der DNA kreuzvernetzt, die DNA durch Sonifizieren fragmentiert und anschließend mit Antikörpern, die spezifisch mit den DNA-bindenden Proteinen reagieren, präzipitiert. Nachdem die Kreuzvernetzung aufgehoben und eine Proteinase-K Behandlung zur Entfernung der Proteine und Aufreinigung der DNA erfolgt ist, können spezifische DNA Sequenzen durch eine qRT-PCR nachgewiesen werden, sofern sie ursprünglich an das präzipitierte Protein gebunden waren.

Um den Chromatin-Status verschiedener HERV-K(HML-2) Loci nach 24 stündiger Behandlung mit VPA im Vergleich zu unbehandelten HNSC.100 Zellen zu untersuchen, wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation unter Verwendung des Imprint Chromatin Immunoprecipitation Kits (Sigma-Aldrich) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für den Zellkernaufschluss und optimales Fragmentieren der DNA durch Sonifizieren mit einem Ultraschall Homogenisator (Bandelin Sonoplus) wurde ein für diese Zellen geeignetes Programm verwendet (50% Leistung, 20 s puls, 30 s Pause, 10x). Der Antikörper gegen acetyliertes Histon 3 (H3Ac) (Millipore) wurde zum Nachweis aktiven Chromatins verwendet. Als Positivkontrolle diente der Antikörper gegen Histon 3 (H3) (Millipore) und als Negativkontrolle der Antikörper gegen Immunglobulin G (IgG) (Sigma-Aldrich). Die Aufreinigung erfolgte über spezielle Säulchen (GenElute Binding Column G). Die präzipitierte DNA wurde in 30 μ l Elutions-Puffer gelöst und mittels qRT-PCR quantifiziert. Hierfür wurden Locus-spezifische Primer eingesetzt (vgl. 2.1.2.6) die zusammen mit den Kontrollprimern GAPDH unter Verwendung des Light Cycler 480 Systems (Roche) eine Analyse des Chromatinstatus einzelner Loci ermöglichten.

2.2.2.17 Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) für Mutationsanalysen/Standard

Individuelle Besonderheiten bei der Amplifikation von DNA Fragmenten als Teil einer komplexeren Methode sind direkt im jeweiligen Methodenabschnitt angegeben. Um zu untersuchen, ob eine reduzierte transkriptionelle Aktivität durch Mutationen im regulatorischen Bereich einer LTR oder in der Reportergensequenz *egfp* eines HERV MLV Hybridvektors verursacht wird, wurde genomische DNA aus kultivierten Zellen isoliert und der entsprechende Abschnitt mit spezifischen Primern amplifiziert. Für dieses Vorhaben war eine fehlerfreie Amplifikation der Sequenz unerlässlich. Deshalb kam erneut der Expand High Fidelity Kit (Roche) zum Einsatz. Als „Template“ wurde 500 ng DNA verwendet.

Im Folgenden ist ein typischer PCR-Reaktionsansatz aufgelistet

500 ng	genomische DNA
5 μ l	PCR-Puffer (10x)
1 μ l	dNTPs (10 mM)
4 μ l	MgCl ₂ (50 mM)
1 μ l	5' Primer (10 μ M)
1 μ l	3' Primer (10 μ M)
0,35 μ l	Polymerase (3,5 U/ μ l)
ad 50 μ l	Ampuwa Wasser

Es wurde folgendes Standard PCR Programm benutzt. Die „Annealing“-Temperatur und Elongationsdauer variierten je nach Schmelzpunkt der individuellen Primer und der Länge des Amplifikats. Außerdem wurde ausnahmslos eine Wasser-Kontrolle durchgeführt.

94°C	5 Minuten	Denaturierung der DNA-Matrize	30 Zyklen
94°C	45 Sekunden	Denaturierung	
+/- 58°C	30 Sekunden	Bindung der Primer (Annealing)	
72°C	1 Min	Elongation (pro 1000 bp)	
72°C	10 Minuten	Vervollständigung der Elongation	
4°C	unbegrenzt	Kühlung	

Die Überprüfung des gewünschten DNA-Fragments erfolgte mittels Gelelektrophorese. Für Sequenzanalysen wurde die entsprechende Bande (800 bp) wie in (vgl. 2.2.2.10) aufgereinigt und in den pGEMT Vektor kloniert (vgl.2.2.2.11).

3. Ergebnisse

3. 1 Einfluss antipsychotischer Medikamente auf die Expression von humanen endogenen Retroviren (HERVs) in menschlichen Gehirnzellen

Schizophrenie ist eine schwere psychische Erkrankung mit einer Prävalenz von einem Prozent weltweit und äußert sich in Störungen der Wahrnehmung, des Denkens und der Affektivität. Bisher ist die Krankheitsursache nicht geklärt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Krankheit durch ein komplexes Zusammenspiel genetischer Einflüsse und umweltbedingter Risikofaktoren entsteht (Fatemi *et al.* 2009). Eine Assoziation mit Virusinfektionen wurde ebenfalls diskutiert (Yolken *et al.* 1995; Yolken *et al.* 2001). Eine erhöhte Anzahl von HERV-Transkripten im Gehirn von Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu Gesunden bestärkt die Annahme, dass auch HERVs eine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen könnten (Karlsson *et al.* 2004; Christensen 2010). Tatsächlich wurden bestimmte HERV-Gruppen, allen voran HERV-W und ERV9, bereits mit Schizophrenie in Verbindung gebracht. Außerdem wurde in früheren Untersuchungen eine Subgruppe von HERV-K(HML-2), HERV-K10, in Patienten mit Schizophrenie und Bipolaren Störungen als signifikant überrepräsentiert gefunden (Frank *et al.* 2005). Allerdings wird die Mehrheit aller Patienten mit psychiatrischen Auffälligkeiten medikamentös behandelt. Einige der Medikamente, die zur Behandlung von Schizophrenie oder Bipolaren Störungen eingesetzt werden, wurden bereits mit epigenetischen Modifikationen assoziiert (Li *et al.* 2004; Dong *et al.* 2008). Im Folgenden wurde untersucht, ob Antipsychotika die allgemeine HERV Expression beeinflussen können und ob die von Frank *et al.* gefundene Überrepräsentation von HERV-K10 möglicherweise eine Folgeerscheinung der verabreichten Medikation ist. Zu diesem Zweck wurden zunächst die Patientendaten der in der oben genannten Untersuchung analysierten Proben (Torrey *et al.* 2000) näher betrachtet und anschließend anhand dieser Daten eine Auswahl antipsychotischer Medikamente in Zellkulturmodellen untersucht.

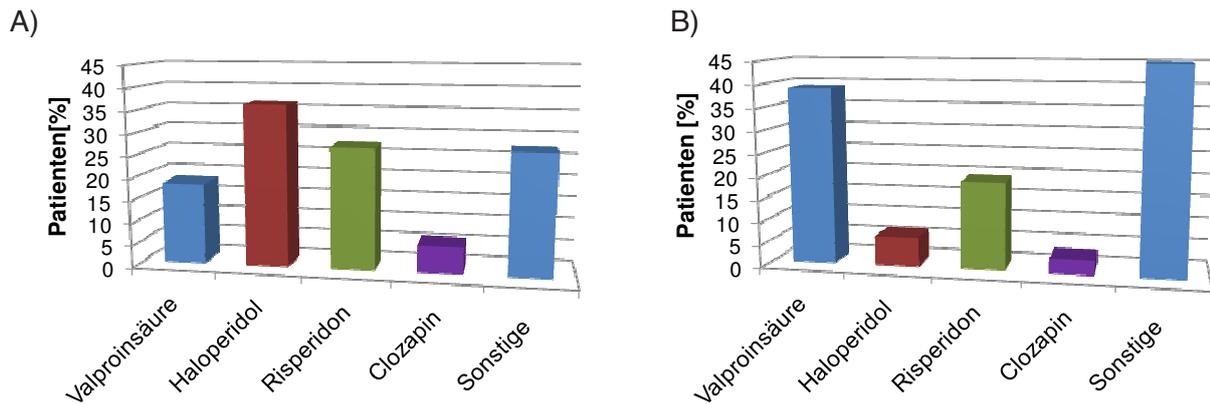


Abb. 12: Zusammenstellung der verabreichten Medikamente bei Patienten mit Schizophrenie (A) oder Bipolaren Störungen (B). Die von Frank *et al.* mittels HERV-spezifischem Microarray analysierten Proben (Frank *et al.* 2005) und die dazugehörigen anonymisierten Patientendaten stammten vom Stanley Medical Research Institute (SMRI), Baltimore, USA. Anhand dieser Daten war eine Aufstellung der verabreichten Medikamente möglich. Die Graphik zeigt den prozentualen Anteil der Patienten, die mit dem jeweiligen Medikament behandelt wurden.

Insgesamt wurden 94% der Schizophrenen und 89% der Patienten mit Bipolaren Störungen medikamentös behandelt (Torrey *et al.* 2000). Wie Abb. 12 zu entnehmen ist, wurden hauptsächlich vier verschiedene Medikamente verabreicht, die daher anschließend im Zellkulturmodellsystem getestet wurden. Während 18,2% aller schizophrenen Patienten mit dem Antiepileptikum Valproinsäure (VPA) behandelt wurden, liegt der Anteil bei Patienten mit Bipolaren Störungen mit 39% deutlich höher. Über 36% der Patienten mit Schizophrenie wurden mit dem typischen Neuroleptikum Haloperidol behandelt, wie auch 6,5% der Patienten mit bipolaren Störungen. Das atypischen Neuroleptikum Risperidon wurde bei fast einem Drittel der Schizophrenen und rund einem Fünftel der Bipolar Gestörten verzeichnet, während ein weiteres Mitglied der atypischen Neuroleptika, Clozapin, mit 6,1% bzw. 3,2% eher selten vertreten war. Weitere Medikamente, die in Einzelfällen verabreicht wurden, wurden als „Sonstige“ zusammengefasst. Aufgrund der Schwere und der Komplexität der Erkrankung bekamen 82,9% der Schizophrenen und 80,0% der Patienten mit Bipolaren Störungen mehrere Medikamente verabreicht.

VPA kann als Histon-deacetylase-Inhibitor nachweislich die Chromatinstruktur modifizieren (Sharma *et al.* 2006) und somit verschiedene Gene inklusive HERVs aktivieren. Ebenso wird vermutet, dass Haloperidol und Clozapin die Genexpression im Gehirngewebe verändern können (Fasulo *et al.* 2003; Takahashi *et al.* 2004). Weitere Untersuchungen belegen, dass Clozapin und VPA möglicherweise synergistische Effekte zeigen und auf die Demethylierung der DNA im Gehirn wirken können (Dong *et al.* 2008). Dies gibt Grund zur Vermutung, dass die HERV-Aktivität möglicherweise durch Medikamente beeinflusst wird, da die Expression von HERVs wie die Expression zellulärer Gene reguliert wird und epigenetische Faktoren wie DNA-Methylierung einen Einfluss haben (Lavie *et al.* 2005; Reiss *et al.* 2007). Diese Frage wurde im Folgenden untersucht.

3.1.1 Zytotoxische Effekte verschiedener Antipsychotika auf Gehirnzellen

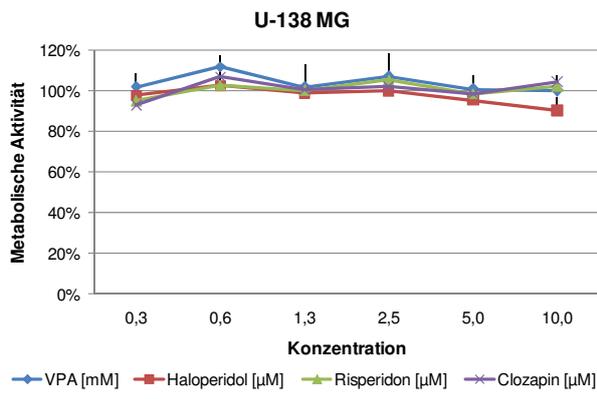
Zunächst wurde vor der Behandlung der Zellen die Zytotoxizität der jeweiligen Medikamente mit Hilfe eines MTT-Tests (Mosmann 1983) geprüft. Der Nachweis der Zellvitalität beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Eine Zellschädigung durch eine zytotoxische Substanz reduziert die Reduktionsrate im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe und kann photometrisch nachgewiesen werden.

Es wurden Konzentrationen des jeweiligen Medikaments gewählt, die im unteren Bereich (0,1 μ M/ 1 mM) in etwa der Konzentration im Serum von Patienten entsprechen (Coryell *et al.* 1998). In Anlehnung an andere Untersuchungen, die mit Zellkulturen durchgeführt wurden, wurde dieser Bereich bis auf 10 mM VPA bzw. 10 μ M Haloperidol, Risperidon und Clozapin ausgedehnt (Dragunow *et al.* 2006; Ferno *et al.* 2006; Das *et al.* 2007).

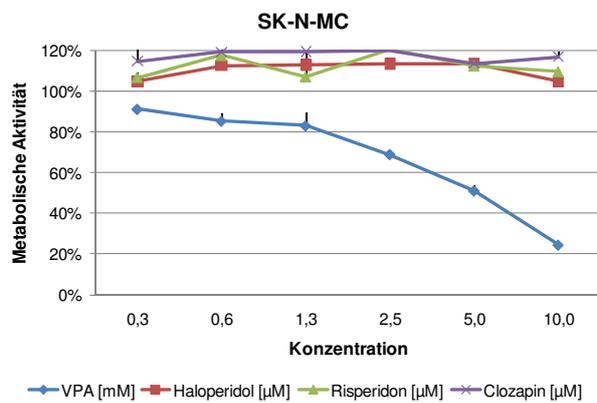
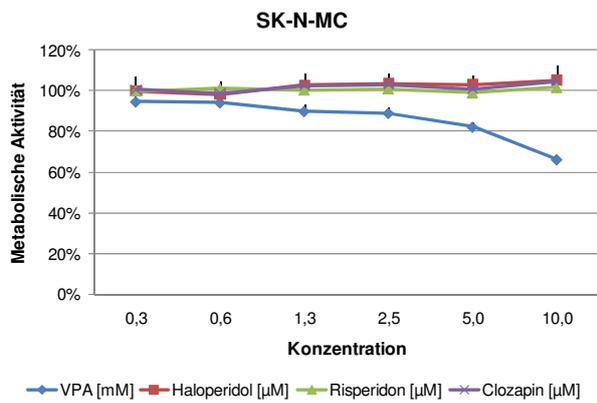
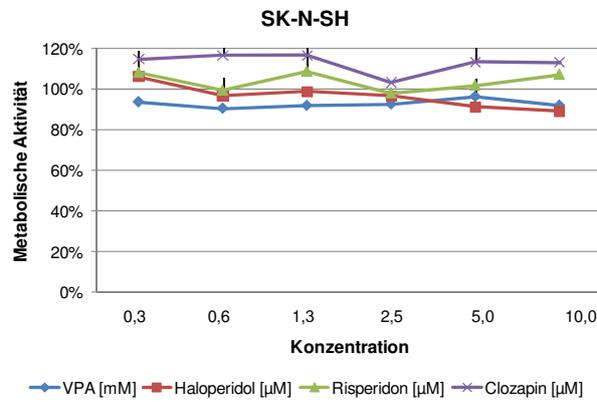
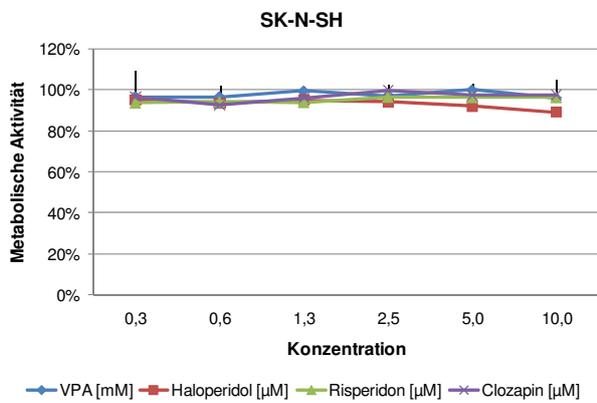
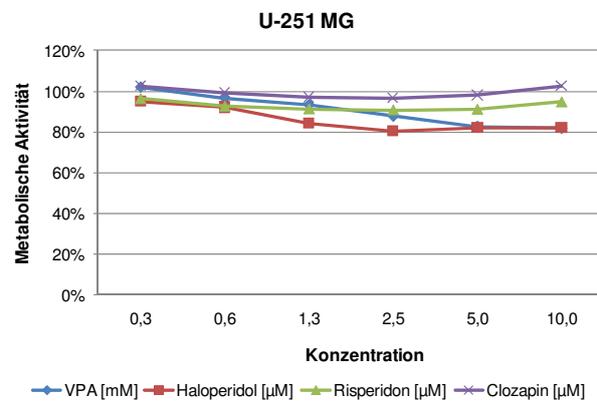
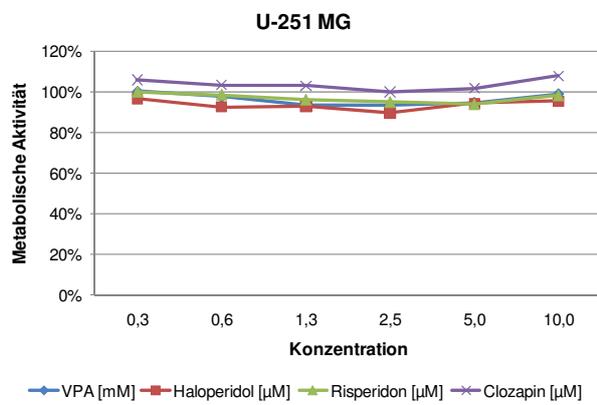
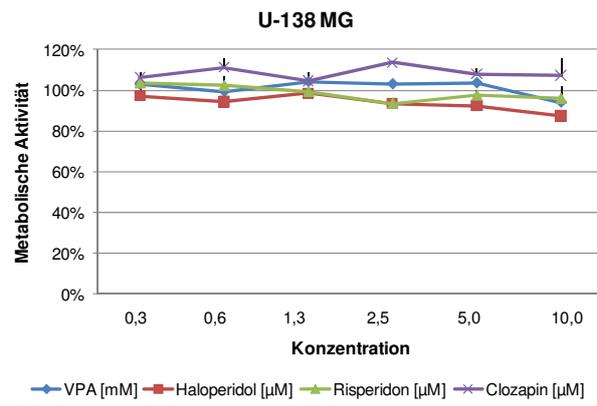
Es wurden zwei Glioblastom-Zelllinien (U-138MG und U-251MG), zwei Neuroblastom-Zelllinien (SK-N-SH und SK-N-MC) und die humane neurale Stammzelllinie HNSC.100 verwendet. Jede Zelllinie wurde mit ansteigenden Konzentrationen (0,3 bis 10 μ M) der Medikamente Haloperidol, Risperidon und Clozapin, sowie mit 0,3 bis 10 mM VPA 24 h (Abb. 13A) bzw. 48 Stunden (Abb. 13B) inkubiert. Die Zelllinie U-251MG wurde zusätzlich noch 72 h mit VPA behandelt (Abb. 13C). Bei einer Zellvitalität von unter 80% im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurde die Konzentration eines Medikaments als zytotoxisch eingestuft und nicht im Zellkulturmodell verwendet.

Alle Zelllinien zeigten sowohl bei 24- als auch bei 48-stündiger Inkubation mit Haloperidol, Risperidon und Clozapin keine signifikante Beeinträchtigung der Zellvitalität. Dies gilt auch für alle VPA-Behandlungen nach 24 h bzw. 48 h mit einer Ausnahme. SK-N-MC Zellen zeigten nach 24 h Inkubation mit VPA einen leichten und nach 48 Stunden einen deutlichen Rückgang der Zellvitalität um bis zu 80% im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Um vergleichbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurde bei allen Zellen die Behandlung für 24 Stunden durchgeführt. Eine Ausnahme stellte die Zelllinie U-251MG dar, die aufgrund ihrer Widerstandsfähigkeit verwendet wurde, um den Einfluss von VPA auf die HERV Expression auch nach einem längeren Zeitraum von 72 h zu testen.

A)



B)



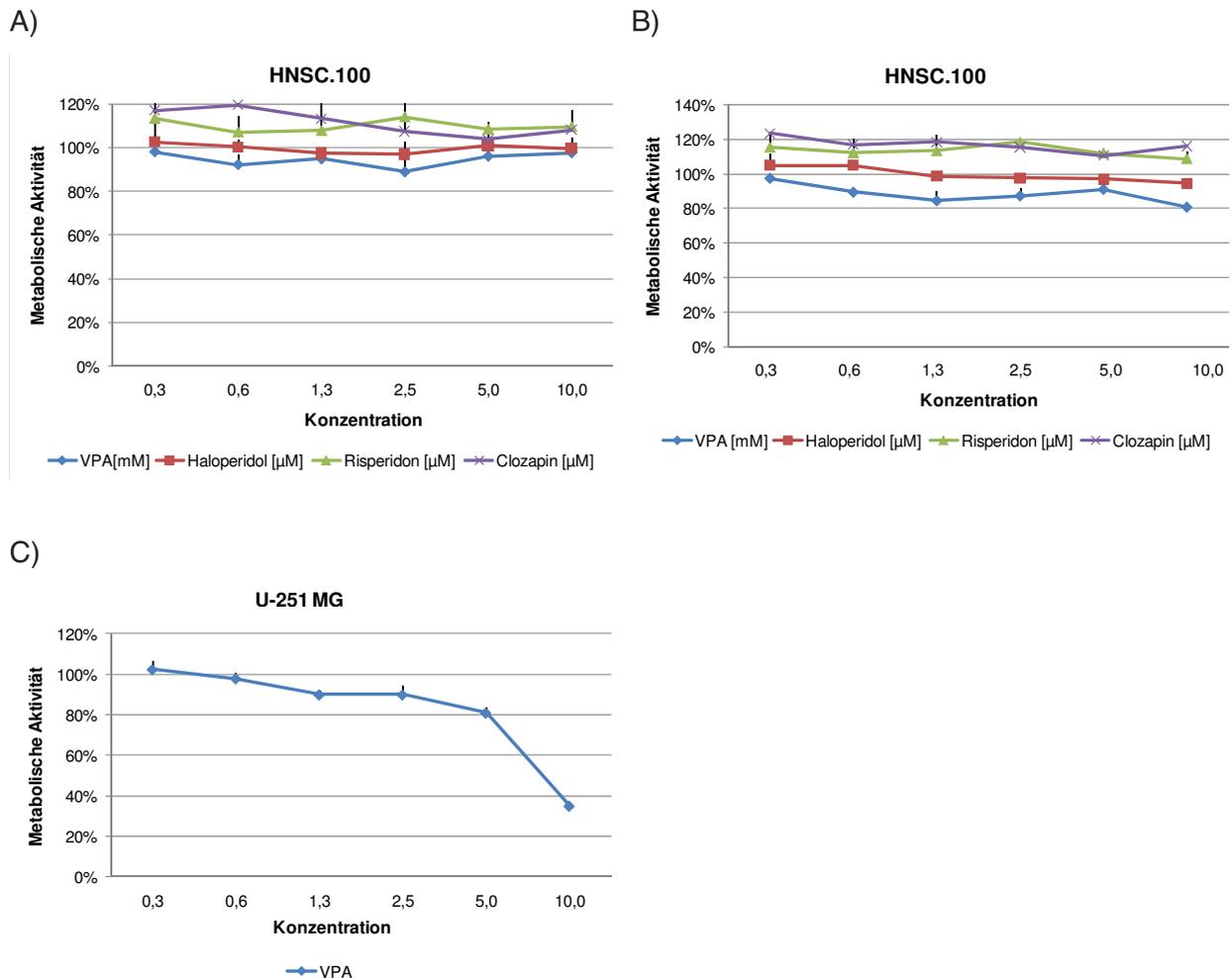


Abb. 13: Untersuchung der Verträglichkeit verschiedener Medikamente in zwei Glioblastom-Zelllinien (U-138MG und U-251MG), zwei Neuroblastom-Zelllinien (SK-N-SH und SK-N-MC) und der humanen neuronalen Stammzelllinie HNSC.100 mittels MTT Test. Die Zellen wurden 24 Stunden (A) oder 48 h (B) mit unterschiedlichen Konzentrationen von VPA [mM], Haloperidol [μ M], Risperidon [μ M] oder Clozapin [μ M] behandelt. Die Zelllinie U-251MG wurde zusätzlich noch 72 h mit VPA inkubiert (C). Alle Messdaten wurden auf die entsprechenden unbehandelten Kontrollzellen normiert (100%). Ein zytotoxischer Effekt wurde ab einer Zellvitalität von unter 80% festgelegt.

3.1.2 HERV-Transkriptionsprofil von unbehandelten Gehirnzellen – der HERV-spezifische Microarray

Um einen umfassenden Überblick über das HERV-Transkriptionsprofil in verschiedenen Gehirnzellen zu bekommen, wurde der von Seifarth *et al.* entwickelte Retrovirus-spezifische Microarray verwendet (Seifarth *et al.* 2003). Dieses Verfahren kombiniert eine Multiplex-PCR unter Verwendung Fluorochrom (Cy3)-modifizierter Primermischungen mit einer DNA-Chip-Hybridisierung auf aldehydbeschichteten Glasobjektträgern. Die Sequenzen der PCR-Primer wurden von zwei hochkonservierten Aminosäuremotifen abgeleitet, die üblicherweise in allen retroviralen RT-Genen im

pol-Bereich gefunden werden (Shih *et al.* 1989; Seifarth *et al.* 1998). Eine Diskriminierung zwischen verschiedenen HERV-Gruppen wird durch die zwischen den Primern liegenden internen Sequenzen erzielt, die an spezifische, auf Glasobjektträger gedruckte Oligonukleotide binden (vgl. 2.2.2.6). Der Retrovirus-spezifische Microarray beinhaltet 52 Vertreter von 21 HERV-Gruppen aller drei HERV-Klassen. Das menschliche Genom enthält 3149 Proviren mit nahezu vollständigem *pol* Gen (Jern *et al.* 2005). Manche HERV Gruppen lassen sich in Subgruppen unterteilen, da sie sich im *pol*-Bereich ausreichend unterscheiden (Nukleotidsequenzidentität $\leq 80\%$) und deshalb eine Diskriminierung ermöglicht wird. Abhängig von der HERV Gruppe kann jede auf dem Glasobjektträger gedruckte Sequenz weniger als 10 bis mehrere 100 Proviren repräsentieren (Sperber *et al.* 2007; Seifarth 2009).

Zur Etablierung eines geeigneten Modellsystems für die Untersuchung der HERV Expressionsunterschiede nach Behandlung mit Medikamenten musste zunächst das HERV-Transkriptionsprofil unbehandelter Gehirnzellen analysiert werden. Um eine verlässliche Aussage treffen zu können, wurde ein möglichst breites Spektrum verschiedener Zelltypen analysiert. Es wurden die Glioblastom-Zelllinien U-138MG, U-251MG, U-373MG und 85HG66, die Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und SK-N-MC, sowie die humane neurale Stammzelllinie HNSC.100 verwendet. Zusätzlich wurden primäre neurale Gehirnzellen (ANBC) aus der Biopsieprobe eines Epileptikers getestet (Institut für Neuropathologie, Uniklinikum Erlangen). Die RNA der behandelten Zellen wurde isoliert, zur Eliminierung von DNA-Kontaminationen mit DNase verdaut und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Nachdem die HERV-Transkripte in einer Multiplex (MOP) PCR amplifiziert worden waren, wurden die Amplifikate gefällt und mit einem Retrovirus-spezifischen Microarray hybridisiert (vgl. 2.2.2.6). Abb. 14 zeigt eine repräsentative Auswahl mehrfach reproduzierter Microarrayexperimente. Die Ergebnisse sind in Falschfarben dargestellt (siehe Farbskala Abb. 14 unten). Das „Housekeeping“-Gen HPRT diente stets als interne Kontrolle der RNA-Qualität.

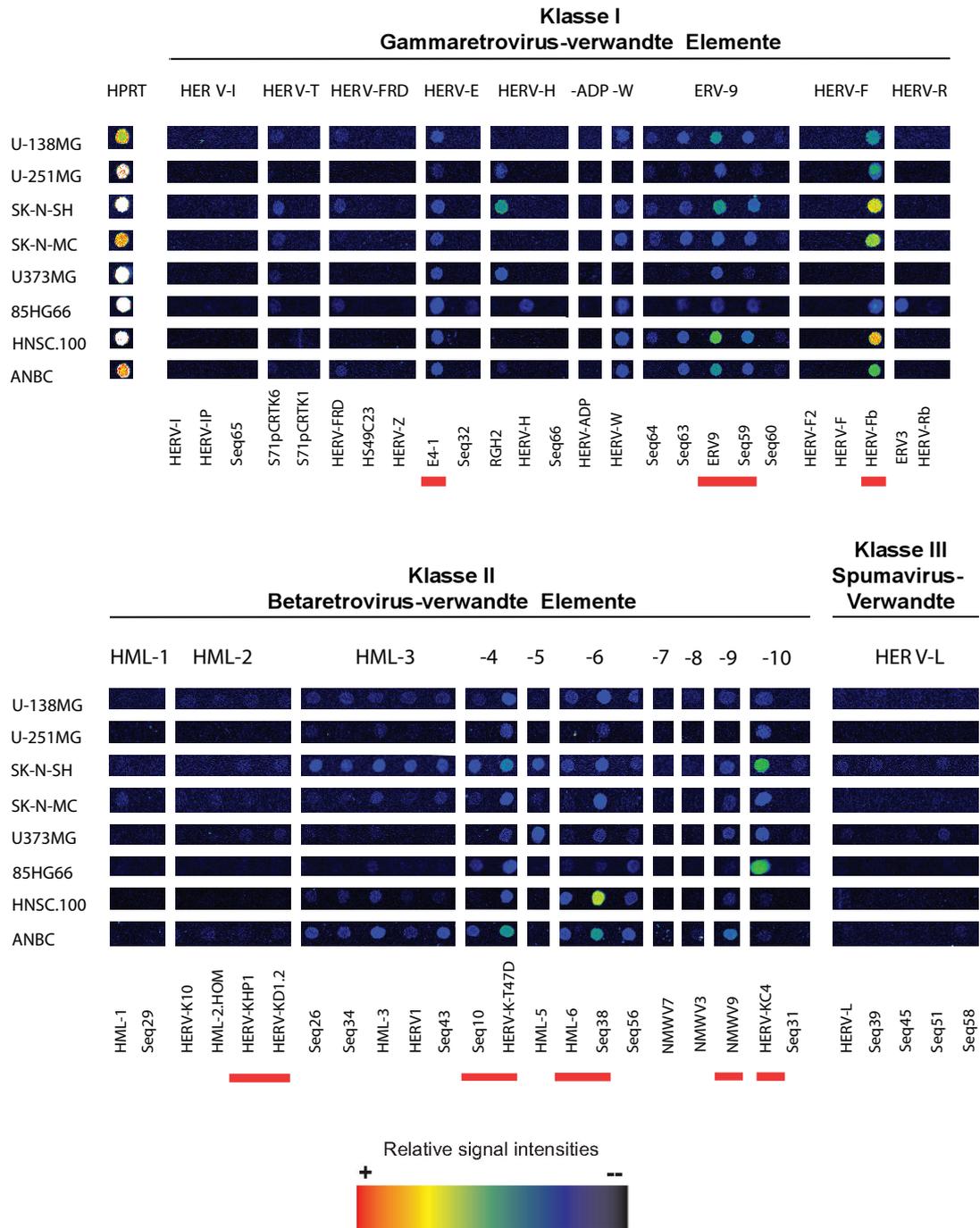


Abb.: 14 HERV-Transkriptionsprofil in unbehandelten Gehirnzellen. Es wurden die Glioblastom-Zelllinien U-138MG, U-251MG, U-373MG und 85HG66, zwei Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und SK-N-MC, sowie die humane neurale Stammzelllinie HNSC.100 und die primären neuronalen Gehirnzellen ANBC untersucht. Die HERV Expressionsmuster wurden mit Hilfe eines Retrovirus-spezifischen Microarrays ermittelt (Seifarth *et al.* 2003). Als interne Kontrolle für die RNA-Qualität diente das „Housekeeping“-Gen Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT). Rote Balken markieren die Gehirn-spezifische „Core-Aktivität“ nach Frank *et al.* 2005.

Übereinstimmend waren in allen Zelllinien die HERV Gruppen HERV-I, HERV-ADP, HML-7 und HML-8, sowie mit jeweils einer Ausnahme auch HERV-R und HML-1 inaktiv. Verglichen mit dem von Frank *et al.* 2005 ermittelten Gehirn-spezifische Expressionsprofil (rote Kästchen) (Frank *et al.* 2005), wurde eine ubiquitäre Expression der Klasse I HERVs E(4-1)(HERV-E), ERV-9 und Seq59(ERV9), HERV-Fb(HERV-F) sowie der Klasse II HERVs HERV-KT47D(HML-4), HML-6, HML-9 und HERV-KC4(HML-10) in beinahe allen Gehirnzellen nachgewiesen. Eine schwache Expression von HERV-KHP1 und HERV-KD1.2 (HML-2) wurde in nur fünf Fällen gemessen. In allen anderen Fällen waren Elemente der HERV-K(HML-2) Gruppe nicht zu detektieren. Weiterhin wurden einige differentiell aktive HERVs identifiziert, deren Transkripte mit unterschiedlicher Häufigkeit in den Gehirnzellen vorkommen. Diese Transkripte stammten von den Klasse I HERVs HERV-T, HERV-FRD, HERV-H und HERV-W, sowie von den Klasse II HERVs HML-3 und HML-5. Eine sehr schwache Expression von HERV-L wurde ausschließlich in SK-N-SH und U-373MG beobachtet. Insgesamt ähneln sich die Expressionsmuster von U-138MG, SK-N-SH, SK-N-MC, 85HG66 und ANBC, obwohl die Zelllinien von unterschiedlichen Zelltypen des Gehirns stammen. Im Vergleich etwas schwächer exprimiert werden manche HERV-Gruppen lediglich in U-251MG und HNSC.100 Zellen. Das Gehirn-spezifische Expressionsprofil war in allen Gehirnzellen deutlich zu erkennen. Deshalb sollten sich die getesteten Zelllinien sehr gut als Modellsystem eignen, um Medikamenten-bedingte Unterschiede im HERV-Aktivitätsmuster zu messen. Da teils doch geringe Unterschiede (wie zum Beispiel in der HML-3 Expression) zwischen den Zelltypen vorliegen, wurden für weitere Experimente von jedem Zelltyp ein oder zwei repräsentative Vertreter ausgewählt. Deshalb wurden die Zelllinien U-138MG, U-251MG als repräsentative Vertreter der Glioblastom-Zelllinien, SK-N-SH und SK-N-MC als Vertreter der Neuroblastom-Zelllinien und HNSC.100 ausgesucht. Außerdem zeigen ANBC Zellen als Vertreter einer Primärkultur Eigenschaften, die im Vergleich zu Tumorzelllinien näher am Gehirn liegen.

3.1.3 Qualitative Analyse des HERV-Transkriptionsprofils in verschiedenen Gehirnzellen nach Behandlung mit Antidepressiva oder Neuroleptika mittels Retrovirus-spezifischem Microarrays

Anhand der Zelllinien als Modellsystem und mit Hilfe des Retrovirus-spezifischen Microarrays war es erstmals möglich, den Einfluss antipsychotischer Medikamente auf die HERV Aktivität in verschiedenen Gehirnzellen unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen und die involvierten HERV-Gruppen und –Subgruppen zu identifizieren. Die Behandlung der Zellen mit den Medikamenten wurde gemäß dem Standardprotokoll in jeweils zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Eine repräsentative Auswahl der digital prozessierten Alignments einer jeden unabhängigen Behandlung ist in Abb. 15 und 16 zu finden.

Um den Einfluss von VPA zu testen, wurden sowohl die Zelllinien U-138MG, SK-N-SH, SK-N-MC und HNSC.100 24 h als auch die primären Zellen ANBC 24 h mit 1 und 5 mM VPA behandelt. Um auch den Einfluss von VPA auf die HERV Expression nach einem längeren Zeitraum zu untersuchen, wurden die Zellen U-251MG 72 h mit VPA-haltigem Medium kultiviert. Da aufgrund von va-

riierenden Zellkulturbedingungen das HERV Expressionsmuster geringfügig variieren kann (Brorson *et al.* 2002; Seifarth *et al.* 2009), wurden stets unbehandelte Proben der gleichen Zellcharge parallel hybridisiert.

In allen Zelllinien konnte in Abhängigkeit von der Medikamentenkonzentration eine teils deutlich erhöhte Expression einzelner HERVs gemessen werden. Dies betraf sowohl Vertreter der Gamaretrovirus-verwandten Elemente (Klasse I), als auch Vertreter der Betaretrovirus-verwandten Elemente (Klasse II). In den Zelllinien U-251MG, SK-N-SH und SN-N-MC konnte auch eine schwache Aktivierung von HERV-L als Vertreter der Spumavirus-verwandten Elemente nachgewiesen werden.

In beiden Glioblastom-Zelllinien U-138MG und U-251MG konnte eine Dosis-abhängige Expression der Klasse I HERVs E4-1(HERV-E), HERV-W, ERV9(ERV9), Seq59(ERV9), sowie Klasse II HERVs HML-3, HML-4, Seq38(HML-6), und HERV-KC4(HML-10) beobachtet werden (Abb.15). Während in U-138MG zusätzlich eine Aktivierung von HERV-Fb(HERV-F) auffiel, konnte diese HERV Subgruppe weder bei behandelten noch bei unbehandelten U-251MG Zellen gefunden werden. Eine leichte VPA-bedingte Erhöhung der Expression zeigte sich in U-251MG Zellen bei HERV-T.

Eine erhöhte Expression in Abhängigkeit der VPA Konzentration konnte auch in beiden Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und SK-N-MC für die Elemente RGH2 (HERV-H), ERV9, HERV-Fb (HERV-F), HML-3, HML-9 und HERV-KC4 (HML-10) ermittelt werden. In beiden Zelllinien wurden jedoch E4-1, HERV-W, HML-4 unabhängig von der VPA Konzentration auf gleichem Niveau exprimiert. In SK-N-MC war nach 5 mM VPA Behandlung zusätzlich eine Aktivierung von Seq59 (ERV9) und nach 1 mM VPA eine Aktivierung von Seq38 (HML-6) in SK-N-MC und von HML-5 in SK-N-SH Zellen zu sehen.

Die stärkste Aktivierung der Transkription von HERV-W, sowie Seq63, ERV9 und Seq59 (drei Subgruppen der ERV9-Gruppe) erfolgte in HNSC.100 Zellen. Eine erhöhte Expression von E4-1 und HML-3 wurde nach Behandlung mit 1 mM VPA erreicht. HERV-Fb und Seq38 (HML-6) wurden unabhängig von der VPA Konzentration stark exprimiert.

Das „Housekeeping“ Gene HPRT ergab bei allen Experimenten konsistente Signale und spiegelt somit die gleichbleibende Qualität der RNA Proben und die Reproduzierbarkeit der Chip-Daten wieder. Dies ließen auch die Ergebnisse der Behandlung von ANBCs mit 1 mM VPA schließen. Allerdings konnte in diesem Fall bei 5 mM VPA ein deutlich schwächeres Signal des „Housekeeping“ Gens gemessen werden, das auf die Toxizität des Medikaments zurückgeführt werden könnte. Aufgrund der sehr begrenzten Teilungsfähigkeit der primären Zellen konnte trotz wiederholter Bemühungen kein MTT Test durchgeführt werden. Im Allgemeinen war ein geringer Rückgang der Expression der meisten HERVs bei einer VPA Konzentration von 5 mM zu verzeichnen. So waren z. B. ERV9, HML-3, HML-4 und HML-6 bei 5 mM VPA weniger aktiv als bei 1 mM VPA. Die Transkriptionsaktivität von HERV-Fb und HERV-KC4 war jedoch trotzdem leicht erhöht.

Alle übrigen HERV Gruppen auf dem DNA-Chip (Klasse I HERV-I, HERV-FRD, HERV-ADP, HERV-R, sowie Klasse II HML-1, HML-2, HML-7 und HML-8) wurden von VPA nicht beeinflusst.

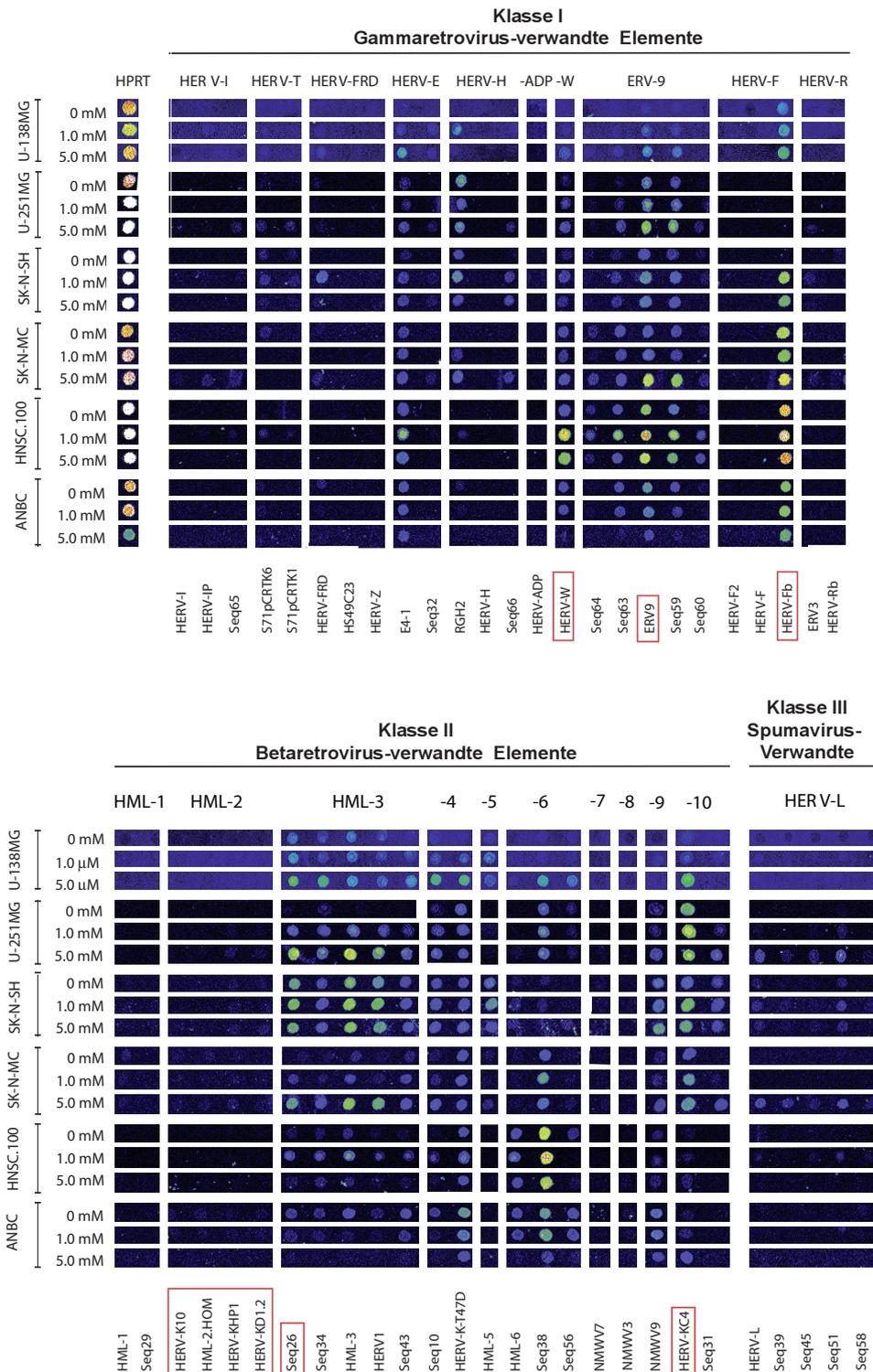


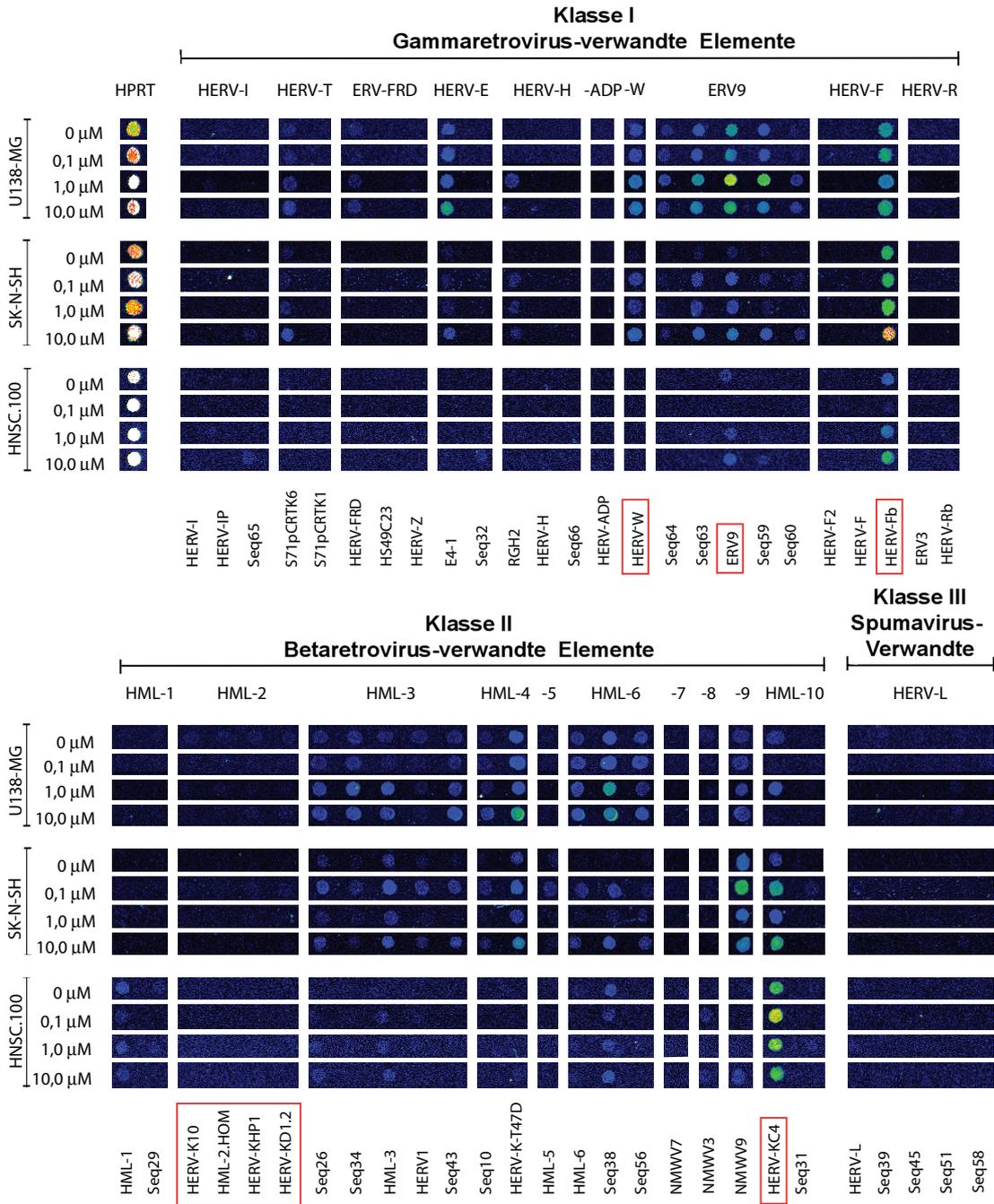
Abb. 15 Transkriptionsprofil von 52 HERV Subgruppen in verschiedenen Gehirnzellen nach VPA-Behandlung. Die Glioblastom-Zelllinie U-138MG, zwei Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH, SK-N-MC, die humane neurale Stammzelllinie HNSC.100 und die primären neuronalen Gehirnzellen (ANBC) wurden mit 1 und 5 mM 24 h bzw. eine weitere Glioblastom-Zelllinie U-251MG 72 h behandelt. Die HERV Expressionsmuster wurden mit Hilfe eines Retrovirus-spezifischen Microarrays ermittelt (Seifarth *et al.*, 2003). Als interne Kontrolle für die RNA-Qualität diente das „Housekeeping“-Gen HPRT. Rot umrahmt sind HERV Subgruppen, die für eine Quantifizierung mittels qRT-PCR ausgewählt wurden (vgl. 3.1.4).

Sechs HERV(Sub-)Gruppen wurden ausgewählt (Abb. 15, rot umrahmt), um die Steigerung der Transkription in Abhängigkeit der VPA Konzentration mit einer alternativen Methode zu verifizieren und zu quantifizieren (vgl. 3.1.4). Ausgewählt wurden HERV Elemente, die im Microarray eine signifikante Aktivierung zeigten oder nicht aktiviert wurden, aber in früheren Untersuchungen in engen Zusammenhang mit einer Erkrankung gebracht worden waren.

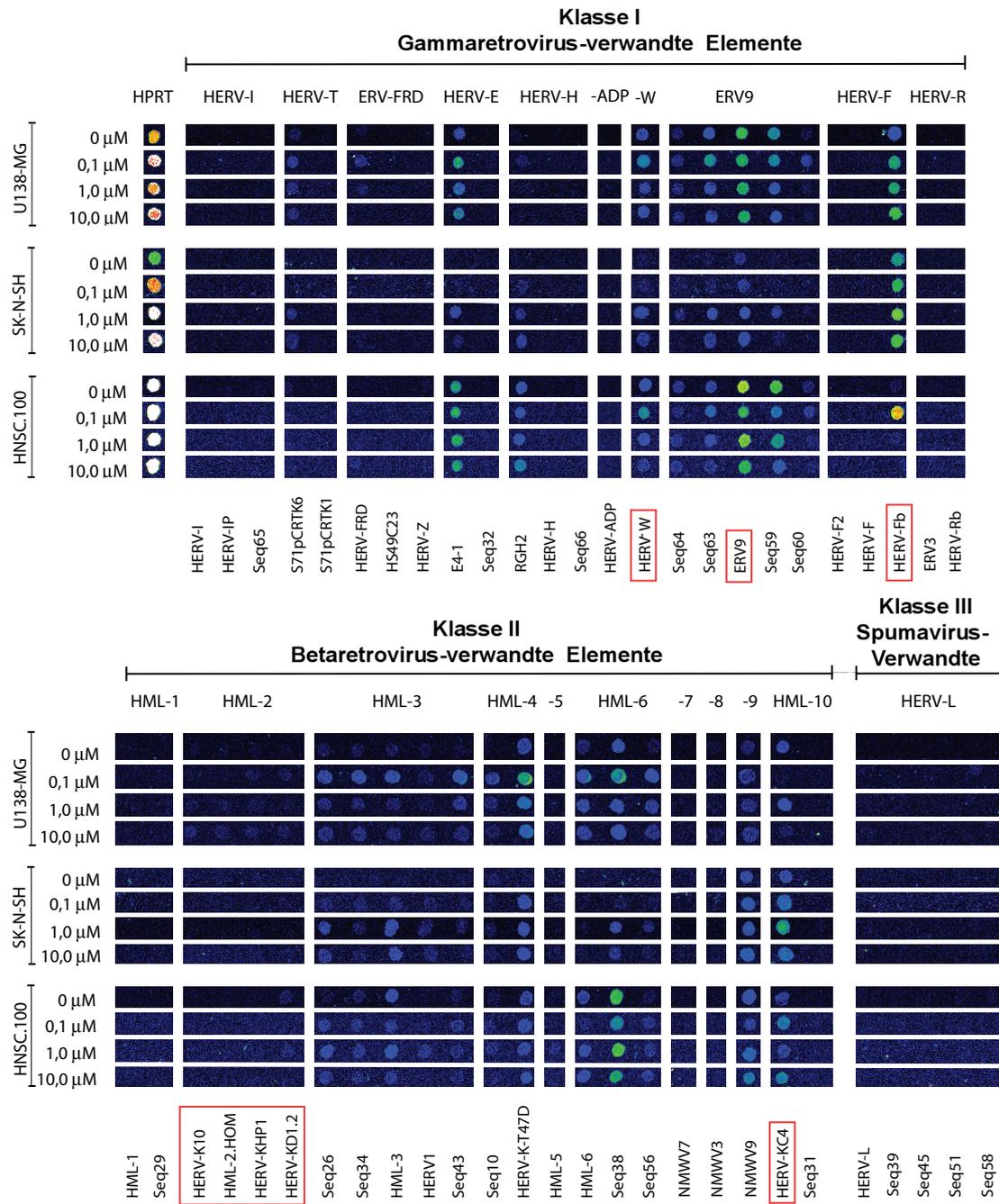
Im Vergleich zu VPA hatte Haloperidol einen deutlich geringeren Effekt auf die Aktivierung einzelner HERV Gruppen in den untersuchten Zelllinien U-138MG, SK-N-SH und HNSC.100 (Abb. 16A). Haloperidol bewirkte in U-138MG Zellen die Aktivierung mehrerer HERV Gruppen. Eine erhöhte Expression war bei HERV-E4-1, HERV-W, ERV9, HML-4 und HML-6 zu erkennen. Eine gleichbleibend schwache Expression zeigten HERV-T, HERV-FRD, HERV-Fb, HML-3 und HML-9. Die Behandlung von SK-N-SH Zellen hatte eine schwache Expressionssteigerung von HERV-W, ERV9, HML-4, HML-9 und HERV-KC4 zur Folge. Die einzige Ausnahme mit einer starken Aktivierung in Abhängigkeit der Haloperidol-Konzentration war HERV-Fb. In HNSC.100 Zellen konnte keine signifikante Aktivierung von HERVs bewirkt werden. Eine leicht erhöhte Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen war lediglich für HERV-Fb und HERV-KC4 zu verzeichnen. Eine transkriptionelle Aktivität von HERV-I, HERV-ADP und HERV-R, HML-2, HML-7, HML-8 und HERV-L wurde in keiner der behandelten Zelllinien gemessen.

Im Vergleich zu Haloperidol zeigte Risperidon einen noch geringeren Effekt auf die HERV-Expression (Abb. 16B). Es war eine leichte Aktivierung von HERV-E4-1, HERV-Fb, HML-4 und HML-6 in Abhängigkeit der Risperidon-Konzentration in U-138MG Zellen zu sehen. Eine Expressionssteigerung von HERV-KC4 konnte in SK-N-SH Zellen verzeichnet werden. Außer HERV-H, HERV-Fb, HML-9 und HERV-KC4 wurde keine HERV (Sub-)Gruppe in HNSC.100 Zellen aktiviert. Clozapin bewirkte eine leichte Expressionssteigerung von ERV9 und HERV-Fb in U-138MG Zellen (Abb. 16C). Während keine Erhöhung der Transkription in SK-N-SH Zellen gemessen wurde, wurde eine Verminderung der Expression bei HERV-Fb, Seq38 und HERV-KC4 in HNSC.100 Zellen festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde HML-3 aktiviert.

A)



B)



C)

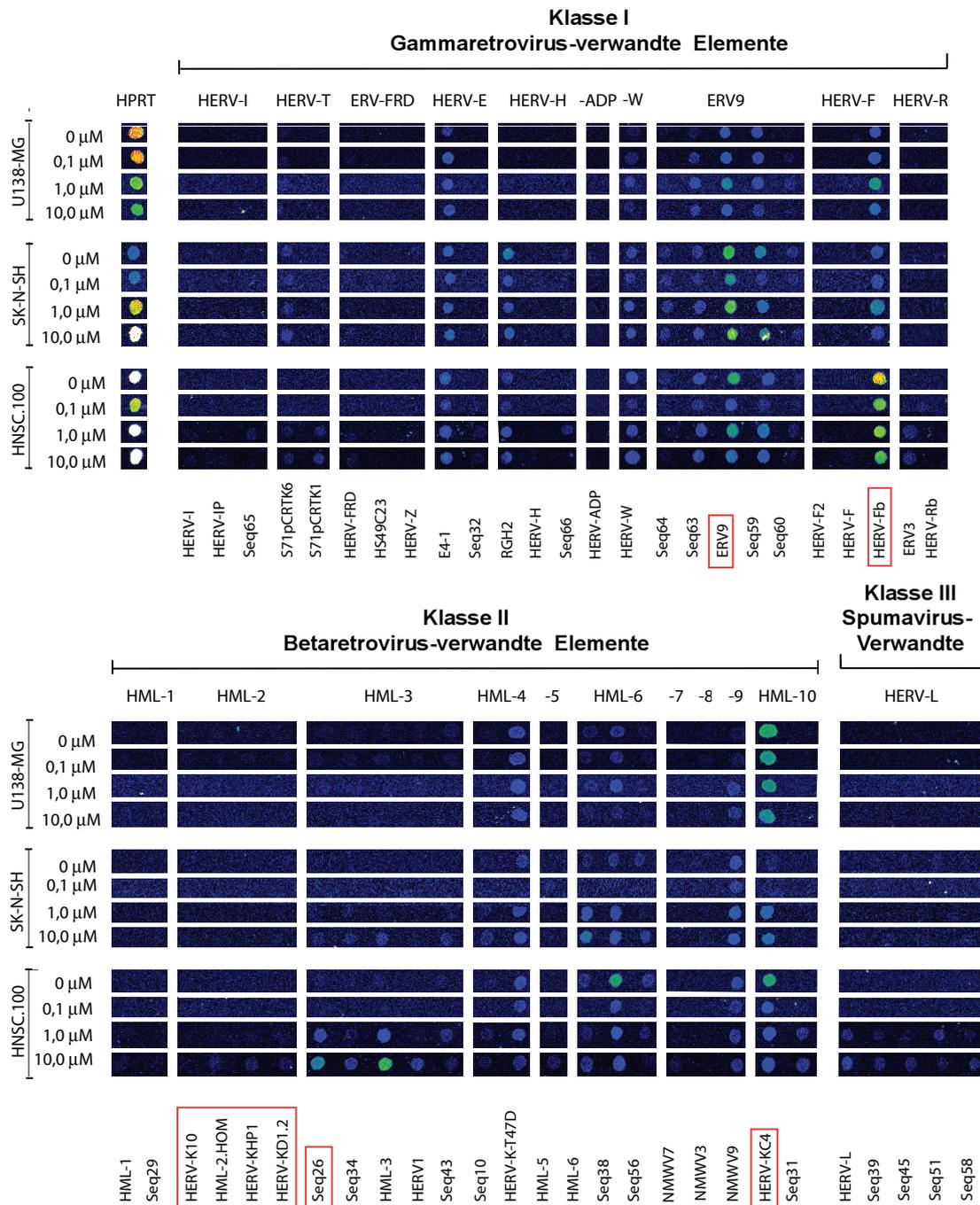


Abb. 16 A-C). Transkriptionsprofil von 52 HERV Subgruppen in verschiedenen Gehirnzellen nach 24-stündiger Behandlung mit Haloperidol (A), Risperidon (B) und Clozapin (C). Die Glioblastom-Zelllinie U-138MG, die Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH und die humane neurale Stammzelllinie HNSC.100 wurden jeweils mit 0,1; 1 und 10 μM behandelt. Die HERV Expressionsmuster wurden mit Hilfe eines Retrovirus-spezifischen Microarrays ermittelt (Seifarth *et al.*, 2003). Als interne Kontrolle für die RNA-Qualität diente das „Housekeeping“-Gen HPRT. Rot umrahmt sind HERV Subgruppen, die für eine Quantifizierung mittels qRT-PCR ausgewählt wurden (vgl. 3.1.4).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Expression verschiedener HERVs durch antipsychotische Medikamente beeinflusst werden kann. Tab. 4 gibt einen Überblick über die Microarraydaten der in Abb. 15 und 16 dargestellten Experimente, sowie der zweiten unabhängigen Versuche (ohne Abbildung). Die Expression eines einzelnen HERV Elements wurde in die Kategorien „keine Expression“ (-), „kein Einfluss“ (0), „geringer Einfluss“ (+) und „starker Einfluss“ (++) eingeordnet. Ein Symbol bedeutet, dass beide Experimente übereinstimmend waren, während bei Unterschieden das Ergebnis des ersten Experiments vor dem Schrägstrich und das zweite danach aufgeführt wurde. In seltenen Fällen wurde ein Dosis-abhängiger Rückgang der Expression, z. B. von ERV9 oder HML-3(Seq26) nach Behandlung von ANBC Zellen mit VPA beobachtet und durch ein R markiert. VPA zeigte insgesamt die stärksten Effekte, hauptsächlich auf die HERV-Gruppen HERV-Fb, HERV-W, ERV9, HML-3 und HERV-KC4. Haloperidol beeinflusste HERV-Fb, HERV-W, ERV9, und HERV-KC4. Risperidon und Clozapin zeigten dagegen nur einen geringen Einfluss, vor allem auf HERV-Fb, ERV9 und HERV-KC4. Keine aktivierende Wirkung von Antipsychotika wurde im Fall der HERV Gruppen HERV-I, HERV-ADP, HERV-R, HML-2, HML-7 und HML-8 ermittelt.

Aufgrund der gewonnenen Daten und der Hinweise in der Literatur wurden sechs HERV(Sub)-Gruppen ausgewählt (Tab. 4 farbig hinterlegt), um deren erhöhte Transkription in Abhängigkeit der Medikation mit einer Alternativmethode zu quantifizieren und den signifikanten Unterschied zu verifizieren (vgl. 3.1.4). Ausgesucht wurden HERV-Fb und HERV-KC4 aufgrund ihrer signifikanten Aktivierung durch alle Medikamente. Microarrayanalysen wiesen bei VPA zusätzlich auf eine Stimulierung von HML-3 hin, deshalb wurde auch Seq26 als repräsentativer Vertreter der HML-3 Gruppe weiteruntersucht. HERV-W und ERV9 zeigten einerseits eine starke dosisabhängige Erhöhung der Expression vor allem von VPA, wurden aber auch andererseits mehrfach mit Schizophrenie in Verbindung gebracht (Karlsson *et al.* 2001; Karlsson *et al.* 2004; Huang *et al.* 2006; Weis *et al.* 2007; Perron *et al.* 2008; Yao *et al.* 2008). Die Klasse II HERV Gruppe HML-2 blieb stets unbeeinflusst, wurde aber aufgrund ihrer Assoziation mit Schizophrenie ebenfalls ausgewählt (Frank *et al.* 2005).

Tab.4: Zusammenfassung aller Microarray Daten zweier unabhängiger Experimente.

HERV Gruppen (Untergruppen)	Medikation														
	Valproinsäure				Haloperidol				Risperidon				Clozapin		
	U-138 MG	U-251 MG	SK-N-SH	SK-N-MC	ANBC	HNSC.100	U-138 MG	SK-N-SH	HNSC.100	U-138 MG	SK-N-SH	HNSC.100	U-138 MG	SK-N-SH	HNSC.100
Klasse I															
HERV-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HERV-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HERV-FRD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HERV-E	+0	+0	+	+0	0	+	0/+	0/-	0	0/+	0	0	0	0/+	0/+
RGH2(HERV-H)	0	0/-	0/+	0/+	-	0/-	0	0/-	-	0	+	0	-0	0	0/+
HERV-ADPP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HERV-Fb(HERV-F) ²⁾	++/0	-/+	++	-/+	+0	+0	+0	+/+	+	+/+	+	0	0/+	0	R/+
HERV-W	0/+	0/+	+0	0	0/++	0	+	0/-	+	+	0	0	0	0	0/+
HERV-R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERV9	+	+	+/+	+/++	+	R/0	+	+0	+	+0	0	0	+	0	0/+
Klasse II															
HML-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HML-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq26(HML-3)	+0	+/+0	+/+	+/++	+0	R/0	0	-0	+	0	0	0	-0	0	+0
HML-4	+0	+	+0	0/+	0	R/0	0/+	0/-	0	0	0	0	0	0	0
HML-5	0	-	+	-0	0/-	-	0/-	-	-	-	-	-	-	-	-
HML-6	+0	+	+0	0/+	+	+R	0/+	0	0	0	0	0	0	0	R/+
HML-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HML-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HML-9	+0	+/-	0/+	-/+	-0	0	-0	0/R	-0	0	0	+	0	0	0/+
HERV-KC4(HML-10)	+/+0	+/+0	+	0/+	+0	+R	+0	0/+	0/+	+	0/+	0	0	+	R/+
Klasse III															
HERV-L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-

-	keine Expression
0	kein Einfluss
+	geringer Einfluss
++	starker Einfluss
R	Rückgang

¹ Das Symbol vor dem Schrägstrich repräsentiert den Einfluss im ersten und das Symbol danach den Einfluss des zweiten unabhängigen Experiments. ² Farblich markiert sind die HERV (Sub-)Gruppen, die für eine weitere Quantifizierung ausgewählt wurden.

3.1.4 Quantitative Analyse der Expression ausgewählter HERV-(Sub)Gruppen mittels qRT-PCR

Der Retrovirus-spezifische Microarray verschafft einen Überblick über die Transkriptionsaktivität verschiedener HERV-Gruppen und ist für eine qualitative Auswertung und gegebenenfalls auch für eine semiquantitative Abschätzung von Nutzen. Um die Ergebnisse des Microarrays zu bestätigen und die Unterschiede in der HERV-Expression zu quantifizieren, wurden einzelne HERV-Gruppen mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR untersucht. Außerdem wurde die Expression von HERV-K(HML-2) quantitativ analysiert, um festzustellen, ob die in früheren Microarray-Experimenten beobachtete Überrepräsentation in Gehirnproben von schizophrenen und bipolaren Patienten (Frank *et al.* 2005) möglicherweise eine Folge der Medikation ist.

Für die Quantifizierung der Subgruppen HERV-Fb, HERV-W, ERV9, Seq26 und HERV-KC4 wurden Primer in der *pol*(RT)-Sequenz verwendet. Jeweils ein Primer lag in der gleichen Region wie die „Capture Probes“, die im Retrovirus-spezifischen Microarray verwendet wurden (Seifarth *et al.* 2003; Seifarth *et al.* 2009). Aufgrund der Ähnlichkeit im *pol*-Bereich von HML-2 und HML-3 wurden für die quantitative Amplifizierung von HML-2 Sequenzen spezifische Primer aus dem *gag*-Bereich verwendet. Alle getesteten Primer aus dem *pol*-Bereich ermöglichten keine ausreichende Diskriminierung (Contreras-Galindo *et al.* 2006). Somit wurde die gesamte HERV Gruppe HML-2 erfasst. Bei der verwendeten Methode der relativen Quantifizierung handelte es sich um die Berechnung der x-fachen relativen Aktivierung einer HERV-Expression in behandelten Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Probe (Pfaffl 2001). Transkripte der RNA-Polymerase II (RPII) dienten dabei als interner Standard. Eine schwache relative Aktivierung der HERV-Expression in behandelten Zellen wurde bei einem Faktor von 2,5 bis vier festgelegt. Eine relative Aktivierung um den Faktor vier bis zehn wurde als stark und eine mehr als 10fache Aktivierung wurde als sehr stark definiert. Werte um den Faktor zwei wurden nicht als relevant betrachtet, da die HERV-Expression auch Zellkultur-bedingten Schwankungen unterworfen sein kann. Die Quantifizierung der HERV-Gruppen in behandelten Zellen erfolgte für beide unabhängigen Experimente.

3.1.4.1 Quantifizierung der HERV-Expression nach VPA-Behandlung

Als Kontrolle für eine erfolgreiche VPA-Behandlung wurde die Aktivität des zellulären Zellzyklus-Kontrollgens p21 bestimmt, da dieses Gen nachweislich durch VPA stimuliert wird (Li *et al.* 2005). Abb. 17 zeigt die mittels qRT-PCR ermittelte relative Transkription verschiedener HERV(Sub-) Gruppen in sechs verschiedenen Zelllinien. Es sind jeweils die Ergebnisse des ersten (Abb. 17A) und des zweiten unabhängigen Experiments (Abb. 17B) dargestellt.

Im ersten unabhängigen Experiment konnte in der Glioblastom-Zelllinie U-138MG eine starke, signifikante Aktivierung von ERV9 (5,4 fach) und p21 (6 fach), sowie eine schwache, signifikante Erhöhung von HERV-W und HERV-KC4 gemessen werden (Abb. 17A). Ebenso konnte im zweiten Experiment eine dosisabhängige schwache Aktivierung um etwa den Faktor drei bei ERV9 und p21 festgestellt werden. Dagegen blieb HML-2 bei beiden VPA-Konzentrationen im Vergleich zu

den unbehandelten Zellen konstant exprimiert. HERV-Fb, Seq26 und HERV-KC4 zeigten ebenfalls keine signifikante Änderung der Expression. Dies konnten im zweiten unabhängigen Experiment bestätigt werden.

Bei U-251MG Zellen, die als einzige 72 h mit VPA behandelt wurden, lag eine starke Aktivierung von HERV-W, HERV-Fb, Seq26 und p21 vor. Berechnungen mit Student's t-Test ergaben signifikante bis sehr signifikante Veränderungen (Daten nicht gezeigt). Während in beiden Versuchen ERV9 schwach stimuliert wurde, wurde kein Anstieg der Expression von HML-2 und HERV-KC4 verzeichnet.

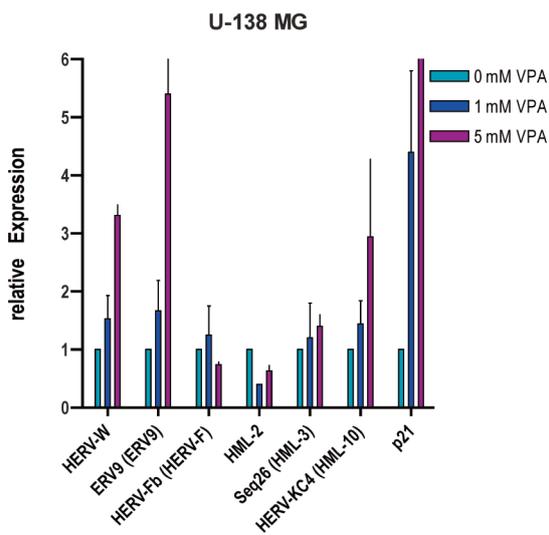
In SK-N-SH Zellen wurde die Expression von HERV-W im Vergleich zu allen anderen Zelllinien am stärksten mit bis zu 17-fach im ersten und bis zu 27-fach im zweiten Experiment durch VPA signifikant erhöht. Obwohl die Expression von ERV9, HERV-Fb, Seq26, HERV-KC4 und p21 in beiden Experimenten um den Faktor 3-6 ungefähr gleich stark induziert wurde, blieb die Expression von HML-2 unverändert auf dem Niveau der unbehandelten Zellen.

Eine sehr starke, signifikante bis sehr signifikante Aktivierung zeigte sich sowohl bei ERV9 (um den Faktor 16 im ersten und 24 im zweiten Experiment) als auch bei p21 in beiden Experimenten mit SK-N-MC Zellen. Während eine starke Aktivierung von HERV-W, Seq26 und HERV-KC4 im ersten Versuch zu sehen war, konnte dies nicht ein weiteres Mal bestätigt werden. HERV-Fb und HML-2 blieben stets unbeeinflusst.

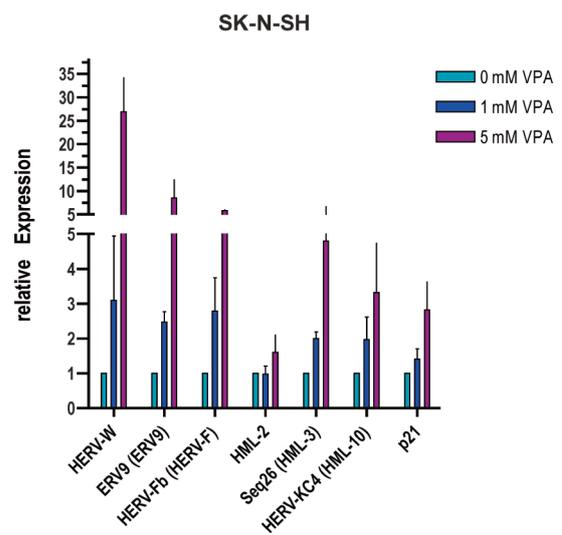
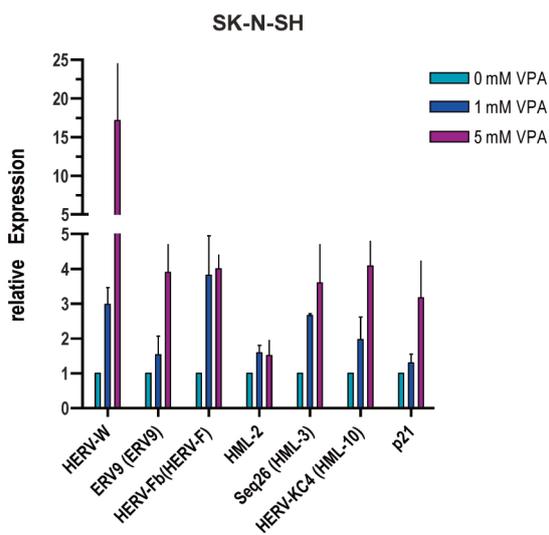
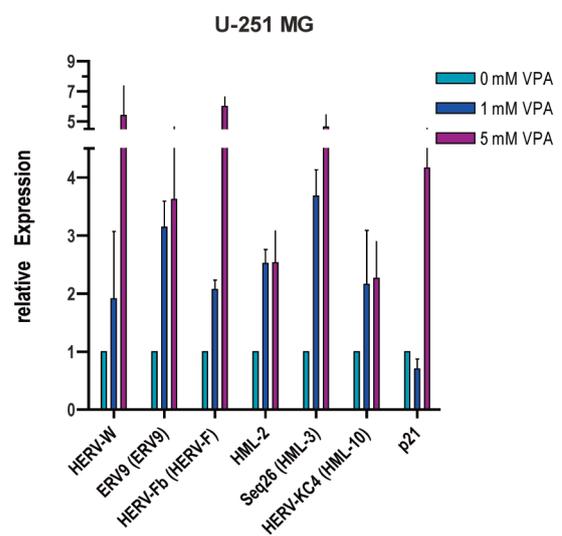
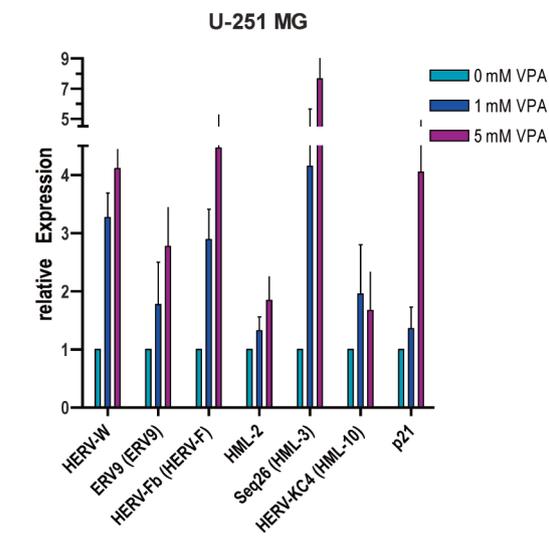
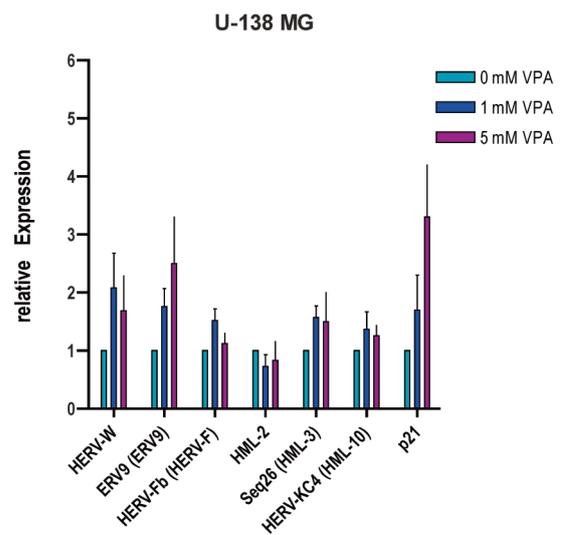
Im Gegensatz dazu fiel der extrem hohe, sehr signifikante p21-Wert von über 100 bzw. 1000 in HNSC.100 Zellen mit zunehmender VPA-Konzentration auf. Eine Aktivierung aller gemessenen HERV(Sub-)Gruppen war mit weniger als 2,5-fach stets nicht zu messen.

VPA bewirkte bei ANBC im ersten Experiment einen starken, sehr signifikanten Anstieg der Expression von HERV-Fb, sowie einen schwachen von p21. Im Gegensatz dazu wurde in der zweiten Behandlung eine schwache Erhöhung nur bei HERV-W und HERV-KC4 festgestellt. Die Aktivierung von HML-2 lag in beiden Fällen unter 2,4 und wies auf einen sehr geringen Einfluss von VPA hin. Alle anderen HERV (Sub-)Gruppen wurden beide Male nicht aktiviert.

A



B



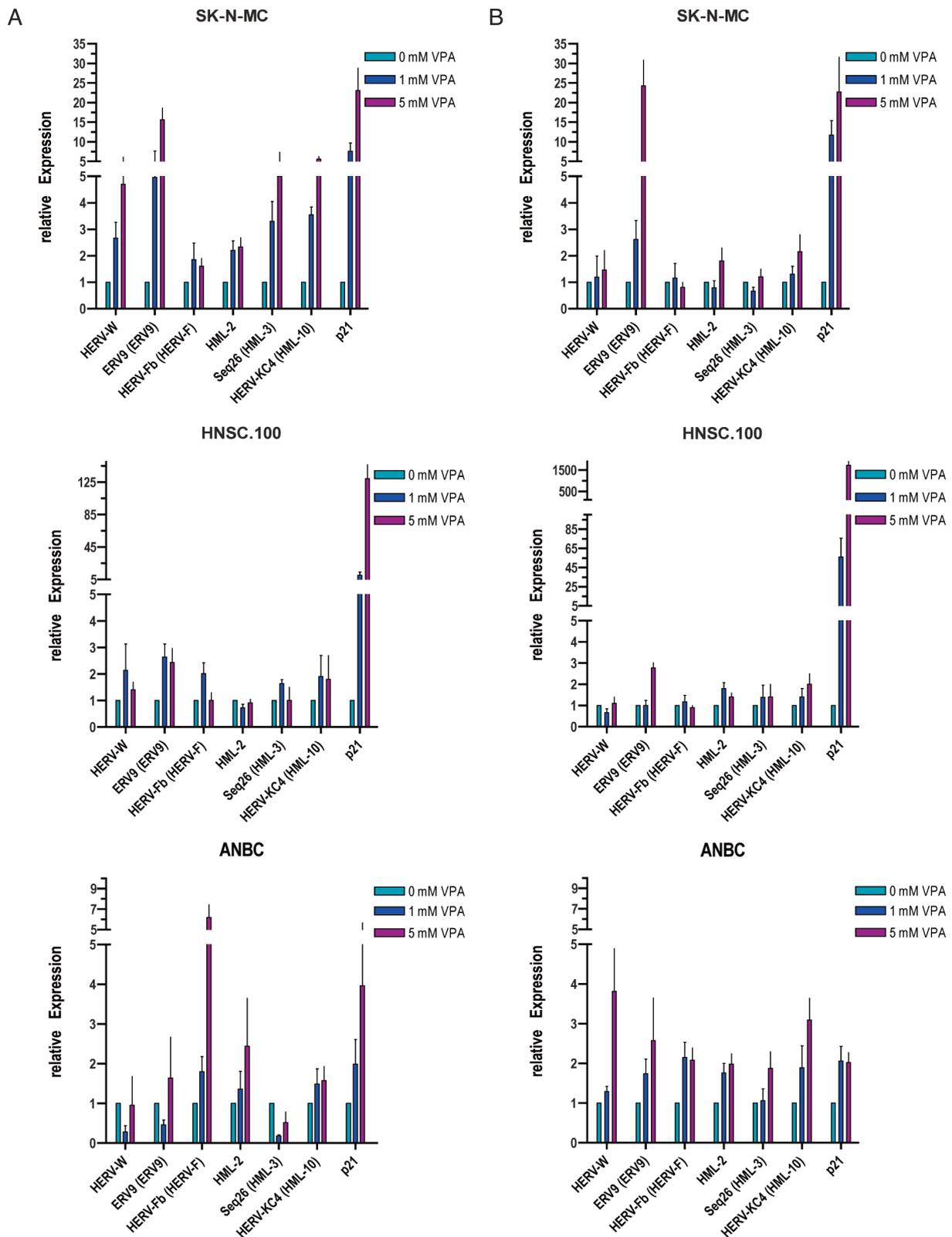
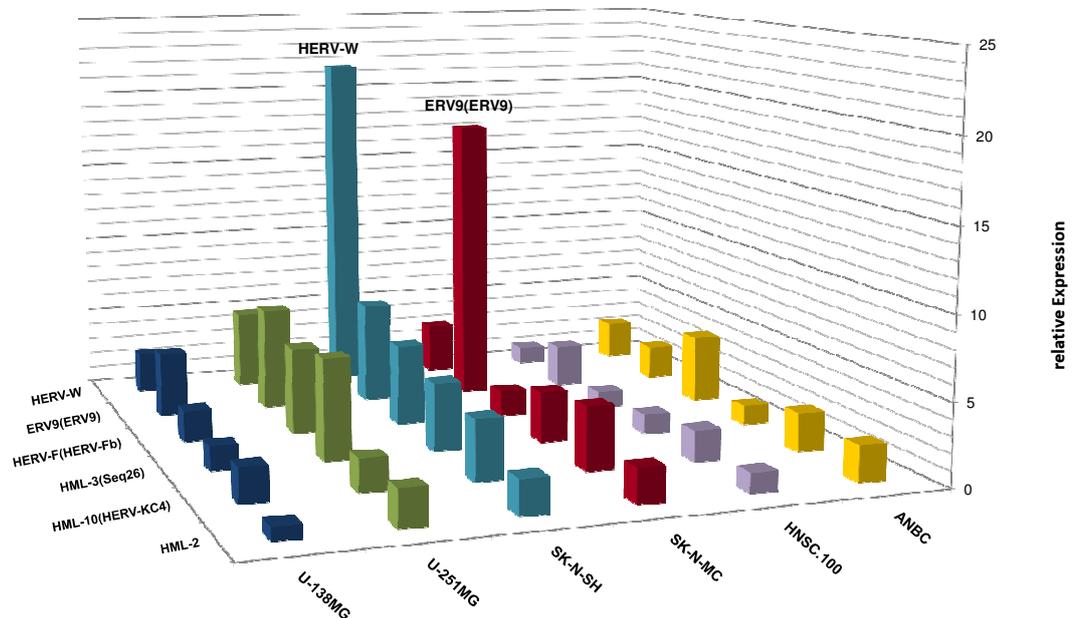


Abb. 17: Quantifizierung der Expression ausgewählter HERV-Gruppen in verschiedenen Gehirnzellen nach VPA-Behandlung (1 und 5 mM) mittels qRT-PCR. Abgebildet sind alle Ergebnisse des ersten (A) und des zweiten (B) unabhängigen Experiments. Transkripte der RNA-Polymerase II (RPII) dienen als interne Standards. Die HERV-Expression in unbehandelten Zellen wurde auf eine relative Transkription von 1 festgelegt. Jede Quantifizierung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Berechnung erfolgte nach Livak und Schmittgen (2001).

In Abb. 18 ist zur Verdeutlichung der Ergebnisse eine Zusammenfassung der gemittelten Expressionsaktivitäten in Abhängigkeit von der VPA Konzentration dargestellt. Die Werte sind im Detail in der Datentabelle aufgelistet.



	HERV-W	ERV9(ERV9)	HERV-F(HERV-Fb)	HML-3(Seq26)	HML-10(HERV-KC4)	HML-2
■ U-138MG	2,5	4	1,9	1,5	2,1	0,8
■ U-251MG	4,8	6,4	5,3	6,2	2	2,2
■ SK-N-SH	21,6	6,3	5	4,2	3,7	2,1
■ SK-N-MC	3,1	17,9	1,6	3,1	3,9	2,1
■ HNSC.100	1,1	2,6	1	1,2	1,9	1,2
■ ANBC	2,4	2,1	4,2	1,2	2,4	2,2

Abb.18: Zusammenfassung der relativen Expression von sechs verschiedenen HERV-Gruppen nach Behandlung mit 5 mM VPA aus zwei unabhängigen Experimenten. Es sind jeweils die Mittelwerte beider Experimente mit den Glioblastom-Zelllinien U-138 MG, U-251 MG, den Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und SK-N-MC, sowie der humanen neuralen Stammzelllinie HNSC.100 und den primären neuronalen Gehirnzellen ANBC aufgeführt. Die Datentabelle zeigt die Mittelwerte aus beiden Experimenten, aus denen die graphische Darstellung erstellt wurde.

In jedem Zelltyp mit Ausnahme der Zelllinie HNSC.100 konnte in Abhängigkeit der VPA-Konzentration eine erhöhte Aktivität von mindestens einer HERV Gruppe beobachtet werden. Wie Abb.18 zu entnehmen ist, beeinflusst VPA die Expression von HERV-W und ERV9 in der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH und SK-N-MC erheblich. Die relative Transkription stieg in beiden Experimenten um das über 22- bzw. 18-fache im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Berücksichtigt man nur eine Aktivierung von mehr als um den Faktor 4, so waren neben ERV9 und HERV-W auch Seq26 und HERV-Fb betroffen. Die HERV-KC4 Expression wurde in beiden Neuroblastom-Zelllinien um einen Faktor knapp unter 4 stimuliert. Im Gegensatz zu den anderen fünf HERV-Gruppen wurde keine signifikante Erhöhung der Expression von HML-2 in allen getesteten Zellen festgestellt.

3.1.4.2 Quantifizierung der HERV-Expression nach Behandlung mit Haloperidol, Risperidon oder Clozapin

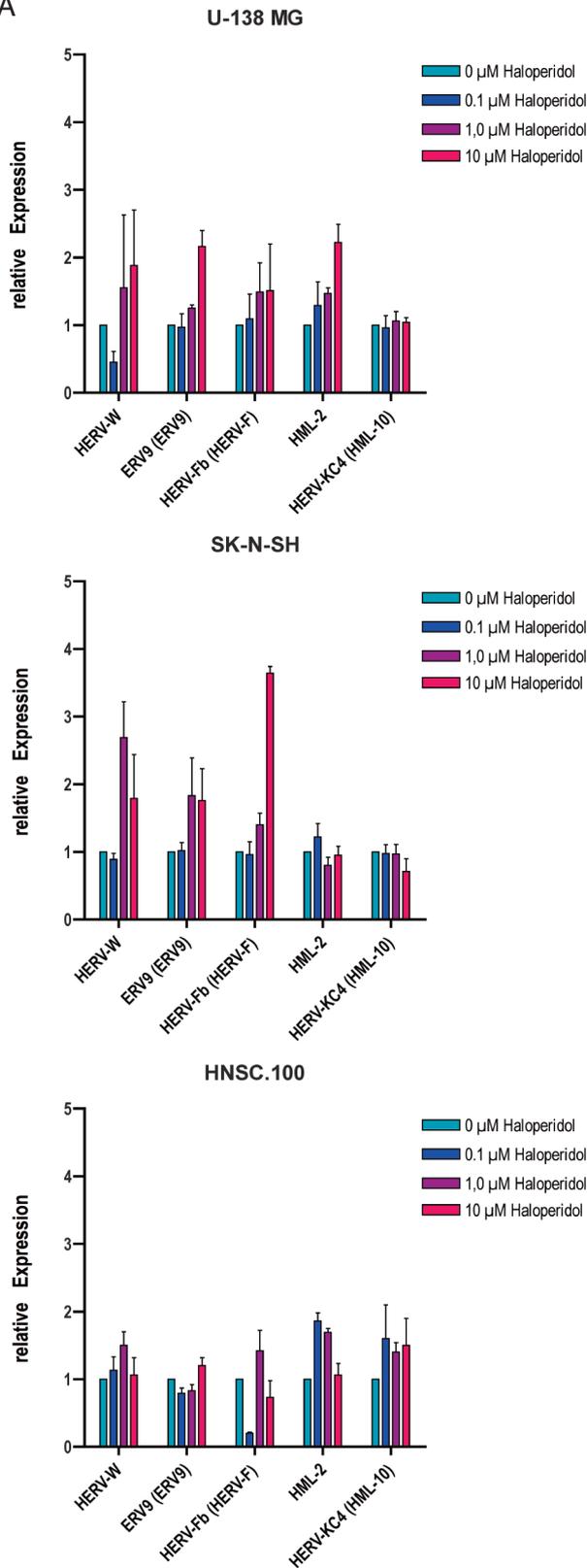
Stellvertretend für jede Behandlung der Zelllinien U-138MG, SK-N-SH und HNSC.100 mit Haloperidol, Risperidon oder Clozapin ist im Folgenden jeweils ein repräsentatives Experiment abgebildet (Abb. 19 A-C). Weder mit Haloperidol, noch mit Risperidon oder Clozapin konnte eine Steigerung der Transkription von HERV-W, ERV9, HERV-Fb und HERV-KC4 um mehr als den Faktor vier ermittelt werden. Dies wurde jeweils durch das zweite unabhängige Experiment bestätigt. Ebenso wurde keine Dosis-abhängige Expressionserhöhung um mehr als den Faktor 2,3 bei HML-2 nachgewiesen.

In Abhängigkeit der Haloperidol-Konzentration konnte eine leicht erhöhte Expression von HERV-W um das 2,7-fache und eine signifikant erhöhte Expression von HERV-Fb um das 3,6-fache in SK-N-SH Zellen ermittelt werden (Abb. 19A).

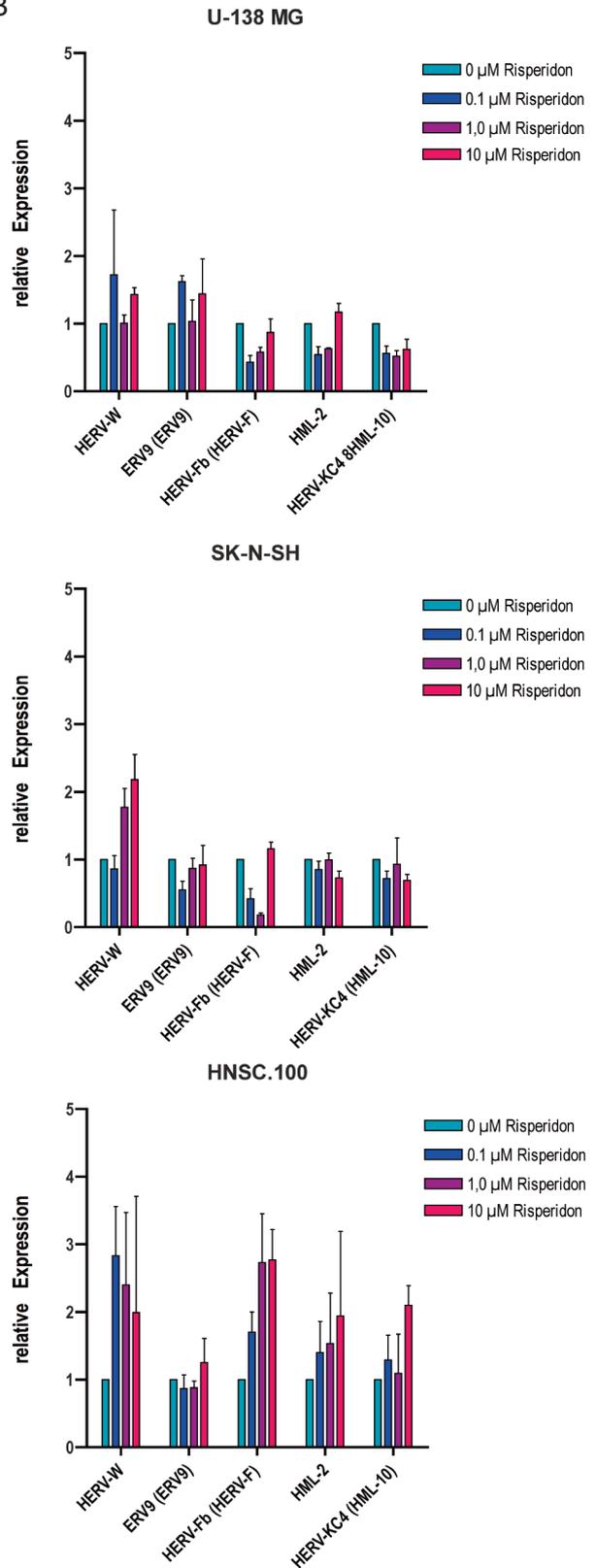
Während keine Dosis-abhängige Aktivierung bei mit Risperidon behandelten U-138MG Zellen festgestellt wurde, konnte in SK-N-SH Zellen eine schwache Erhöhung der HERV-W Transkription um den Faktor 2,2 erzielt werden. HERV-W erscheint auch in HNSC.100 Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen schwach stimuliert (Abb. 19B).

Ähnlich waren die Resultate nach der Behandlung mit Clozapin (Abb. 19C). Im Gegensatz zu U-138MG Zellen mit einer geringfügig erhöhten relativen Transkription um Faktor 2,8 für HERV-W und HERV-KC4 in HNSC.100 Zellen, wurde keine Aktivierung eines HERV Elements in SK-N-SH oder HNSC.100 Zellen gefunden.

A



B



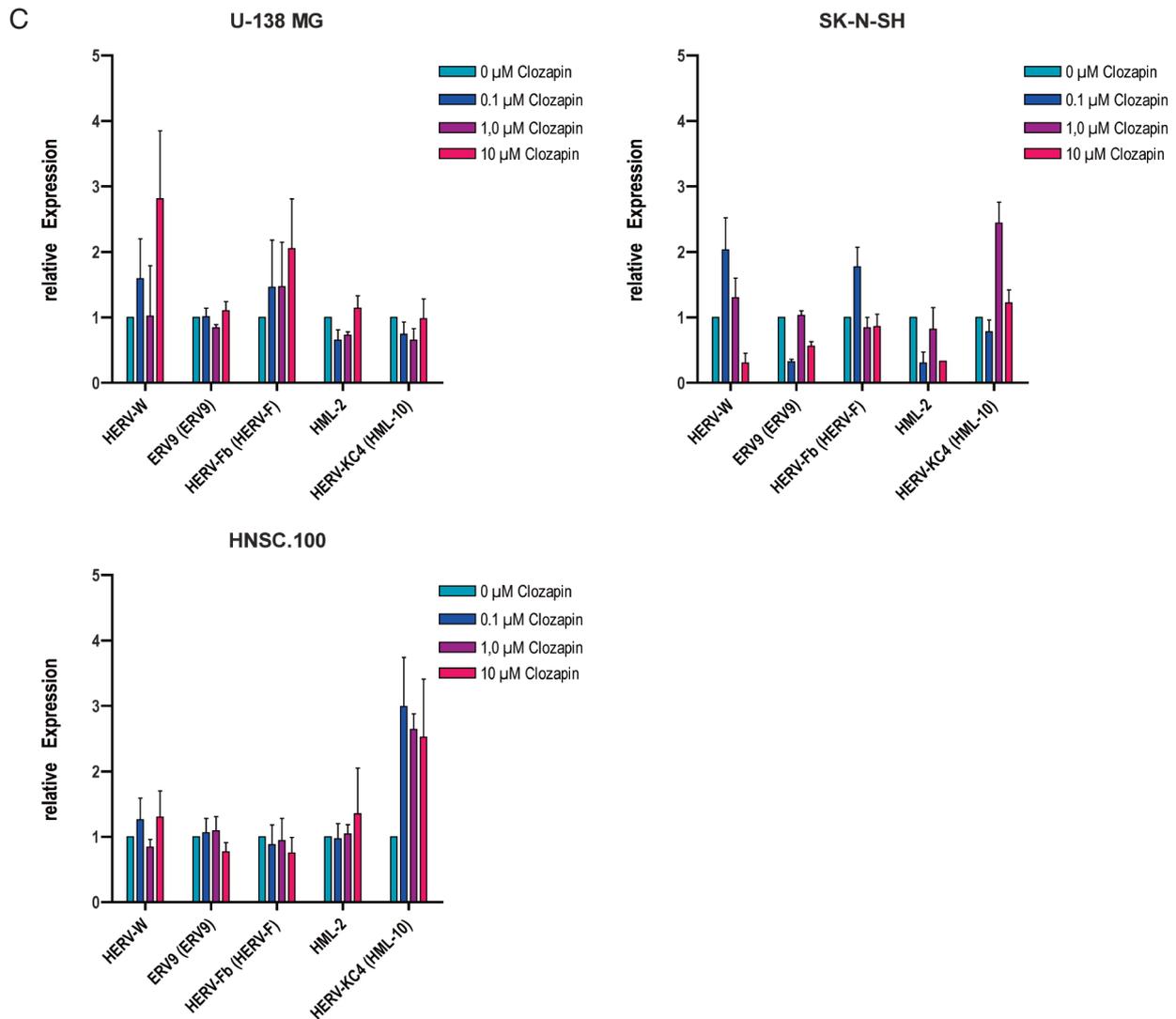


Abb. 19 A)-C): Quantifizierung der Expression ausgewählter HERV-Gruppen in verschiedenen Gehirnzellen nach Behandlung mit Haloperidol (A) Risperidon (B) oder Clozapin (C) (je 0,1; 1 und 10 μM) mittels qRT-PCR. Transkripte der RNA-Polymerase II (RP II) dienten als interne Standards. Die HERV-Expression in unbehandelten Zellen wurde auf eine relative Transkription von 1 festgelegt. Jede Quantifizierung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Berechnung erfolgte nach (Livak *et al.* 2001).

Um den Einfluss von Haloperidol, Risperidon und Clozapin im Vergleich zu VPA auf die Expression verschiedener HERVs zu verdeutlichen, ist im Folgenden die gemittelte Expression aus beiden Experimenten nach einer Behandlung mit 10 μM des entsprechenden Medikaments dargestellt (Abb. 20). Die Einzelwerte in der Datentabelle zeigen, dass keine Expressionssteigerung um mehr als den Faktor 2,8 erreicht wurde. Insgesamt war im Gegensatz zum Effekt von VPA ein weitaus geringerer Einfluss von Haloperidol zu verzeichnen. Die Behandlung mit Risperidon oder Clozapin hatte demnach keinen signifikanten Einfluss auf die HERV-Transkription.

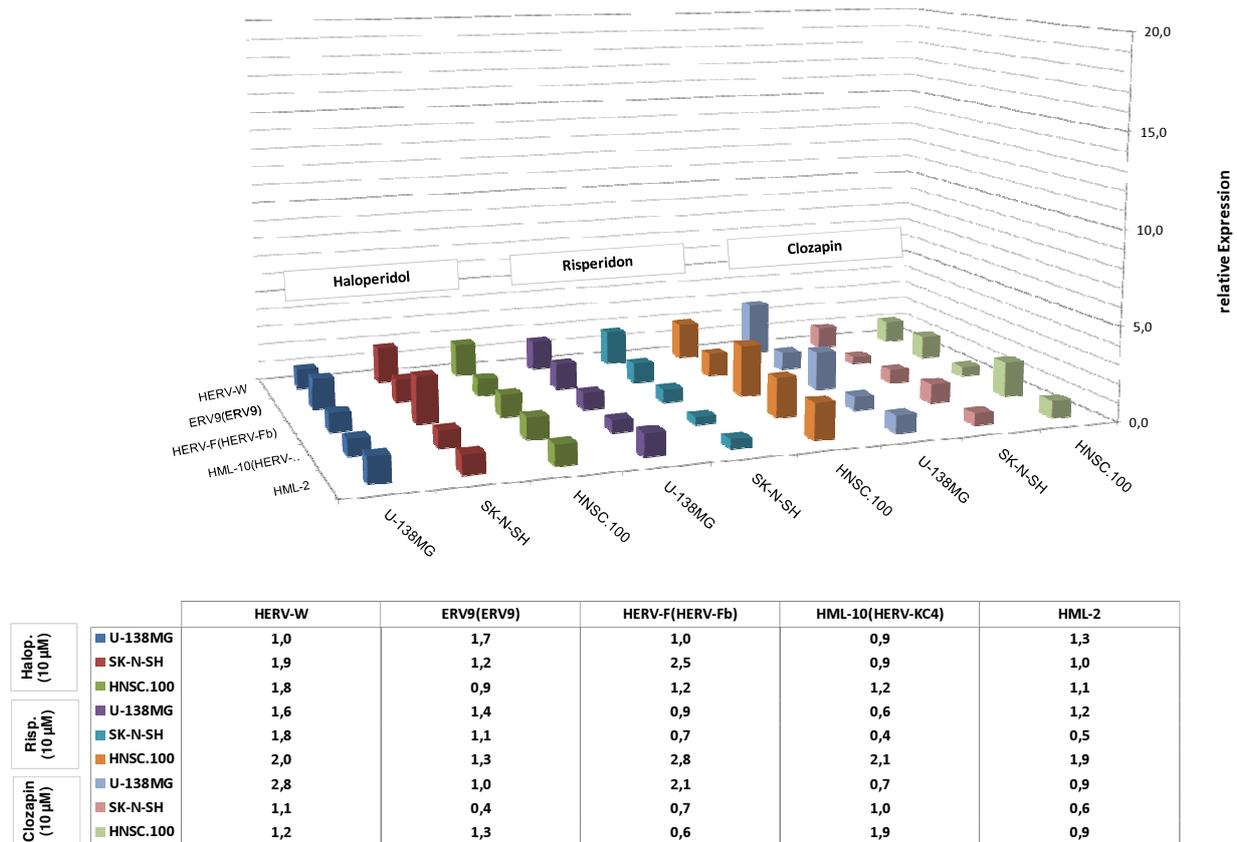


Abb. 20 Zusammenfassung der Aktivierung von fünf ausgewählten HERV Gruppen nach Behandlung mit 10 µM Haloperidol, Risperidon oder Clozapin (von links nach rechts) aus zwei unabhängigen Experimenten. Es sind jeweils die Mittelwerte beider Experimente mit der Glioblastom-Zelllinie U-251 MG, der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH, sowie der humanen neuralen Stammzelllinie HNSC.100 aufgeführt. Die Datentabelle zeigt die Mittelwerte aus beiden Experimenten, aus denen die graphische Darstellung erstellt wurde.

3.1.5 Untersuchung der (H)ERV-Expression im Gehirn von Rhesusaffen (*M. mulatta*) nach Behandlung mit Antipsychotika

Um zu untersuchen, ob die im Zellkulturmodell gewonnenen Daten über den Einfluss von Haloperidol und Clozapin durch *in vivo* Experimente bestätigt werden können, wurden Gehirnprouben von Rhesusaffen (*M. mulatta*) mit einem angepassten Retrovirus-spezifischem Microarray analysiert. Die Behandlung der Tiere mit Antipsychotika und die Gewebeentnahme erfolgte am Department of Physiology and Pharmacology; Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA. Jeweils 10 Rhesusaffen wurden mit Haloperidol (0,07 mg/kg; b.i.d.) bzw. Clozapin (2,6 mg/kg; b.i.d.) behandelt (O'Connor *et al.* 2006; O'Connor *et al.* 2007). Als Kontrolle dienten Gewebeprouben von zehn unbehandelten Tieren. Die Gehirnprouben aus dem präfrontalen Cortex wurden von S. Hemby (Wake Forrest University) und daraus präparierte cDNA von Marc Frohn-meyer (III. Medizinische Klinik, Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Die Experimente wurden zusammen mit Marisa Schöffner wie in Kapitel 2.2.2.6 beschrieben durchgeführt. Der Microarray beinhaltet mit 52 repräsentativen HERV *pol*(RT)-Sequenzen von insgesamt 21 Gruppen alle HERV-Taxa, die sowohl im menschlichen Genom als auch im Altweltaffen-Genom vorkommen. Zusätzlich enthielt dieser Microarray acht Altweltaffen-spezifische ERV-Gruppen, die ausschließlich im Genom von Altweltaffen, aber nicht im humanen Genom enthalten sind (Han *et al.* 2007). Das „Housekeeping“-Gen HPRT diente als interne Kontrolle der RNA-Qualität. Ein digital prozessiertes Alignment von 15 repräsentativen Proben ist in Abb. 21 dargestellt.

Eine konstante (H)ERV Expression zeigten die Klasse I HERVs E4-1, HERV-W und ERV9, Seq59, sowie die Klasse II HERVs HERV-KC4 (Abb. 21A). Darunter wies besonders HERV-KC4 eine sehr hohe Expression auf. Im Vergleich dazu wurden einige differentiell aktive HERVs identifiziert, die mit unterschiedlicher Häufigkeit in den Affenproben exprimiert sind. Diese Transkripte stammten von den Klasse I HERV Gruppen HERV-I, HERV-F, sowie Klasse II HERV Gruppen HML-1, HML-2, HML-4, HML-6, HML-7, HML-8 und HML-9.

Es konnte weder eine Expression der Gruppen HERV-FRD, HERV-H, HERV-ADP, HERV-R, noch von HML-5 und HERV-L nachgewiesen werden. Nur bei HERV-T und HML-3 könnte in Abhängigkeit der Behandlung ein leichter Unterschied in der Transkriptmenge vermutet werden. Vergleicht man jedoch die Inzidenzen von HML-3 und HERV-T in der Kontrollgruppe mit der in beiden behandelten Gruppen, so konnte jeweils in acht von zehn Proben eine HML-3 Expression beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten sechs von zehn Kontrollproben, drei von zehn in der Haloperidol-Gruppe und sieben von zehn in der Clozapin-Gruppe eine Expression von HERV-T.

Im Fall der Altweltaffen-spezifischen ERVs konnte keine Expression von MacERV5 und MacERV6 festgestellt werden (Abb. 21B). MacERV1, MacERV2 und MacERV3 waren ubiquitär exprimiert, wobei MacERV3 von allen Altweltaffen-spezifischen ERVs die höchste transkriptionelle Aktivität aufwies. MacERVK1, MacERVK2 und MacERV4 waren in allen Proben durchgehend deutlich, aber eher schwach exprimiert. Im Gehirn der mit Haloperidol und Clozapin behandelten Tiere konnte im Vergleich zu unbehandelten Tieren keine veränderte Transkription der Altweltaffen-spezifischen ERVs festgestellt werden.

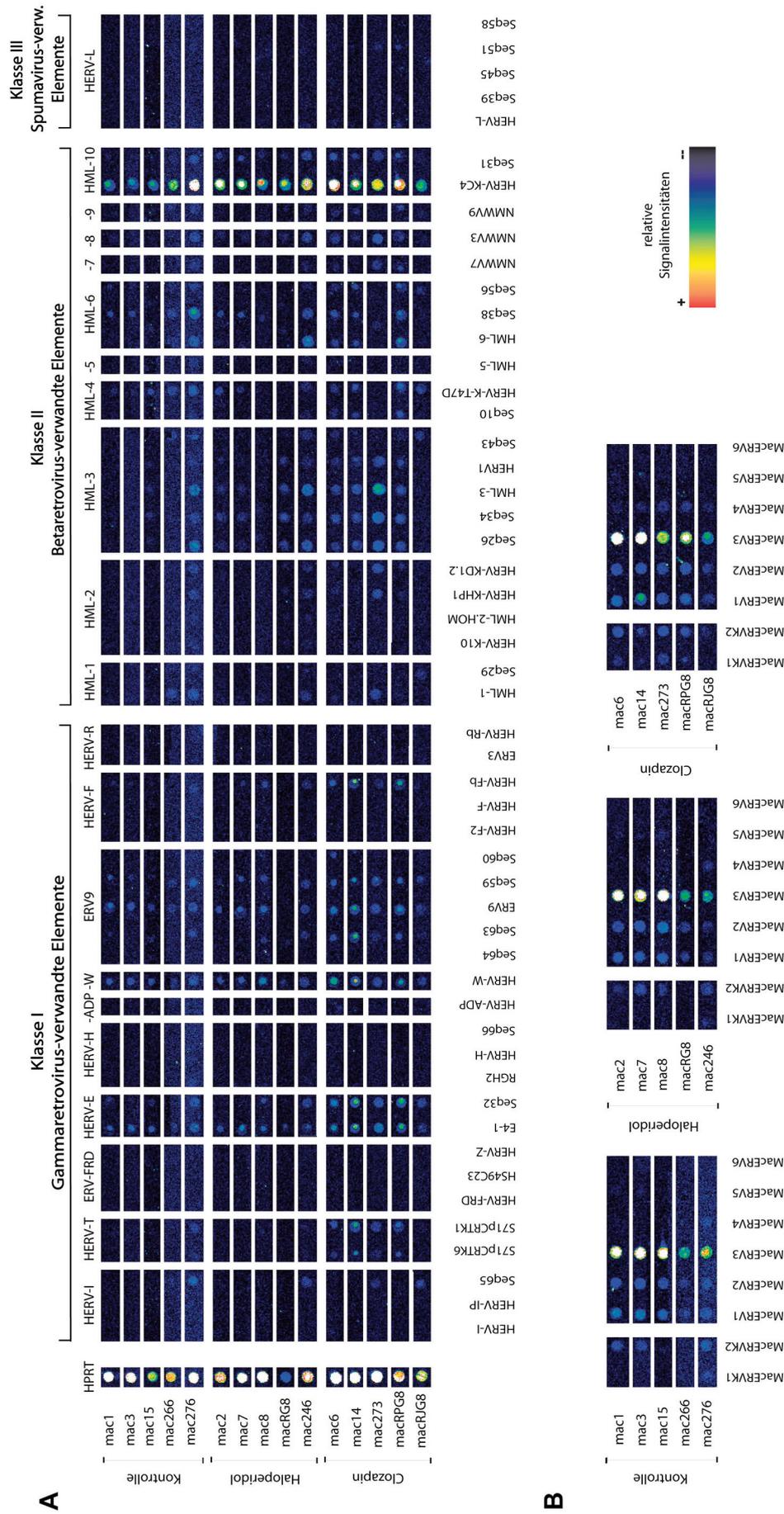


Abb. 21 (H)ERV-Expressionsprofile im Motorkortex unbehandelter und mit Antipsychotika behandelter Rhesusaffen (M. Mulatta). Abgebildet sind Microarrays von jeweils fünf Tieren, die nicht (Kontrolle) bzw. mit Haloperidol (0,07 mg/kg; b.i.d.) oder Clozapin (2,6 mg/kg; b.i.d.) behandelt wurden. Die (H)ERV Expression wurde mittels Retrovirus-spezifischem Microarray (Seifarth *et al.* 2003) untersucht. Als interne Kontrolle für die RNA-Qualität diente das „Housekeeping“-Gen HPRT. **(A)** Transkriptionsaktivität HERV-verwandter ERVs. **(B)** Altweltaffen-spezifische ERVs.

3.1.6 Expression von HERV-W, ERV9(ERV9) und HML-2 in *postmortem* Proben von Patienten mit Schizophrenie und bipolaren Störungen

Im Zellkulturmodell hat VPA einen deutlichen Einfluss auf verschiedene HERV(Sub-)Gruppen, vor allem HERV-W und ERV9, gezeigt. Beide HERV-Gruppen wurden mehrmals mit Schizophrenie in Verbindung gebracht (Karlsson *et al.* 2001; Weis *et al.* 2007; Perron *et al.* 2008; Yao *et al.* 2008). Folglich stellte sich die Frage, ob diese beiden HERV Elemente auch in Patienten mit Schizophrenie oder Bipolaren Störungen, die mit VPA behandelt wurden, eine erhöhte Expression aufweisen im Vergleich zu Patienten ohne VPA Medikation, und ob es quantitative Unterschiede in der HERV Expression zwischen Patienten und Gesunden gibt.

Deshalb wurden Gehirnproben von Patienten, die mit VPA therapiert worden waren mit Proben von Patienten ohne VPA-Behandlung, sowie einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Zur Verfügung standen *postmortem* Gehirnproben des präfrontalen Kortex aus je 35 Patienten mit Schizophrenie oder Bipolaren Störungen, sowie 35 Proben von Gesunden („Stanley Medical Research Institute“(SMRI), Baltimore, USA). In früheren Untersuchungen waren bereits Microarray Analysen durchgeführt worden (Frank *et al.* 2005), jedoch erfolgte keine Quantifizierung der HERV-Transkription. Aufgrund der Daten und unter Berücksichtigung der medikamentösen Behandlung wurden die Patientenproben nach Art der Erkrankung und nach VPA Therapie eingeteilt.

Nach Anwendung dieser Kriterien standen sechs Patientenproben von Schizophrenen zur Verfügung, die mit VPA therapiert wurden. Zum Vergleich wurden sechs Proben von Schizophrenen ohne VPA Behandlung herangezogen. Weitere zehn Proben von Patienten mit Bipolaren Störungen unter VPA-Behandlung, sowie zehn ohne VPA Behandlung konnten ermittelt werden. Darunter waren vier Proben von Patienten ohne medikamentöse Behandlung. Zum Vergleich wurden zehn *postmortem* Proben aus der gesunden Kontrollgruppe ausgewählt. Tab. 5 gibt einen Überblick über die ausgewählten Patienten hinsichtlich Art der Erkrankung, Alter, Geschlecht, Medikation, sowie Konsum von Alkohol oder Drogen. Es wurde die Aktivität von HML-2, HERV-W, ERV9 und p21 in 42 Proben quantitativ erfasst (Abb. 22).

Tab. 5 Patientendaten zu den *postmortem*-Gehirnproben hinsichtlich Alter, Geschlecht und Medikation, sowie Konsum von Alkohol oder Drogen.

Nr.	Profil	Alter	a)					b)		c)
			Geschlecht	VPA	Halop	Risp	Cloz	Andere	Alkohol konsum	Drogen konsum
1		43	1	x				x	0	0
2		41	1	x			x	x	3	3
3		19	1	x				x	1	5
4		24	1	x				x	5	5
5		47	1	x	x			x	2	1
6	schizo- phren	47	2	x				x	1	0
7		53	2		x			x	5	0
8		31	1				x	x	5	4
9		44	1		x				3	3
10		51	1					x	3	1
11		54	1			x		2		
12		43	1		x				1	1
13		45	1	x		x		x		5
14		41	1	x				x	5	4
15		44	1	x					2	1
16		59	2	x				x	1	0
17		54	1	x				x	2	2
18		64	1	x			x		0	0
19		59	1	x				x	1	0
20		51	2	x		x		x	2	0
21		44	2	x				x	0	0
22	bipolar	56	2	x				x	5	4
23		29	2					x	3	5
24		42	1						5	5
25		41	1						4	5
26		35	1						2	2
27		43	2					x	4	4
28		33	2			x		x	5	2
29		49	2					x	5	1
30		49	2					x	0	0
31		55	2						1	0
32	42	2			x			4	3	
33		47	1						0	1
34		59	1						0	0
35		34	1						0	0
36		49	1						0	0
37	gesund	51	1						1	0
38		52	1						0	0
39		44	2						3	0
40		37	1						0	0
41		55	1						1	0
42		41	2						0	0

Abkürzungen: Halop (Haloperidol), Risp (Risperidon), Cloz (Clozapin)

^{a)} Geschlecht: 1= männlich; 2= weiblich

^{b)} lebenslanger Alkoholkonsum: 0= kein/wenig; 1= sozial; 2= mittel in der Vergangenheit; 3= mittel in der Gegenwart; 4= hoch in der Vergangenheit; 5= hoch in der Gegenwart;

^{c)} lebenslanger Drogenkonsum: 0= kein/wenig; 1= sozial; 2= mittel in der Vergangenheit; 3= mittel in der Gegenwart; 4= hoch in der Vergangenheit; 5= hoch in der Gegenwart;

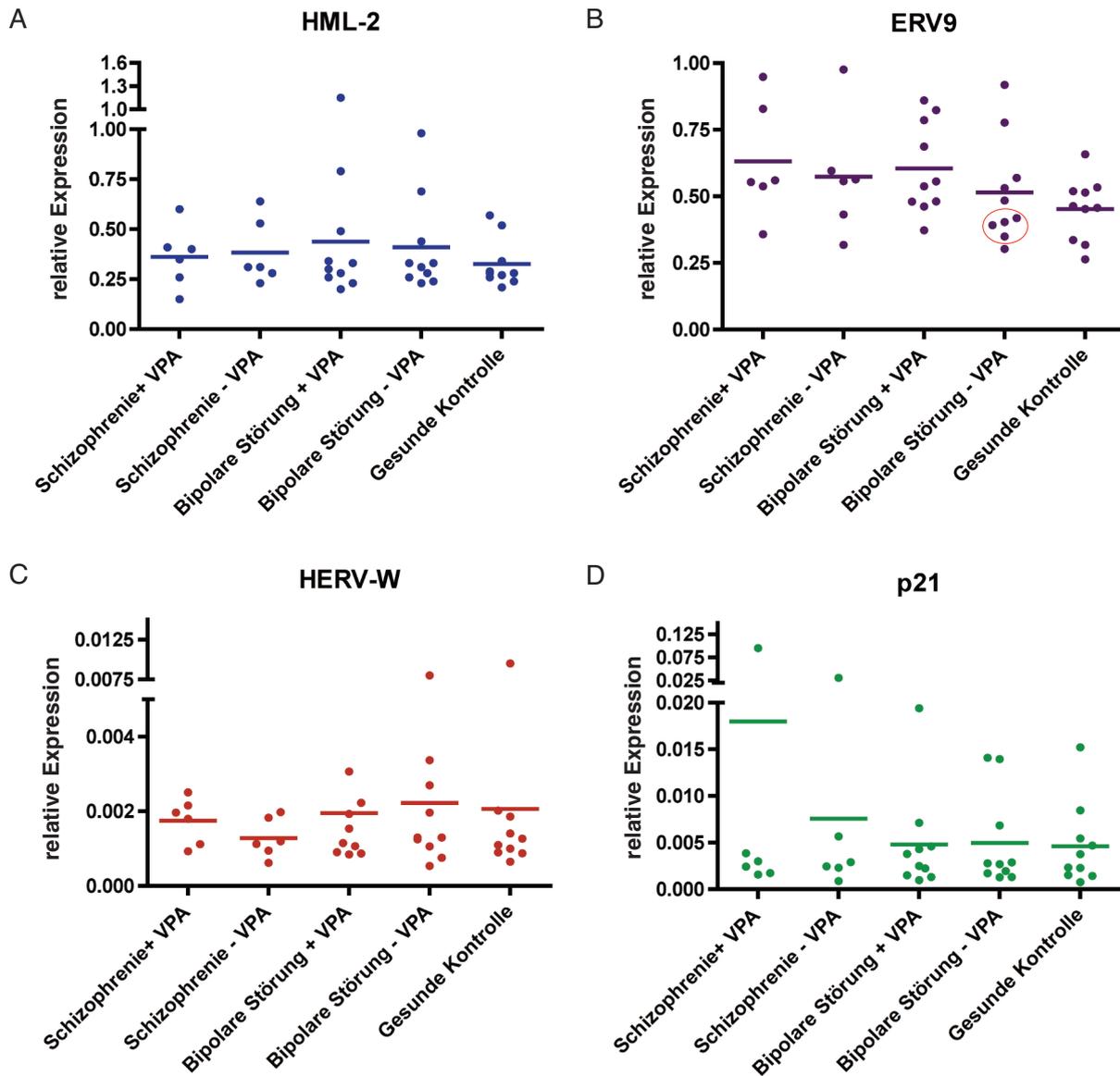


Abb. 22 Quantitative Analyse der HML-2 (A), ERV9 (B), HERV-W (C) und p21 (D) Expression von 42 *postmortem*-Proben mittels qRT-PCR. Es wurden sechs Patienten mit Schizophrenie mit und sechs ohne VPA Behandlung analysiert, sowie zehn mit VPA behandelte Patienten mit bipolaren Störungen. Zum Vergleich wurden zehn weitere Patienten mit bipolaren Störungen ausgewählt. Vier Patienten waren nicht medikamentös (roter Kreis) und die anderen sechs mit anderen Medikamenten therapiert worden. Als Kontrolle wurde die HERV Expression bei zehn gesunden Personen quantifiziert. Die Auswahl beruhte auf Patientendaten des „Stanley Medical Research Institute“ (SMRI), Baltimore, USA (Tab. 5). Die Auswertung der Daten erfolgte nach Pfaffl *et al.* (2001).

Jeder Punkt in Abb. 22 repräsentiert die aus Triplikaten gemittelte Expression eines einzelnen Patienten, jeder Balken den ermittelten Durchschnittswert einer jeden Gruppe.

Bildet man den Durchschnittswert von HML-2 in allen gemessenen Proben, so lag dieser in der gesunden, unbehandelten Kontrollgruppe bei 0,31 (Abb. 22A). Dagegen wurde eine durchschnittliche HML-2 Aktivität von Schizophrenen mit oder ohne VPA bei 0,38 und bei mit VPA behandelten Patienten mit bipolaren Störungen von 0,44 bzw. ohne VPA-Therapie von 0,41 gemessen. Dies

weist auf eine leichte, Erhöhung der HML-2 Expression in Patienten unabhängig von der Medikation hin. Außerdem konnte eine signifikant erhöhte Expression von HML-2 in Patienten mit Bipolaren Störungen unabhängig von der Behandlung im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden.

Auffallend bei ERV9 war die relativ hohe Expression von durchschnittlich 0,5 bis 0,6 im Vergleich zu den anderen HERV Gruppen (Abb. 22B). ERV9 zeigte in beiden Patientengruppen leichte Unterschiede in der Transkriptmenge in Abhängigkeit der VPA-Behandlung. So lag der Durchschnittswert von ERV9 bei Schizophrenen mit VPA bei 0,63 und ohne VPA bei 0,57. Ebenso konnte eine leicht erhöhte Expression von ERV9 in Patienten mit Bipolaren Störungen und VPA Behandlung mit 0,59 im Vergleich zu ohne VPA mit einem Durchschnittswert von 0,53 gemessen werden. Interessanterweise zeigten die vier Patienten ohne jegliche medikamentöse Behandlung (roter Kreis), aber mit derselben Diagnose der Bipolaren Störung eine annähernd ähnlich geringe ERV9 Expression wie die gesunden Kontrollgruppe. Bei Patienten mit Schizophrenie war unabhängig von der Medikation die Expression von ERV9 signifikant erhöht. Dies wurde ebenfalls in Patienten mit Bipolaren Störungen ermittelt. Somit war ERV9 einerseits im Durchschnitt höher in Patienten mit VPA als ohne VPA Behandlung mit derselben psychischen Erkrankung aktiv und andererseits konnte eine leicht erhöhte Expression in Patienten unabhängig von der Diagnose im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu war für HERV-W in allen fünf Gruppen unabhängig von der Medikation und der Behandlung ein deutlich niedrigeres Expressionsniveau mit Durchschnittswerten unter 0,002 zu erkennen (Abb. 22C). Auch hier konnte eine leicht erhöhte Expression in Abhängigkeit der VPA-Behandlung bei Schizophrenen (0,0016 zu 0,0014 ohne VPA) nachgewiesen werden. Währenddessen war die HERV-W Expression bei beiden Gruppen der Bipolar Erkrankten und der gesunden Kontrollgruppe mit 0,002 auf annähernd gleichem Niveau.

Die meisten Patientendaten konzentrierten sich im Fall des Kontrollgens p21 auf einem mit HERV-W vergleichbaren Expressionsniveau mit sehr niedrigen Werten unter 0,005 (Abb. 22D).

Um einen möglichen Effekt von Alkohol oder Drogenkonsum auf die Expression von HML-2, ERV9 und HERV-W zu testen, wurden die Patienten jeweils in zwei Gruppen eingeteilt. Einmal wurde der lebenslange Alkoholenuss gewertet und alle Personen ab einem moderaten Alkoholkonsum in der Gegenwart bis hin zu schwerer Alkoholabhängigkeit in der Vergangenheit oder der Gegenwart Personen mit keinem oder geringen Alkoholkonsum gegenübergestellt (vgl. Anhang A Abb. 38). Ebenso wurde nach gleichen Richtlinien eine Aufteilung nach Drogenkonsum vorgenommen.

Während die durchschnittliche HML-2 Aktivität in Abhängigkeit des Drogenkonsums gleichbleibt, konnte in Bezug zu Alkohol eine leichte Erhöhung ermittelt werden (Anhang A Abb. 38A). Im Gegensatz dazu war bei ERV9 eine leicht erhöhte Expression sowohl nach Alkohol als auch nach Drogenmissbrauch zu finden (Anhang A Abb. 38B). Die durchschnittliche Aktivität von HERV-W war in der Gruppe mit hohem Alkohol- und Drogenkonsum im Vergleich zur anderen Gruppe leicht reduziert (Anhang A Abb. 38C).

3.2 Regulation der HERV-K(HML-2) Transkription

3.2.1 Methylierungsstatus von unterschiedlich aktiven HERV-K(HML-2) Loci

Elemente der HERV-K(HML-2) Gruppe werden in einigen Patienten mit Schizophrenie oder Bipolaren Störungen erhöht exprimiert gefunden (Frank *et al.* 2005). Da die Transkription dieser HERV Gruppe nicht oder nur geringfügig durch die Medikation beeinflusst wird (vgl. 3.1), wurde die Regulation der Aktivität von HERV-K(HML-2) im Detail untersucht. Im Vorfeld dieser Arbeit konnten bereits in menschlichem Gewebe transkriptionell aktive HERV-K(HML-2) Loci identifiziert werden (Flockerzi *et al.* 2008). Hierfür wurden HML-2-Transkripte von fünf Patienten mit Schizophrenie, fünf mit Bipolaren Störungen und fünf Gesunden amplifiziert und kloniert. Für dieses Vorhaben wurden *gag* anstelle von *pol* Sequenzen zur Amplifikation verwendet, da *gag* Sequenzen in Retroviren weniger konserviert sind und deshalb eine Unterscheidung der dazugehörigen Loci ermöglichen. Insgesamt wurden 374 HERV-K(HML-2) Sequenzen analysiert und konnten 16 unterschiedlichen Loci zugeordnet werden. Davon wurden sieben eher selten und fünf fast in jeder Gehirnprobe detektiert. Die in Patienten mit Schizophrenie überrepräsentierte HERV-K(HML-2) Subgruppe HERV-K10 konnte einem Provirus auf Chromosom 5q33.3 (c5_A) zugeordnet werden. Diese provirale Sequenz enthält ein offenes Leseraster (ORF) für alle *gag* Proteine. In jeder Gehirnprobe waren c5_A Transkripte mit unterschiedlicher Häufigkeit (5-38%) transkriptionell aktiv. Außerdem wurden Transkripte von zwei Proviren (c6_A und c7_A) ausschließlich in einem Patienten mit Schizophrenie und von c6_A zusätzlich in einem Patienten mit Bipolaren Störungen gefunden. Beide Loci enthalten sowohl ORFs für Gag, als auch für Env Proteine (Flockerzi *et al.* 2007; Flockerzi *et al.* 2008). Wie oben beschrieben wurden auch transkriptionell aktive HERV-K(HML-2) Loci in der Teratokarzinom-Zelllinie (Tera-1) identifiziert (Ruprecht *et al.* 2008). Hierfür wurden 24 HERV-K(HML-2) Sequenzen analysiert und konnten dem *gag*-Bereich von fünf unterschiedlichen Loci zugeordnet werden.

Anhand dieser Identifizierung von unterschiedlich aktiven HERV-K(HML-2) Loci im Gehirn und in Teratokarzinomzellen wurden sieben Loci ausgesucht, um deren Methylierungsstatus in Zelllinien und in den *postmortem* Gehirnproben von Patienten, aus denen die Transkripte ursprünglich isoliert worden waren, zu bestimmen.

Tab.6: Auswahl aktiver und inaktiver HERV-K(HML-2) Loci

Locus	Beschreibung nach Flockerzi <i>et al.</i> , 2008; Ruprecht <i>et al.</i> , 2008
c3_B	Deutlich aktiv in Gehirnzellen, geringfügig in der humanen Teratokarzinom-Zelllinie (Tera-1)
c5_A	
c6_A	Unterschiedlich aktiv in Patienten
c7_A	
c11_A	Geringe Aktivität in menschlichem Gewebe
c12_A	Komplett inaktiv im menschlichen Gehirn; dient als Negativ-Kontrolle
c22_A	Nicht aktiv im menschlichen Gehirn; jedoch deutlich aktiv in Tera-1 Zellen, stellen 50% aller HERV-K(HML-2) Transkripte dar

Es wurde der Methylierungsstatus von c5_A, c6_A und c7_A analysiert, da diese Loci nach den Ergebnissen des Retrovirus-spezifischen Microarrays und der Sequenzierung des HERV-K(HML-2) Transkriptoms in Patienten unterschiedlich aktiv sind (Frank *et al.* 2005; Flockerzi *et al.* 2008) (Tab. 6). Der Locus c3_B wurde ausgewählt, da er vor allem im menschlichen Gehirn aktiv ist, c11_A aufgrund seiner geringen Aktivität im menschlichen Gewebe generell und c12_A diene als Negativ-Kontrolle, da dieser Locus im Gehirn komplett inaktiv ist. Die humane Teratokarzinom-Zelllinie Tera-1 wurde als Positivkontrolle verwendet, da HERV-K(HML-2) Proviren in dieser Zelllinie hoch aktiv sind und die in dieser Zelllinie aktiven Loci bereits identifiziert wurden (Flockerzi *et al.*, 2008; Ruprecht *et al.*, 2008). Deshalb wurde auch der Locus c22_A mit einbezogen, da 50% der transkriptionellen Aktivität der HERV-K(HML-2) Gruppe in Tera-1 Zellen auf diesen Locus zurückzuführen sind.

Betrachtet man die HERV Gruppe HERV-K(HML-2) näher, findet man rund 60 provirale Sequenzen und ca. 2500 einzelne LTR Elemente im menschlichen Genom (Mager *et al.* 2003). Hinzu kommt, dass das menschliche Genom insgesamt etwa eine halbe Million retroviraler LTR Sequenzen enthält. Dadurch wird die Optimierung individueller Primersequenzen, die die Analyse eines einzigen Locus ermöglichen, erschwert. Das Problem wurde dadurch gelöst, dass die „forward“ Primer so gewählt wurden, dass die Sequenz mit etwa 20 Basen im 5' flankierenden Bereich beginnt und sechs Basen in die 5' HERV-K(HML-2) LTR hineinragt. Damit konnten Primer etabliert werden, die spezifisch jeden einzelnen der sieben Loci erkennen. Diese Locus-spezifischen „forward“ Primer wurden mit einem HERV-K(HML-2) Primer aus dem Ende der U3 Region der LTR kombiniert (Lavie *et al.*, 2005) (Abb. 23). Der Methylierungsstatus einzelner HERV-K(HML-2) Loci wurde mittels Bisulfit-Sequenzierung ermittelt, und mindestens fünf unabhängige Klone wurden analysiert.

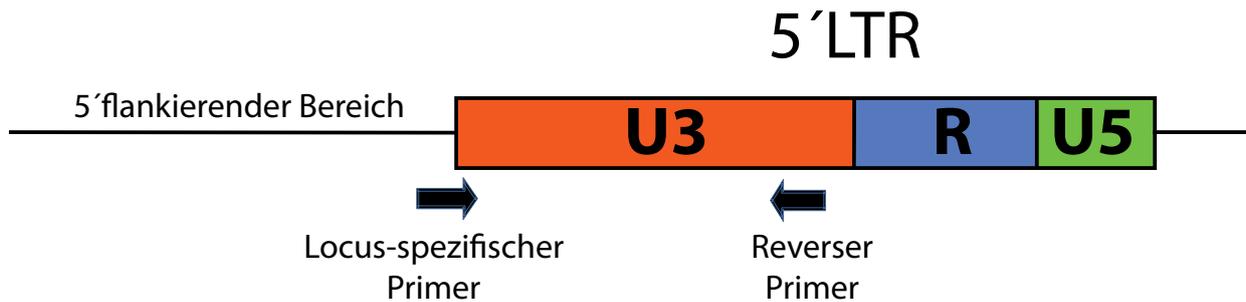


Abb. 23 Lage der optimierten Locus-spezifischen Primer. Zur Analyse des Methylierungsstatus einzelner HERV-K(HML-2) Loci mussten spezifische Primersequenzen gefunden und einzelne Primer optimiert werden. Da es mehr als 2500 LTR Sequenzen der gleichen HERV Gruppe im menschlichen Genom gibt, wurden die „forward“ Primer so gewählt, dass sie im flankierenden Bereich starten und mit sechs Basen in die U3 Region des HERV-K(HML-2) Elements hineinragen. Der jeweils spezifisch auf einen Locus zugeschnittene Primer wurde mit einem „reverse“ Primer am Ende der U3 Region kombiniert (Lavie *et al.*, 2005). Jede Primerkombination unterschied sich in ihrer spezifischen Annealingtemperatur.

3.2.1.1 Methylierungsanalyse von unterschiedlich aktiven HERV-K(HML-2) Loci in der Modellzelllinie Tera-1

Aufgrund der allgemein hohen HERV-K(HML-2) Aktivität in Tera-1 Zellen diente diese als Positiv-Kontrolle. Deshalb wurde zunächst der Methylierungsgrad der sieben ausgewählten Loci in dieser Zelllinie untersucht. Insgesamt zeigten die meisten untersuchten Loci eine geringe Methylierung unter 50%. Betrachtet man den in Tera-1 Zellen deutlich aktiven Locus c22_A (Flockerzi *et al.*, 2008), so konnte eine fast vollständige Demethylierung der Promotorsequenz festgestellt werden. Lediglich 2% der CpG Dinukleotide waren methyliert (Abb. 24). Dies weist auf eine inverse Korrelation zwischen DNA-Methylierung und transkriptioneller Aktivität des HERV-K(HML-2) Locus hin. Einen ebenfalls geringen Methylierungsgrad zeigte Locus c11_A mit 14%. Locus c5_A war zu 25% und Locus c6_A zu 31% methyliert. Für die Loci c7_A und c12_A konnte ein Methylierungsgrad von 46% bzw. 43% ermittelt werden. Deutlich stärker methyliert mit 73% war Locus c3_B.

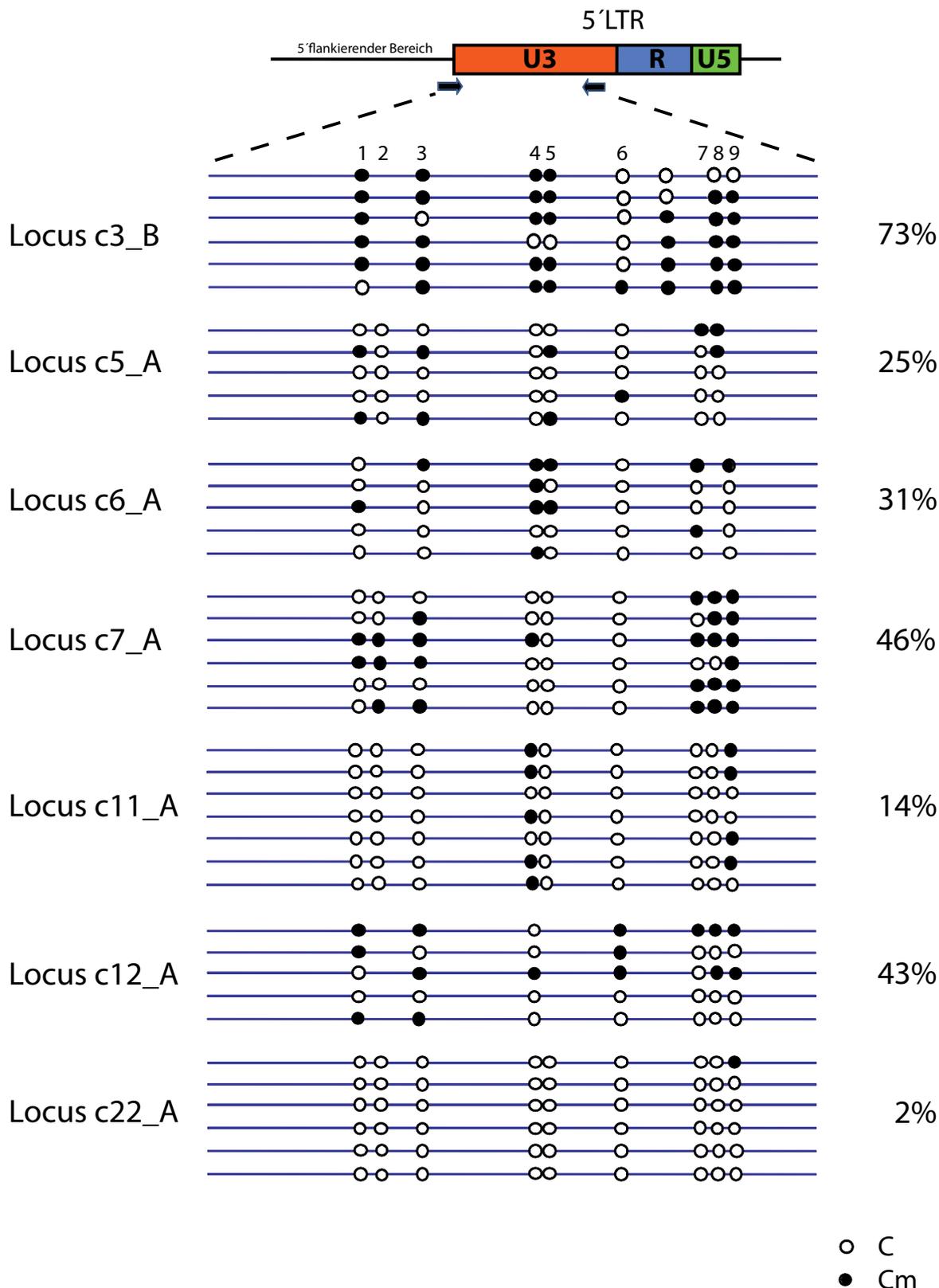


Abb. 24: Schematische Darstellung des Methylierungsstatus einzelner HERV-K(HML-2) Loci in Tera-1 Zellen. Insgesamt wurde die U3 Region von sieben HERV-K(HML-2) Loci mittels Bisulfit-Sequenzierung analysiert. Schwarz ausgefüllte Kreise repräsentieren methylierte und helle Kreise nicht-methylierte CpG Dinukleotide. Schematisch dargestellt ist die LTR mit der Lokalisation der beiden Primer. Der „forward“ Primer beginnt im 5' flankierenden Bereich und reicht mit sechs Basen in die U3 Region hinein.

3.2.1.2 Methylierungsanalyse der 5´LTR unterschiedlich aktiver HERV-K(HML-2) Loci in gesundem Gehirngewebe

Im Vergleich zu Tera-1 Zellen konnte im gesunden Gehirn ein deutlich höherer Methylierungsgrad für alle sieben HERV-K(HML-2) Loci ermittelt werden (Abb. 25). Es waren mindestens 80% der CpG Dinukleotide methyliert, d.h. die beiden Loci c5_A und c6_A waren zu 80%, Locus c11_A zu 83% und c3_B zu 85% methyliert. Einen Methylierungsgrad von 89% zeigten die Loci c7_A und c22_A. Eine vollständige Methylierung der Promotorsequenz von 98% war für den inaktiven Locus c12_A zu sehen. Dies weist erneut auf eine inverse Korrelation zwischen DNA-Methylierung und transkriptioneller Aktivität eines HERV-K(HML-2) Locus hin.

3.2.1.3 Methylierungsanalyse der 5´LTR unterschiedlich aktiver HERV-K(HML-2) Loci im Gehirngewebe eines schizophrenen Patienten

Transkripte von zwei HERV-K(HML-2) Loci, c6_A und c7_A, wurden nur in einem Patienten mit Schizophrenie nachgewiesen (Flockerzi *et al.*, 2008). Deshalb wurde dieser Patient stellvertretend ausgewählt, um den Methylierungsstatus verschiedener HERV-K(HML-2) Loci zu untersuchen. Außerdem wird die Subgruppe HERV-K10, zu der der Locus c5_A als einziger aktiver Vertreter zuzuordnen ist, überwiegend in Patienten mit Schizophrenie oder Bipolaren Erkrankungen exprimiert. Es stellte sich die Frage, warum manche Loci eine unterschiedliche Aktivität in einigen Patienten aufweisen und ob die DNA-Methylierung eine kausative Rolle spielen könnte. Deshalb wurde das Methylierungsmuster der sieben HERV-K(HML-2) Loci in Gehirngewebe eines Schizophreniepatienten untersucht.

Auch hier waren alle untersuchten HERV-K(HML-2) Loci zu mindestens 80% methyliert (Abb. 26). Eine fast vollständige Methylierung der Promotorsequenz lag mit 94% für Locus c12_A und 96% für Locus c22_A vor. Die beiden Loci c6_A und c7_A, deren Aktivität einzig in dem analysierten Patienten gefunden wurde, waren mit 80 bzw. 85% im Vergleich zu den übrigen Loci am geringsten methyliert. Ein hoher Methylierungsgrad von 89% wurden ebenso für den Locus c5_A festgestellt. Die im Gehirn nur schwach exprimierten Loci c3_B und c11_A waren zu 96% bzw. 58% ebenfalls stark methyliert.

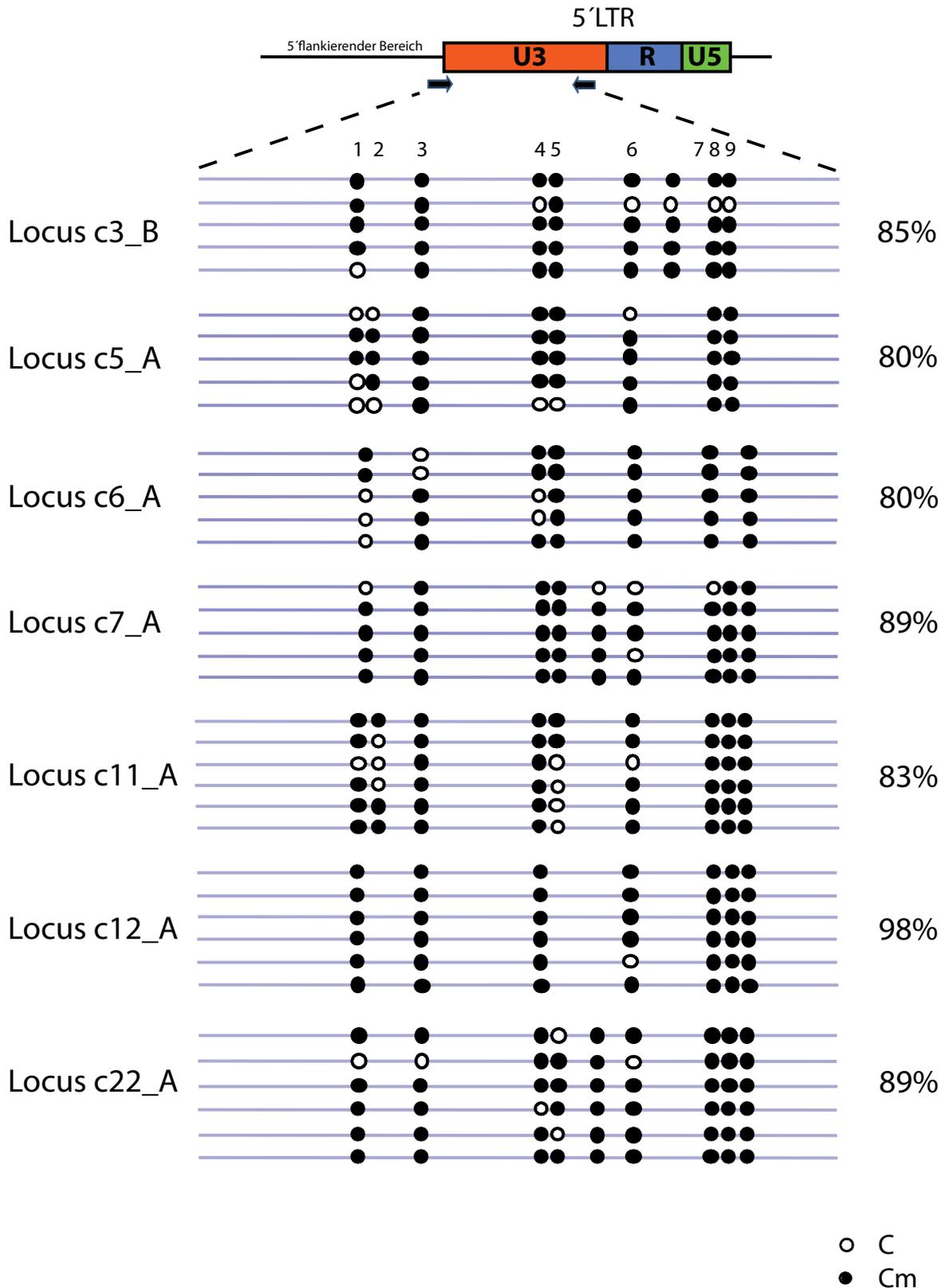


Abb. 25: Schematische Darstellung der Methylierung einzelner HERV-K(HML-2) Loci in einem gesunden Gehirn. Insgesamt wurde die U3 Region von sieben HERV-K(HML-2) Loci mittels Bisulfit-Sequenzierung analysiert. Schwarz ausgefüllte Kreise repräsentieren methylierte und helle Kreise nicht-methylierte CpG Dinukleotide. Schematisch dargestellt ist die LTR mit der Lokalisation der beiden Primer. Der „forward“ Primer beginnt im 5' flankierenden Bereich und reicht mit sechs Basen in die U3 Region hinein.

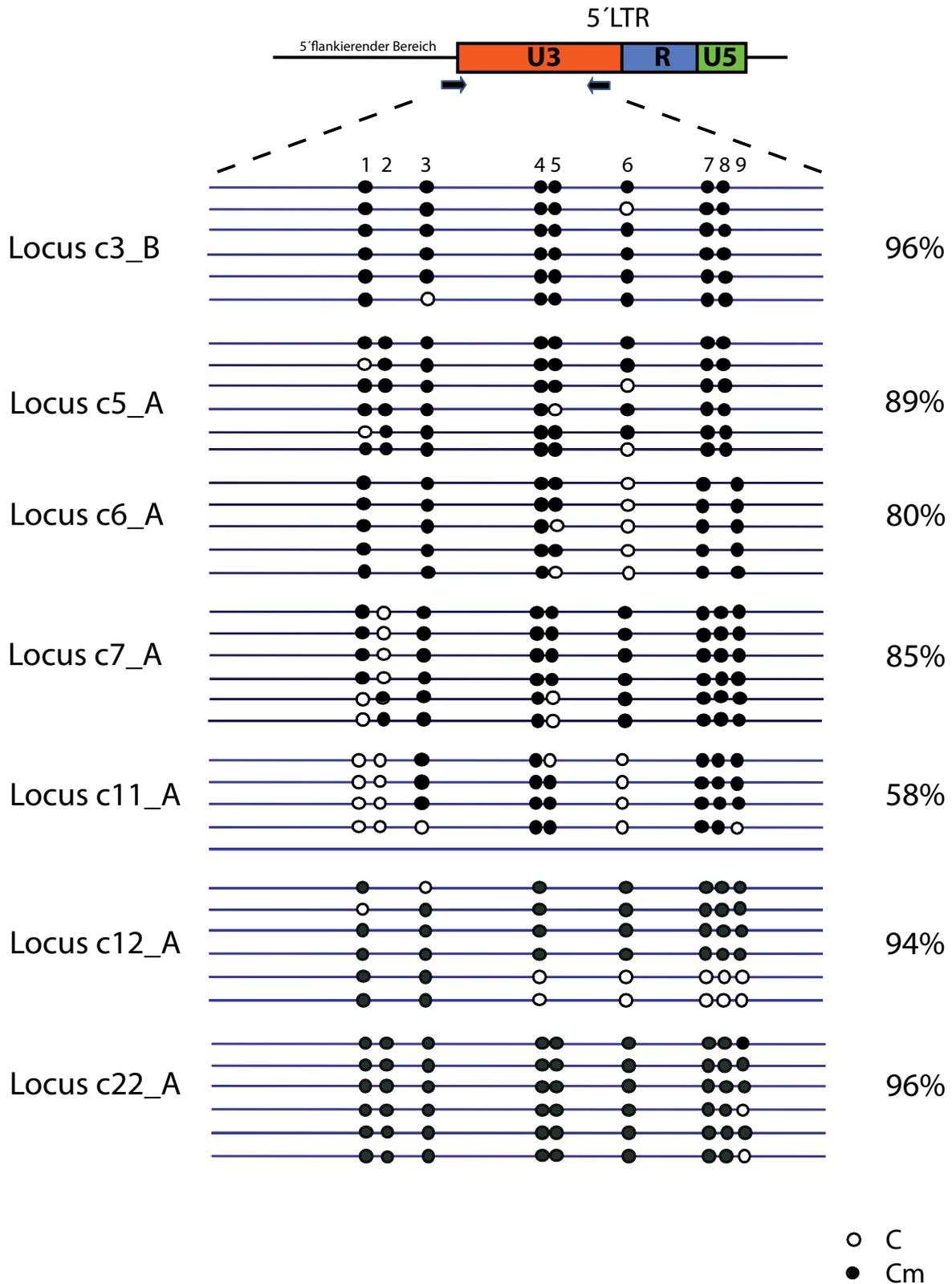


Abb. 26: Schematische Darstellung der Methylierung einzelner HERV-K(HML-2) Loci in einem schizophnen Patienten. Insgesamt wurde die U3 Region von sieben HERV-K(HML-2) Loci mittels Bisulfid-Sequenzierung analysiert. Schwarz ausgefüllte Kreise repräsentieren methylierte und helle Kreise nicht-methylierte CpG Dinukleotide. Schematisch dargestellt ist die LTR mit der Lokalisation der beiden Primer. Der „forward“ Primer beginnt im 5'flankierenden Bereich und reicht mit sechs Basen in die U3 Region hinein.

3.2.1.4 Korrelation zwischen Methylierungsgrad und Locus-Aktivität

Beim Vergleich des Methylierungsstatus einzelner HERV-K(HML-2) Loci muss einerseits die relative Transkripthäufigkeit dieser Loci berücksichtigt werden und diese andererseits in Relation zur gesamten HERV-K(HML-2) Aktivität in den betreffenden Proben stehen.

Die Quantifizierung der Gesamt-HERV-K(HML-2) Aktivität in Tera-1 Zellen und in den *postmortem* Gehirnproben erfolgte mittels qRT-PCR. Hierfür wurden spezifische Primer im *gag*-Bereich verwendet, da dieser Bereich auch für die Identifizierung transkriptionell aktiver Loci herangezogen worden war. Um eine Korrelation zwischen relativer Transkripthäufigkeit und Gesamt-HERV-K(HML-2) Aktivität zu ermöglichen, wurde der *gag* „forward“ Primer aus der Transkriptanalyse beibehalten und als zweiter Primer eine Sequenz ausgewählt, die ein für die quantitative PCR geeignetes Produkt mit einer Länge von etwa 150 Basen generiert.

Abb. 27 zeigt die bereits früher analysierte Zusammensetzung transkriptionell aktiver HERV-K(HML-2) Loci in Tera-1 Zellen und in den beiden oben analysierten *postmortem* Gehirnproben eines Gesunden und eines Schizophrenen (Flockerzi *et al.*, 2008, Ruprecht *et al.*, 2008) bezogen auf die mit qRT-PCR ermittelte Gesamtmenge an HERV-K(HML-2) Transkripten. Beide *postmortem* Proben zeigen eine ähnliche Zusammensetzung transkriptionell aktiver Loci und unterscheidet sich wesentlich von der Zusammensetzung der HML-2 Transkripte in Tera-1 Zellen.

Eine vergleichsweise starke Expression von HERV-K(HML-2) in Tera-1 Zellen wurde bereits im HERV-spezifischen Microarray beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Quantifizierung durch qRT-PCR ergab für Tera-1 Zellen eine um das Fünffache höhere HERV-K(HML-2) Expression verglichen mit den beiden Gehirnproben (Abb. 27). Aufgrund der vergleichsweise hohen HERV-K(HML-2) Aktivität in Tera-1 Zellen konnten diese Zellen als Positivkontrolle herangezogen und deren Expression zur Normierung auf 100% gesetzt werden. Die prozentuale Zusammensetzung der Transkripte der aktiven Loci wurde auf den durch qRT-PCR ermittelten Wert für die gesamte HERV-K(HML-2) Expression in den jeweiligen Zellen bezogen. Vergleicht man den Methylierungsgrad der untersuchten HERV-K(HML-2) Loci mit der Transkriptionsaktivität dieser Loci bezogen auf die Gesamt-HERV-K(HML-2) Aktivität, so findet man ebenfalls eine inverse Korrelation. Wie in Abb. 24 gezeigt, reicht der Methylierungsgrad ausgewählter HERV-K(HML-2) Loci in Tera-1 Zellen von 2% bis 73%. HERV-K(HML-2) Proviren waren insgesamt in Tera-1 Zellen stark aktiv (Abb. 27). Im Gegensatz dazu waren alle Loci im Hirngewebe eines Gesunden und eines schizophrenen Patienten mit über 80% stark methyliert (vgl. Abb. 25 und 26). Es war eine deutlich geringere Gesamt-HERV-K(HML-2) Aktivität in beiden *postmortem* Gehirnproben im Vergleich zu Tera-1 Zellen zu verzeichnen (Abb. 27).

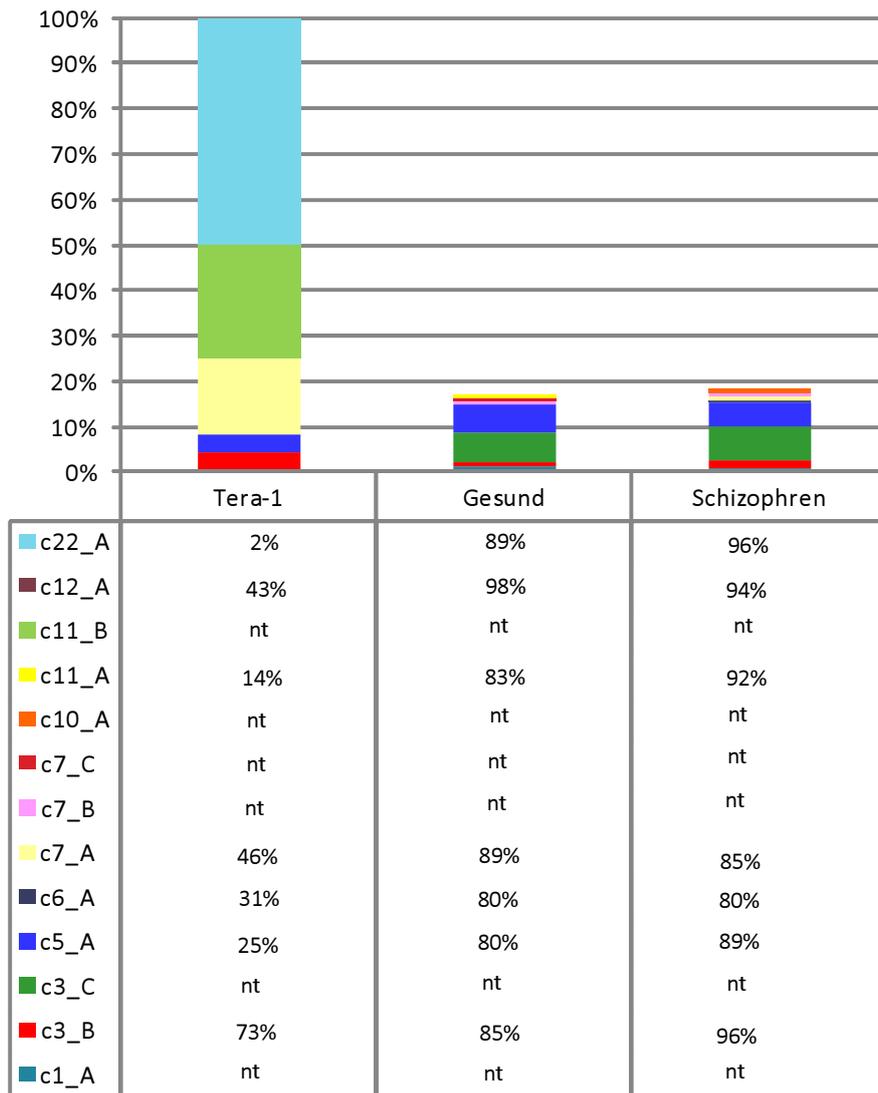


Abb. 27: HERV-K(HML-2) Aktivität in Tera-1 Zellen und *postmortem* Gehirnproben eines Gesunden und eines Schizophrenie-Patienten und Methylierungsgrad ausgewählter Loci. Die Gesamtaktivität von HERV-K(HML-2) wurde mit *gag*-spezifischen Primern anhand einer qRT-PCR bestimmt. Die Expression von HERV-K(HML-2) in der Positivkontrolle Tera-1 wurde zur Normierung herangezogen (100%). Der quantitative Wert wurde in Bezug zu der bereits im Vorfeld ermittelten Zusammensetzung transkriptionell aktiver Loci gesetzt (Flockerzi *et al.*, 2008; Ruprecht *et al.*, 2008) (nt: *not testatum*). Die Tabelle zeigt einen Überblick über den Methylierungsgrad der einzelnen HERV-K(HML-2) Loci.

3.3 Einfluss von VPA auf einzelne HERV-K(HML-2) Loci am Beispiel einer Modellzelllinie - Effekte auf epigenetischer Ebene?

Zwar haben die Medikamente Valproinsäure, Haloperidol, Risperidon und Clozapin nachweislich keinen Einfluss auf die Gesamtaktivität von HERV-K(HML-2) (vgl. 3.1), jedoch muss dies nicht für jeden einzelnen Locus zutreffen. Um die Auswirkung der Medikation auf verschiedene HERV-K(HML-2) Loci im Vergleich zu unbehandelten Zellen unter standardisierten Bedingungen zu testen, wurde die neurale Stammzelllinie HNSC.100 als Modell verwendet. Die proviralen Loci wurden sowohl auf die Methylierung der HERV LTR Promotorregion als auch auf Chromatinmodifikationen hin untersucht. Dazu wurden HERV-K(HML-2) Loci ausgewählt, die in vorangegangenen Untersuchungen in Gehirnpoben als differentiell aktiv identifiziert worden waren (Flockerzi *et al.* 2008), und deren Methylierungsmuster sowohl in Gehirngewebe als auch in der Teratokarzinomzelllinie Tera1 bestimmt worden waren (vgl. 3.2.1).

3.3.1 Methylierungsstatus ausgewählter HERV-K(HML-2) Loci in der Gehirnzelllinie HNSC.100 nach Behandlung mit antipsychotischen Medikamenten

Zunächst wurde der Methylierungsgrad ausgewählter HERV-K(HML-2) Loci in der unbehandelten neuronalen Stammzelllinie HNSC.100 analysiert. Über die epigenetischen Wirkungen von Haloperidol, Risperidon und Clozapin in menschlichen Zellen ist derzeit wenig bekannt. Jedoch berichteten Shimabukuro *et al.* von einer Haloperidol-induzierten Veränderung in der DNA-Methylierung von Leukozyten in Ratten (Shimabukuro *et al.* 2006). Auch konnte durch Clozapin die Hypermethylierung des *reelin* Promotors in Mäusen rückgängig gemacht werden (Dong *et al.* 2008). Um zu testen, ob VPA, Haloperidol, Risperidon oder Clozapin den Methylierungsgrad einzelner HERV-K(HML-2) Loci beeinflussen können, wurden Zellen 24 h mit den Medikamenten behandelt und genomische DNA für die Methode der Bisulfit-Sequenzierung isoliert. Außerdem wurden die Zellen zusätzlich mit dem Antikrebs-Medikament 5-Azacytidin behandelt, das als Cytidin-Analogen effektiv die DNA-Methylierung verhindern kann.

Tab. 7: Methylierungsstatus sechs ausgewählter HERV-K(HML-2) Loci in der Modellzelllinie HNSC.100 im unbehandelten Zustand.

Locus	Methylierungsgrad
c3_B	59%
c5_A	44%
c6_A	36%
c7_A	37%
c11_A	60%
c12_A	26%

Der Methylierungsgrad aller untersuchten Loci in unbehandelten HNSC.100 Zellen war eher gering (Tab. 7). Der Locus c12_A war mit 26% am wenigsten und der Locus c3_B mit 59% bzw. c11_A mit 60% am stärksten methyliert. Die übrigen drei Loci c5_A, c6_A und c7_A lagen mit 44%, 36% und 37% im Mittelfeld. Insgesamt entsprach damit die Methylierung der HERV-K(HML-2) Loci in HNSC.100 Zellen eher dem Methylierungsgrad in der Teratokarzinomzelllinie Tera-1 als dem in Gehirngewebe (vgl. 3.2.1.1). Vergleicht man den Methylierungsstatus von Locus c3_B in HNSC.100 Zellen, die mit unterschiedlichen Medikamenten im nicht-zytotoxischen Bereich behandelt wurden, so konnten nur leichte Schwankungen festgestellt werden (Tab. 8). Während in unbehandelten Zellen der Locus c3_B zu 59% methyliert war, war nach Behandlung mit VPA, aber auch mit Haloperidol oder Risperidon ein geringer Anstieg methylierter CpG Dinukleotide auf 67%, 63% bzw. 68% zu verzeichnen. Lediglich nach Behandlung mit Clozapin- oder 5-Azacytidin erfolgte eine leichte Verminderung des Methylierungsgrades um etwa 3%. Insgesamt legen diese Befunde nahe, dass antipsychotische Medikamente die Methylierung des HERV-K(HML-2) c3_B Locus in HNSC.100 Zellen nicht wesentlich beeinflussen.

Tab. 8: Methylierungsgrad des Locus c3_B in HNSC.100 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 1 mM VPA, 5 μ M Haloperidol, 5 μ M Risperidon, 5 μ M Clozapin oder 1 μ M 5-Azacytidin im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Locus c3_B	Methylierungsgrad
unbehandelt	59%
VPA	67%
Haloperidol	63%
Risperidon	68%
Clozapin	55%
5-Azacytidin	56%

3.3.2 Chromatin-Status ausgewählter HERV-K(HML-2) Loci in VPA behandelten HNSC.100 Zellen mittels Chromatin-Immunopräzipitation

Antipsychotische Medikamente wie VPA wurden bereits mit einer Veränderung des Chromatin-Status in Zusammenhang gebracht (Dong *et al.*, 2008). Als Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACi) bewirkt VPA einen höheren Acetylierungsstatus von Histonen und damit eine Auflockerung des Chromatins. Dies kann eine erhöhte Genexpression zur Folge haben.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Überrepräsentation von HERV-K(HML-2) in Gehirnproben von schizophrenen und bipolaren Patienten (Frank *et al.*, 2005) eventuell auf den Einfluss verabreichter antipsychotischer Medikamente auf einzelne HERV-Loci zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde der Chromatin-Status von vier HERV-K(HML-2)-Loci (c3_B, c5_A, c6_A

und c7_A) in unbehandelten und mit 1 mM VPA behandelten HNSC.100 Zellen mittels Chromatin-Immopräzipitation (ChIP) analysiert. Der Locus c3_B wurde ausgewählt, da er im humanen Gehirn ubiquitär exprimiert wird und die Loci c5_A, c6_A und c7_A aufgrund ihrer Assoziation mit Schizophrenie. Anhand der neuronalen Stammzelllinie HNSC.100 sollte demonstriert werden, dass es möglich ist, den Chromatinstatus auf der Ebene einzelner HERV Loci zu untersuchen, da zu diesem Thema bisher noch keine Veröffentlichungen existieren. Es ist anzunehmen, dass die Regulation der HERV-Expression durch Modifizierung der Histone ähnlich wie bei humanen zellulären Genen oder bei Retrotransposons der Maus verläuft (Martens *et al.* 2005; Mikkelsen *et al.* 2007; Maksakova *et al.* 2008).

Die Lokalisation der für jeden Locus spezifischen Primer entsprach dem Bereich, der auch für die Methylierungsanalysen herangezogen wurde und amplifiziert eine Sequenz des Promotorbereichs von HERV-K(HML-2) (vgl. 3.2). Für die ChIP wurden DNA-gebundene Proteine (vorwiegend Histone) mit der DNA durch Fixierung quervernetzt, die DNA durch Sonifikation fragmentiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern präzipitiert. Der Erfolg der Methode wurde durch die Präzipitation mit einem Antikörper gegen Histon 3 (H3) getestet. Als Negativkontrolle diente ein Antikörper gegen Immunglobulin G (IgG). Zum Nachweis eines aktiven Chromatinstatus wurde ein Antikörper gegen acetyliertes Histon 3 (H3Ac) verwendet, das ein genereller Marker für den aktiven Chromatinstatus und damit transkriptionell aktive Gene darstellt. Die präzipitierte DNA konnte anschließend mit für jeden Locus spezifischen Primern quantifiziert werden. Frühere Studien haben ergeben, dass VPA den Acetylierungsstatus des Chromatins und damit die Regulation des p21-Gens im Gehirn beeinflusst (Gurvich *et al.* 2004; Li *et al.* 2005). Daher wurden als Kontrolle außerdem zwei verschiedene Primerpaare zur Quantifizierung der Promotorregion des p21-Gens verwendet (Chen *et al.* 2004).

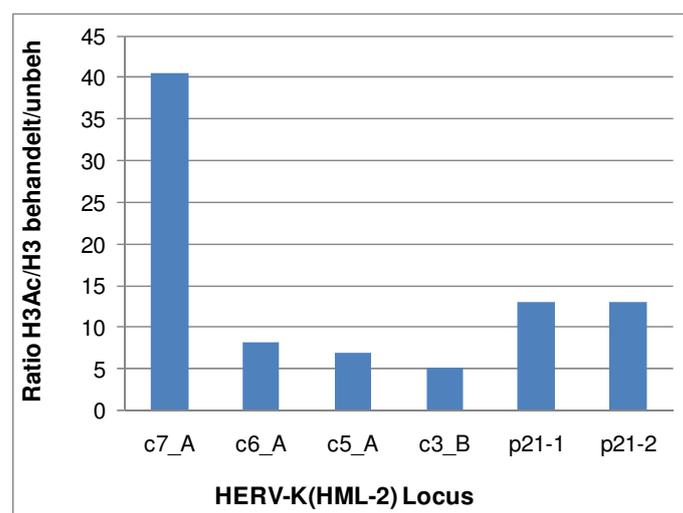


Abb. 28: Chromatin-Status vier ausgewählter HERV-K(HML-2) Loci (c7_A, c6_A, c5_A und c3_B) in mit VPA behandelten HNSC.100 Zellen bezogen auf unbehandelte Zellen. Dargestellt ist das Verhältnis von H3Ac zu H3 der VPA-behandelten Probe relativ zum Verhältnis von H3Ac zu H3 der unbehandelten Probe. Die Zellen wurden mit 1 mM VPA 24 h behandelt und der Chromatinstatus durch ChIP mit Antikörpern gegen H3 und die acetylierte Form H3Ac analysiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich der Chromatin-Status von p21 mit zwei verschiedenen Primerpaaren quantifiziert.

Es wurde für jeden Locus der Anteil der mit spezifischen Antikörpern gegen H3- und gegen H3Ac-präzipitierten DNA im Vergleich zum Ausgangsmaterial ermittelt und anschließend diese Anteile für H3 und H3Ac in Relation gesetzt. Dieses Verhältnis weist darauf hin, ob an einen spezifische Locus mehr oder weniger acetyliertes Chromatin gebunden ist.

Abb. 28 zeigt um welchen Faktor sich dieses Verhältnis in mit VPA behandelten Zellen von dem in nicht behandelten Zellen unterscheidet. Die Werte für präzipitierte DNA zu Ausgangsmaterial für IgG (Negativkontrolle) lagen stets unter 0,1. Betrachtet man Locus c7_A, so lag das Verhältnis acetyliertes, aktives Histon (H3Ac) zu H3 in behandelten Zellen um ein 40-faches höher als in un-behandelten Zellen. Im Gegensatz dazu blieben die Loci c6_A, c5_A und c3_B durch die Behandlung mit VPA eher unbeeinflusst. Ein Effekt von VPA auf p21 (circa 13 fache Erhöhung des Anteils an acetyliertem Histon 3) konnte mit beiden Primerpaaren bestätigt werden. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass VPA den Chromatinstatus einzelner HERV-K(HML-2) Loci beeinflussen kann.

3.4 Regulation der HERV-LTR gesteuerten Expression nach *de novo* Infektion mit HERV-MLV Hybridvektoren

Das menschliche Genom beinhaltet annähernd 500.000 endogene LTR („Long Terminal Repeat“) Sequenzen retroviralen Ursprungs, die als mobile regulatorische Elemente angesehen werden können. So wurden im Laufe der Evolution einige HERV-LTRs zur Regulation der zellulären Genexpression herangezogen. Aktuelle Studien berichten, dass mindestens 5,8% der menschlichen Gene von HERV-LTRs kontrolliert werden (Piriyapongsa *et al.* 2007; Conley *et al.* 2008). Viele LTRs sind noch transkriptionell aktiv und zeigen ein zelltypspezifisches Expressionsprofil. Aufgrund dieser Eigenschaften könnten HERV-LTRs nützliche Bausteine bei der Konstruktion zelltypspezifischer, retroviraler Vektoren sein, die in der Gentherapie Anwendungen finden können. Um dies zu testen wurden auf dem murinen Retrovirus MLV basierende Promotor-Konversionsvektoren verwendet, in die die entsprechende HERV-U3 oder U3-R Sequenz aus LTRs der HERV-Gruppen HERV-H oder HERV-L bereits kloniert waren (Schön *et al.* 2009). Beide HERV Gruppen unterscheiden sich in ihrem Expressionsprofil und ihrer Zelltypspezifität (Schön *et al.* 2001). Nach Infektion der Zielzelllinien MIAPaCa-2 (Pankreaskarzinom), HaCaT (Hautkeratinozyten), HeLa (Zervixkarzinom) und LC5-HeLa (HeLa-Subklon) (Mellert *et al.* 1990; Schön *et al.* 2009) mit den HERV-MLV Hybridvektoren vermittelt der entsprechende HERV-Promotor eine vom Zelltyp abhängige Expression des Reportergens eGFP, wie mittels FACS Analyse verfolgt werden konnte (Schön *et al.* 2009). HERV-L wird zelltypspezifisch exprimiert und zeigt fast ausschließlich eine hohe Expression in HaCaT und HeLa Zellen. Im Vergleich dazu ist HERV-H in vielen Zelllinien aktiv und zeigt in allen vier Zielzellen eine Expression.

Um herauszufinden, ob neu ins Genom eingebrachte HERV- LTRs über einen längeren Zeitraum aktiv bleiben und somit eine langfristige Expression des therapeutischen Gens vermitteln können, wurde nun die HERV LTR gesteuerte Reporterexpression acht repräsentativer mit pLXSN-

HERV-H oder pLXSN-HERV-L Hybridvektoren infizierter Zellklone über einen Zeitraum von sechs Monaten gemessen. Darüber hinaus sollten diese Untersuchungen Informationen darüber liefern, wie neu ins Genom eingebrachte HERV LTR Sequenzen im Vergleich zu den bisher analysierten, seit mehreren Millionen Jahren dauerhaft im Genom integrierten HERV Elementen reguliert werden.

3.4.1 Expressionsaktivität verschiedener HERV-H und HERV-L Vektoren in infizierten Zellklonen über einen Zeitraum von sechs Monaten

Es wurden jeweils zwei repräsentative Vertreter von insgesamt vier unterschiedlichen LXSN-HERV Klonen (Abb. 29, Tab. 9) kultiviert, um deren Promotoraktivität über mehrere Monate mittels FACS Analyse zu verfolgen.

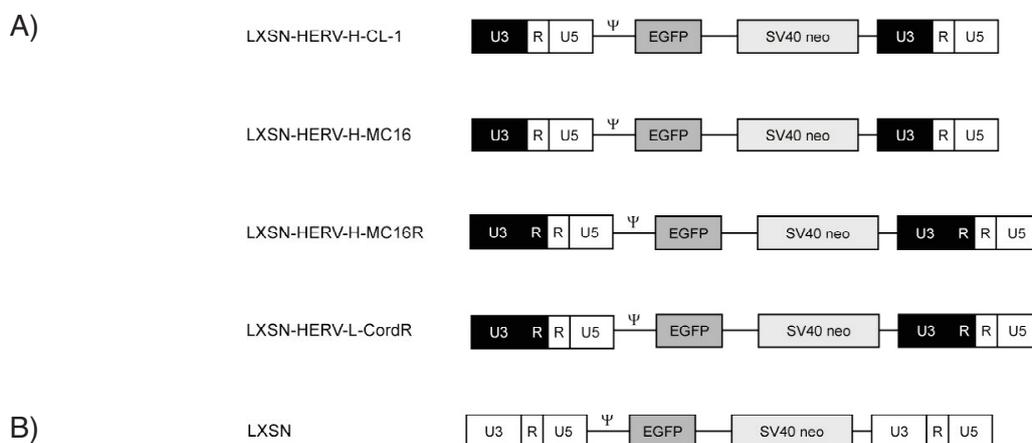


Abb. 29: Schematische Darstellung der vier Vektorkonstrukte, wie sie in den Zielzellen integriert als Proviren vorliegen (A). Zusätzlich ist der provirale Ausgangsvektor LXSN mit MLV-Promotor abgebildet (B). Schwarz gekennzeichnet sind die entsprechenden HERV-H oder HERV-L (U3 oder U3-R) Sequenzen. In Weiß dargestellt sind die MLV Regionen. Das Reportergen *egfp* steht unter der Kontrolle des entsprechenden HERV-Promotors bzw. im LXSN Vektor unter der Kontrolle des MLV Promotors. Für Selektionszwecke ist ein Neomycingen vorhanden, Ψ : Verpackungssignal.

Tab. 9: Vektorkonstrukte und Zellklone

Proviraies Vektorkonstrukt	Infizierte Zelllinien	
LXSN-HERV-L-CordR	HeLa	HaCaT
LXSN-HERV-H-CL1	MIAPaCa-2	LC5-HeLa
LXSN-HERV-H-MC16	MIAPaCa-2	LC5-HeLa
LXSN-HERV-H-MC16R	MIAPaCa-2	LC5-HeLa
LXSN	HeLa, MIAPaCa-2, LC5-HeLa, HaCaT	

Es handelte sich dabei um je zwei Klone von LXS_N-HERV-L-CordR in HeLa und HaCaT Zellen, sowie von LXS_N-HERV-H-CL1, LXS_N-HERV-H-MC16 und LXS_N-HERV-H-MC16R in MIAPaCa-2 und LC5-HeLa Zellen, deren Promotoraktivitäten bereits in früheren Untersuchungen ermittelt worden waren (Tab. 9) (Schön *et al.* 2009).

Die Zellen wurden aufgetaut und zwei Wochen in Selektionsmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen stets ohne Selektionsmedium passagiert und nach circa einer Woche erstmals nach dem Auftauen nach standardisierter Methode mittels FACS Analyse untersucht. Es wurden mindestens 50.000 Zellen auf ihre Grünfluoreszenz hin analysiert. Die Messungen erfolgten die ersten 16 Wochen im Abstand von jeweils zwei Wochen und anschließend alle drei Wochen. Währenddessen wurden die Zellen je nach Zelldichte alle drei bis vier Tage passagiert. Als Negativkontrolle wurden zusätzlich nicht infizierte Zellen (MIAPaCa-2, HaCaT, HeLa und LC5-HeLa) analysiert, die unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden und zur Standardisierung der FACS-Analyse dienten. Ebenfalls zur Kontrolle wurden jeweils die gleichen Zellen mit dem Ursprungsvektor pLXS_N (Abb. 29 B; Tab. 9), der anstelle eines HERV-Promotors einen MLV-Promotor beinhaltet, nach der von Schön *et al.* beschriebener Vorgehensweise infiziert und ebenfalls nach zweiwöchiger Selektion ohne Selektionsmedium weiter kultiviert (Schön *et al.* 2009). Um einen möglichen Einfluss des Einfrierens auf die Reporterogenaktivität auszuschließen, wurde die eine Hälfte eines LXS_N-Klons eingefroren, während die andere Hälfte unter standardisierten Bedingungen weiter kultiviert wurde. Ein Vergleich beider Reporterogenaktivitäten nach erneutem Auftauen der ersten Charge ergab keine Abweichungen (Daten nicht gezeigt).

Der prozentuale Anteil grün fluoreszierender Zellen aller acht Zelllinien über einen Zeitraum von sechs Monaten ohne Selektionsmedium ist in Abb. 30A-D dargestellt. Zum Vergleich wurden jeweils die Zellklone des gleichen Vektorkonstrukts in zwei unterschiedlichen Zelltypen zusammengefasst. Ebenfalls abgebildet ist jeweils die erste FACS Analyse zwei Wochen nach Infektion, die die Aktivität des jeweiligen HERV Promotors anhand der Expression des Reportergens demonstriert. Diese Daten sowie sieben der acht untersuchten Zellklone wurden freundlicherweise von Laura Leitner zur Verfügung gestellt. Der LC5-HeLa Zellklon mit dem integrierten Vektor LXS_N-HERV-H-MC16R wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit generiert (Diem, unveröffentlicht). In sieben der acht Fälle wiesen zu Beginn über 93% der Zellen eine HERV gesteuerte Reporterogenaktivität auf. Eine Ausnahme stellte der MIAPaCa-2 Klon LXS_N-HERV-H-MC16 dar, bei dem bereits die erste FACS Analyse nach zwei Wochen ergab, dass nur 30% aller Zellen das Reporterogen exprimierten (Abb. 30C).

Der HERV-L Promotor vermittelte in beiden LXS_N-HERV-L-CordR Zellklonen (HeLa und HaCaT) auch nach 28 Wochen eine äußerst stabile Expression des Reportergens *egfp* (Abb. 30A). Nach 25 Wochen war der Anteil fluoreszierender Zellen in LXS_N-HERV-L-CordR/HaCaT leicht zurückgegangen, jedoch konnte nach 28 Wochen erneut ein ähnlich hoher Anteil von über 95% gemessen werden, was auf eine stabile Expressionsaktivität hinweist. Die leichten Schwankungen könnten durch variierende Zellkulturbedingungen bedingt sein.

Eine ebenfalls konstante Expression über den gesamten Zeitraum war bei den Klonen LXS_N-HERV-H-CL1/MIAPaCa-2 und LXS_N-HERV-H-CL1/LC5-HeLa zu verzeichnen (Abb. 30 B).

Vergleicht man den Anteil grün fluoreszierender Zellen der LXS_N-HERV-H-MC16 Klone miteinander, so konnte in MIAPaCa-2 Zellen bereits nach acht Wochen ein Rückgang eGFP exprimierender Zellen von 30% bis auf etwa 15% festgestellt werden (Abb. 30C blau). Im Gegensatz dazu blieb der Anteil grün fluoreszierender Zellen in LC5-HeLa Zellen über sechs Monate konstant erhalten (rot dargestellt). Ähnlich verhielt sich der Vektor LXS_N-HERV-H-MC16R, der noch zusätzlich die R-Region der HERV-H LTR beinhaltet, in LC5-HeLa Zellen (Abb. 30D). So blieb der hohe Anteil von über 90% grün fluoreszierender Zellen in den LC5-HeLa Zellen auch nach 28 Wochen stabil. Jedoch fiel auch bei diesem Vektor in MIAPaCa-2 Zellen der Anteil grün fluoreszierender Zellen innerhalb von neun Wochen von 73% auf unter 40% ab (Abb. 30D blau). Nach 22 Wochen exprimierten nur noch 20% das Reportergen, jedoch stieg anschließend der Anteil wieder auf 38% an. Dieser Klon wies außerdem als einziger nach dem Auftauen einen Verlust von knapp 18% an grünen Zellen auf.

Insgesamt wurde in sechs von acht Zellklonen, deren Reportergenexpression über einen Zeitraum von mehr als sechs Monaten ohne Selektionsmedium gemessen wurde, eine stabile Expression nachgewiesen.

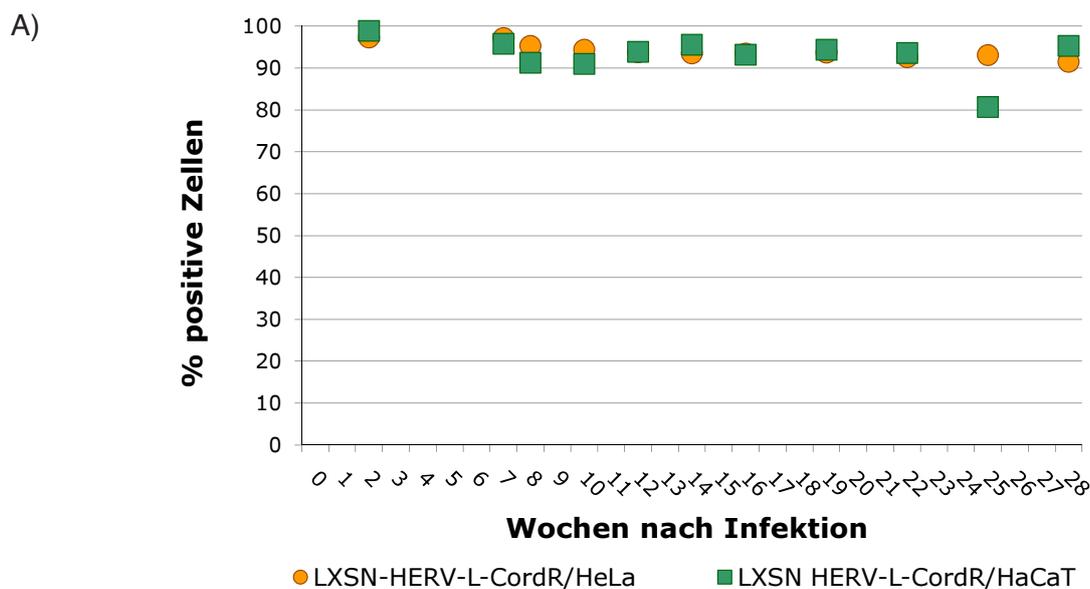
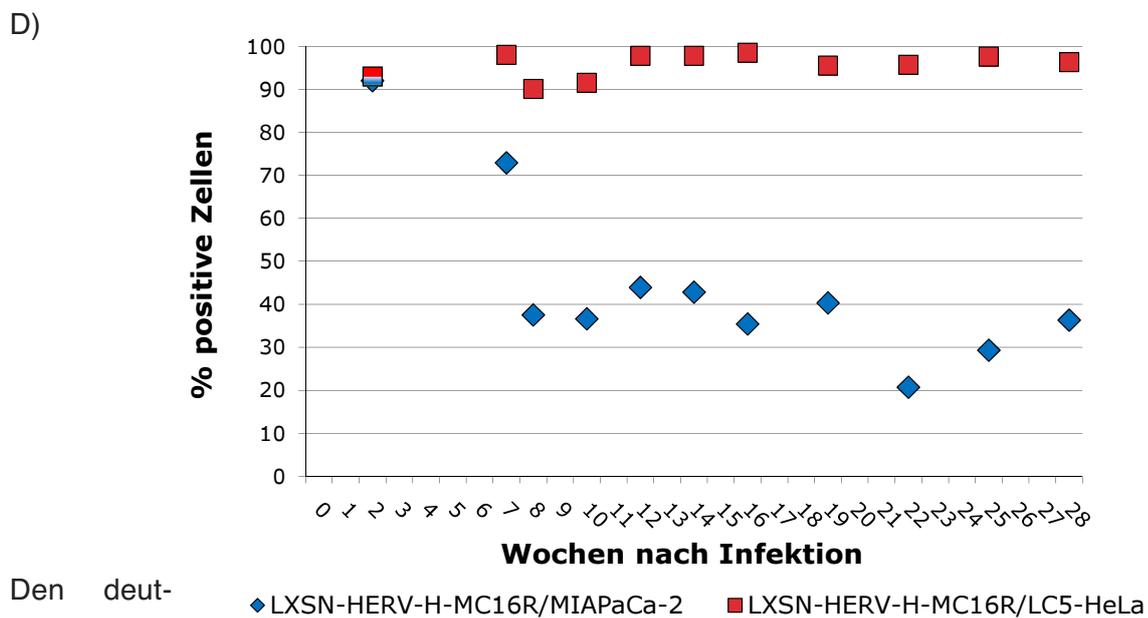
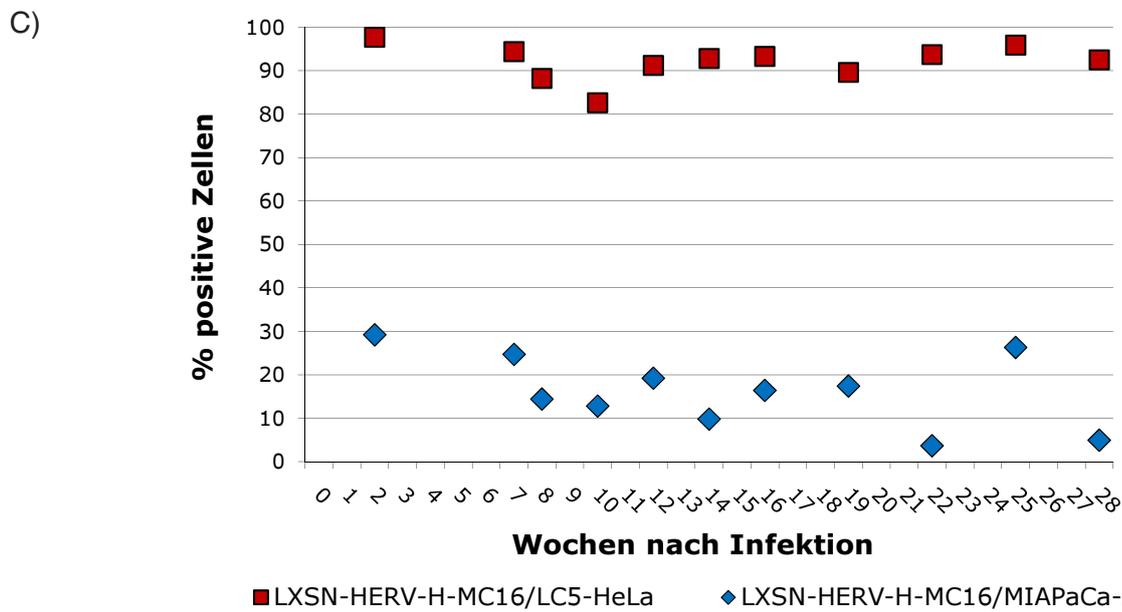
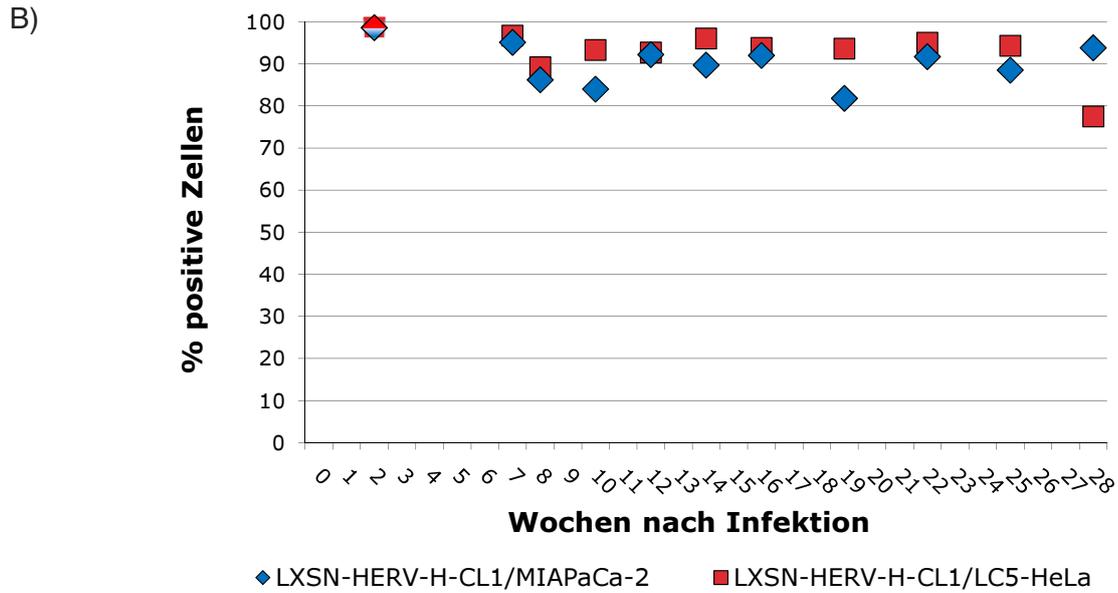


Abb. 30: HERV Promotor-gesteuerte Expression des Reportergens eGFP über einen Zeitraum von sechs Monaten. Es wurde jeweils die Grünfluoreszenz von zwei repräsentativen Zellklonen gemessen. Abgebildet sind mit LXS_N-HERV-L-CordR infizierte HeLa und HaCaT Zellen (A) und mit LXS_N-HERV-H-CL1 (B), LXS_N-HERV-H-MC16 (C) oder LXS_N-HERV-H-MC16R (D) infizierte MIAPaCa-2 und LC5-HeLa Zellen. Nach abgeschlossener zweiwöchiger Selektion nach der Infektion wurde die Reportergenaktivität der Zellklone mittels FACS Analyse bestimmt und die Zellen anschließend eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen nochmals zwei Wochen mit Selektionsmedium passagiert und anschließend stets ohne Selektionsmedium kultiviert. Die FACS-Analyse erfolgte anfangs alle zwei, ab der 16. Wochen alle drei Wochen nach standardisierter Methode (Schön *et al.* 2009). [Abb. B, C, D nächste Seite]



Den deut-

lichsten Verlust an Reporterogenaktivität wies, wie in Abb. 30D gezeigt LXS_N-HERV-H-MC16R in MIAPaCa-2 Zellen auf. Die dazugehörigen Histogramme nach zwei, sieben und 22 Wochen post Infektion sollen den Rückgang grün-fluoreszierender Zellen verdeutlichen (Abb. 31; grün dargestellt). Die Histogramme zeigen die Anzahl grün fluoreszierender Zellen in Abhängigkeit der Intensität der eGFP Fluoreszenz (FL1-H). Nach zwei Wochen war der Anteil nicht-fluoreszierender Zellen der gleichen Zellpopulation auf ein Minimum beschränkt (schwarze Linie). Nach sieben Wochen änderte sich jedoch das Verhältnis und der Anteil grün-fluoreszierender Zellen sank auf 72%. Nach 22 Wochen waren nur noch 20% der Zellen grün fluoreszierend. Die Gründe für den signifikanten Rückgang können vielfältigen Ursprungs sein. Dies sollte bei weiteren Untersuchungen geklärt werden.

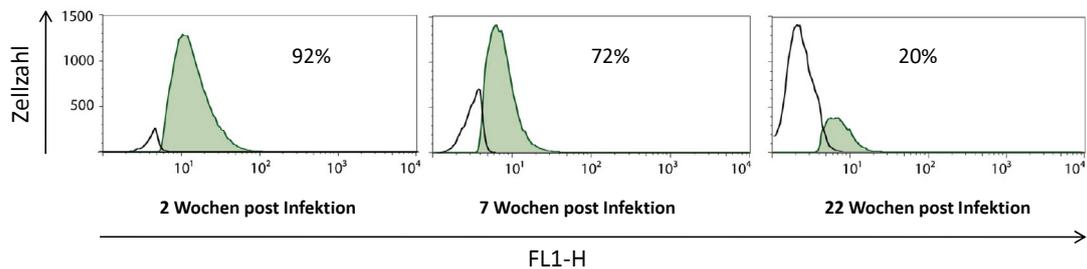


Abb. 31: Histogramme des Klons LXSN-HERV-H-MC16R/MIAPaCa-2 zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (2, 7 und 22 Wochen). Gemessen wurden stets der Anteil grün fluoreszierender Zellen (grün dargestellt) und die Intensität der Fluoreszenz (Kanal FL-1). Ebenfalls gezeigt ist der Anteil der gleichen Population nicht-fluoreszierender Zellen (schwarze Linie). Es wurden mindestens 50.000 Zellen ausgewertet.

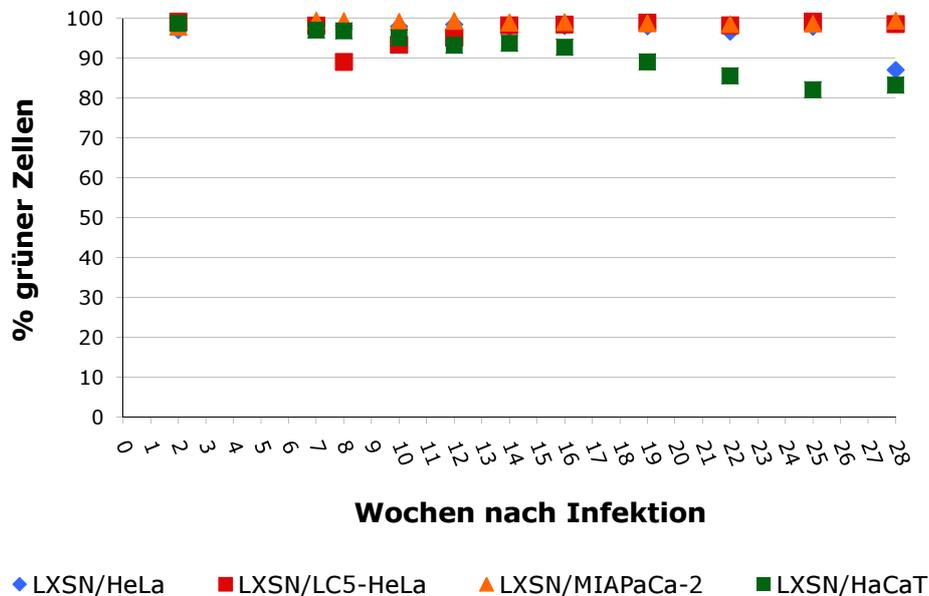


Abb. 32: MLV-Promotor gesteuerte Expression des Reportergens eGFP über einen Zeitraum von sechs Monaten. Die Zellen HeLa, LC5-HeLa, MIAPaCa-2 und HaCaT wurden mit dem Ursprungsvektor pLXS_N (Abb. 29B) infiziert, zwei Wochen selektioniert und die Reporterogenaktivität mittels FACS Analyse bestimmt. Die weitere Kultivierung erfolgte nach standardisierten Bedingungen ohne Selektionsmedium.

Zum Vergleich wurde zusätzlich der Anteil grün-fluoreszierender Zellen in den Klonen LXSN/HeLa, LXSN/LC5-HeLa, LXSN/MIAPaCa-2 und LXSN/HaCaT bestimmt. Drei Klone (LXSN/HeLa, LXSN/LC5-HeLa und LXSN/MIAPaCa-2) zeigten einen konstant hohen Prozentsatz von annähernd 100% grün fluoreszierender Zellen (Abb. 32). Eine Ausnahme stellte aufgrund eines leichten, aber stetigen Rückgangs um 18% der Klon LXSN/HaCaT dar.

3.4.2 Der Rückgang der Reporterexpression in MIAPaCa-2 Zellen ist vermutlich nicht auf einen Verlust des Provirus zurückzuführen

Eine Verminderung der Anzahl grün fluoreszierender Zellen einer Population könnte zunächst in einem Verlust des integrierten Vektors begründet sein. Um dies zu überprüfen wurde mittels qRT-PCR die relative Menge von *egfp* in der genomischen DNA in Bezug zu einem Referenzgen zu Zeitpunkten quantifiziert, an denen der größte Abfall an Reporterexpression zu verzeichnen war (Abb. 33). Dieser lag für LXSN-HERV-H-MC16R/MIAPaCa-2 bei acht und für LXSN-HERV-H-MC16/MIAPaCa-2 bei 14 Wochen nach Infektion. Als Bezugspunkt wurde die relative Menge des *egfp* Gens direkt nach dem Auftauen in Woche sieben nach Infektion bestimmt. Als Referenzgen wurde das *beta*-Globin verwendet, das in fünf funktionellen Kopien und einem Pseudogen pro haploidem Genom vorkommt. Es konnte keine verminderte Kopienzahl des *egfp* Reportergens im Vergleich zum Beta-Globin sowohl nach acht bzw. 14 Wochen nachgewiesen werden (Abb. 33). Dies lässt vermuten, dass die Anzahl der Proviren pro Zelle im Klon LXSN-HERV-H-MC16R/MIAPaCa-2 zu den gemessenen Zeitpunkten (sieben, acht und 14) in etwa konstant blieb, während die Expressionsaktivität von 74% auf 37% absank. Auch für LXSN-HERV-H-MC16 konnte in MIAPaCa-2 Zellen trotz reduzierter Reporteraktivität kein wesentlicher Unterschied in der relativen Menge des *egfp* Gens zu denselben Zeitpunkten ermittelt werden.

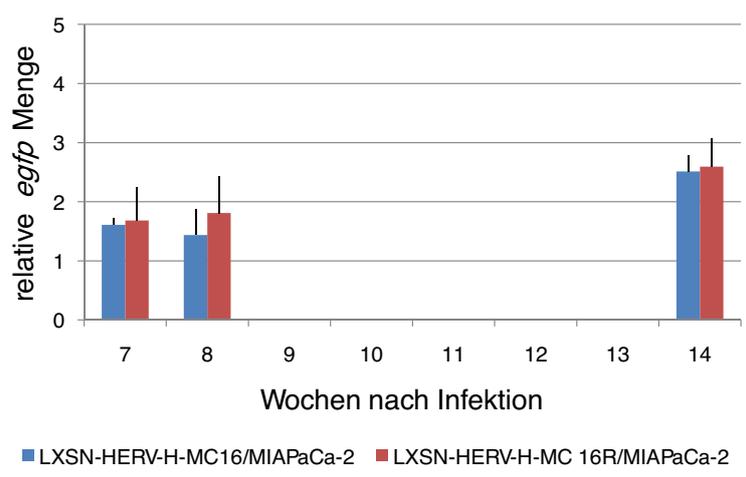


Abb. 33: Quantitative Bestimmung der Proviruskopien von LXSN-HERV-H-MC16 und LXSN-HERV-H-MC16R in MIAPaCa-2 Zellen nach sieben, acht und 14 Wochen nach Infektion. Die Zeitpunkte wurden gewählt, da nach acht bzw. 14 Wochen der größte Abfall der Reporterexpression zu verzeichnen war. Zur Quantifizierung mittels qRT-PCR diente als Referenzgen Beta-Globin. Die Messung erfolgte in Triplikaten, es wurden jeweils der Mittelwert und die dazugehörigen Standardabweichungen angegeben.

3.4.3 Mutationen im regulatorischen Bereich oder im Reporteragen als mögliche Ursache für die verringerte Expression

Als weitere mögliche Ursache für den Aktivitätsabfall der beiden Vektoren in MIAPaCa-2 Zellen wurde untersucht, ob die reduzierte transkriptionelle Aktivität durch Mutationen im regulatorischen Bereich der LTR oder in der Reporterensequenz verursacht wird. Um die regulatorischen Sequenzen der LTR aus der genomischen DNA der Zellen zu isolieren, wurden Primer verwendet, die die 1,2 kb großen Fragmente von Beginn der HERV U3-Region bis zum Anfang von *egfp* amplifizierten. Zusätzlich wurde das gesamte *egfp* Reporteragen amplifiziert und beide Amplifikate wurden in den Vektor pGEMT kloniert. Es wurden acht bis zehn Sequenzen eines jeden Abschnittes der Klone LXSN-HERV-H-MC16/MIAPaCa-2 und LXSN-HERV-H-MC16R/MIAPaCa-2 ausgewertet.

Sowohl im Klon LXSN-HERV-H-MC16/MIAPaCa-2 als auch LXSN-HERV-H-MC16R/MIAPaCa-2 waren keine Mutationen in der 5' LTR nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte bei LXSN-HERV-H-MC16R/MIAPaCa-2 eine Deletion im MLV R-U5 Bereich innerhalb der 3' LTR gefunden werden, die jedoch keinen Einfluss auf die HERV-vermittelte Reporteragenaktivität ausübt. Das Reporteragen *egfp* war in beiden Fälle vollständig intakt (Daten nicht gezeigt).

3.4.4 Behandlung eines teilweise inaktivierten Zellklons mit verschiedenen epigenetisch wirksamen Medikamenten - ein Reaktivierungsversuch

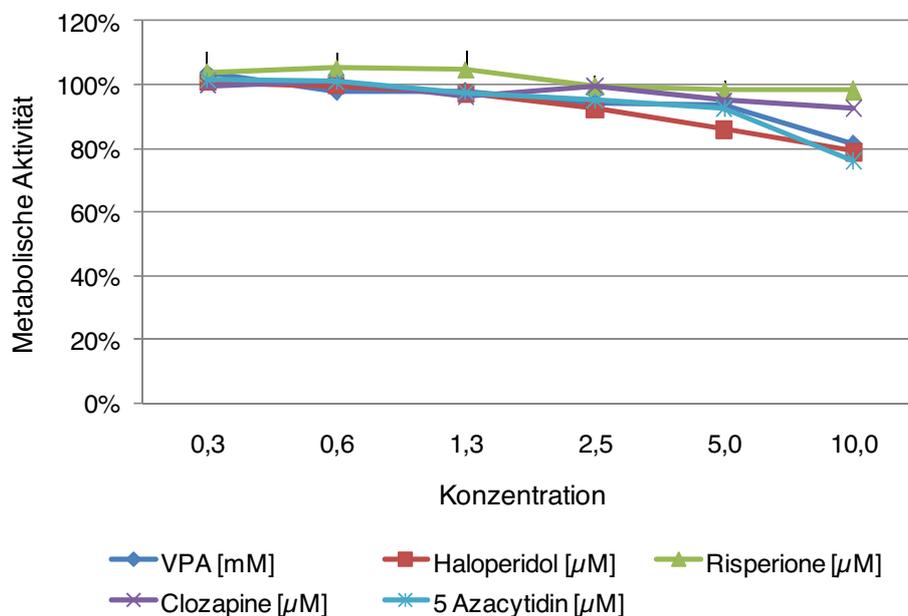
Eine weitere Ursache für den Abfall der Genexpression könnte das Stilllegen des entsprechenden Promotorabschnittes durch epigenetische Modifikationen sein. So kann die transkriptionelle Aktivität durch Bindung einer Methylgruppe am C5-Atom eines Cytosins in einem CpG Dinukleotid beeinflusst werden (vgl. 1.2.6). Es ist bekannt, dass die DNA Methylierung eine wichtige Rolle im Säuger genom spielt, um die Retrotransposition von HERVs und anderen Retroelementen zu verhindern (Yoder *et al.* 1997). Tatsächlich sind viele HERVs aufgrund von DNA Methylierung inaktiv (Reiss *et al.* 2007, Lavie *et al.* 2005). Außerdem können auch Chromatinmodifikationen, wie die Acetylierung von Histon-Proteinen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen (vgl. 1.2.6). Während die Acetylierung von Histonen (überwiegend von H3) zu einer Auflockerung des Chromatins und damit zu einer transkriptionellen Aktivierung führen kann, bedingt die Deacetylierung von Histonen eine Kondensation des Chromatins und damit eine Repression der Transkription. Einen indirekten Hinweis für eine Beteiligung der DNA Methylierung oder Chromatin-Modifikation kann die Behandlungen mit verschiedenen Medikamenten liefern, die DNA und/oder Chromatin epigenetisch modifizieren können.

3.4.4.1 Zytotoxische Effekte verschiedener Medikamente auf MIAPaCa-2 Zellen

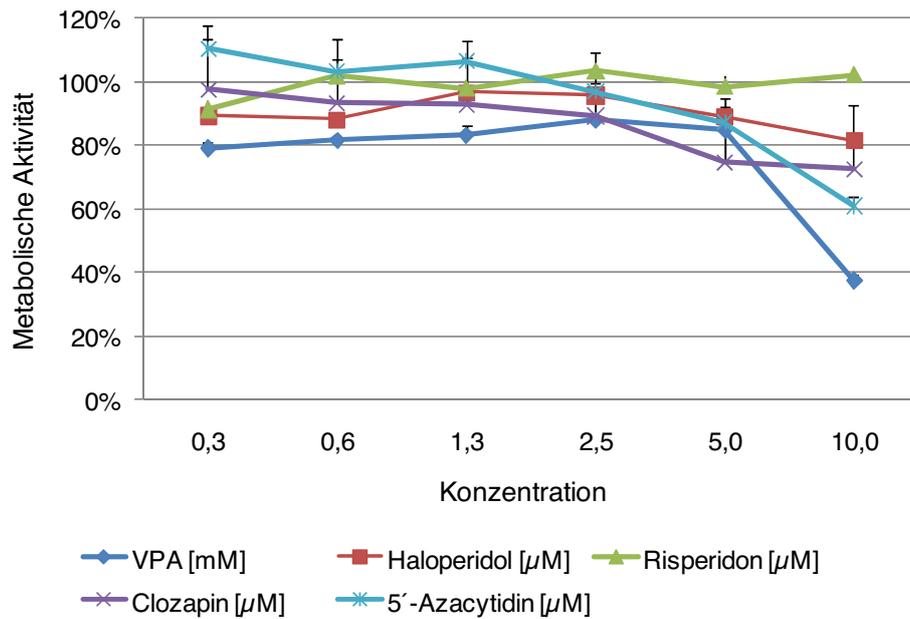
Zunächst wurde die Vitalität der MIAPaCa-2 Zellen nach Zugabe verschiedener Medikamente mit Hilfe eines MTT Tests überprüft. Dazu wurden ansteigende Konzentrationen (0,3 bis 10 μM) der Medikamente Haloperidol, Risperidon, Clozapin und 5-Azacytidin sowie VPA (0,3 bis 10 mM) verwendet und die Zellen insgesamt 24 h, 48 h oder 72 h inkubiert. Aufgrund der Instabilität von 5-Azacytidin in wässrigen Lösungen mit einem Aktivitätsverlust von etwa 10% innerhalb von drei Stunden, wurde dieses Medikament täglich frisch verabreicht.

Bei allen Behandlungen waren nach 24 h selbst bei den höchsten Konzentrationen keine signifikanten zytotoxischen Effekte sichtbar (Abb. 34A). Das MTT Signal als Maß für die Zellvitalität lag im Vergleich zu unbehandelten Zellen immer über 80%. Im Gegensatz dazu war nach 48 h Inkubation vor allem mit VPA (bei 10 mM Rückgang auf etwa 40%) und 5-Azacytidin (bei 10 μM Rückgang auf unter 60%) eine Beeinträchtigung der Zellvitalität zu verzeichnen (Abb. 34B). Auch Clozapin ließ ab einer Konzentration von 5 μM einen leichten Rückgang erkennen. Haloperidol und Risperidon zeigten unabhängig von der Konzentration einen ähnlichen Verlauf in der Zellvitalität. Nach 72 h war ein deutlich zytotoxischer Effekt in VPA-behandelten Zellen sichtbar (Abb. 34C). Nach Behandlung mit 5 mM VPA sank der Wert auf unter 60% und nach Behandlung mit 10 mM VPA auf unter 17%. Aufgrund der Resultate wurden die Konzentrationen der Medikamente so gewählt, dass keine Einbußen in der Zellvitalität zu erwarten waren. Es wurde in weiterführenden Experimenten von VPA 1 mM, von Haloperidol, Risperidon und Clozapin 5 μM und von 5-Azacytidin 1 μM verwendet.

A)



B)



C)

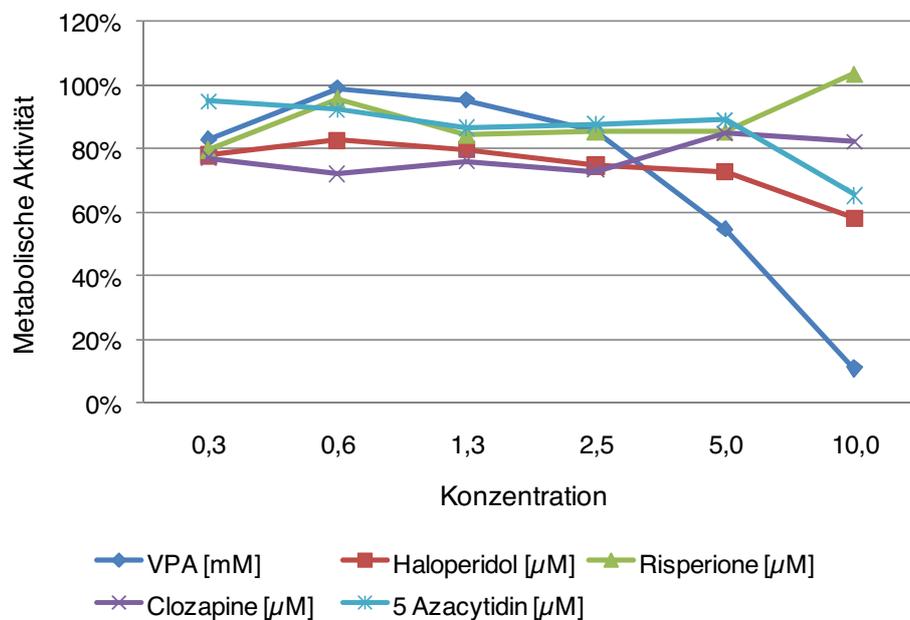


Abb. 34: Untersuchung des zytotoxischen Effekts verschiedener Medikamente auf MIAPaCa-2 Zellen mit Hilfe eines MTT Tests nach standardisierten Bedingungen. Die Zellen wurden 24 h (A), 48 h (B) oder 72 h (C) mit ansteigenden Konzentrationen von Haloperidol, Risperidon, Clozapin oder 5-Azacytidin (0,3 bis 10 µM) bzw. VPA (0,3 bis 10 mM) behandelt. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und die Daten auf eine unbehandelte Kontrollgruppe normiert (100%). Ein zytotoxischer Effekt wurde ab einer Zellvitalität von unter 80% festgelegt.

3.4.4.2 Aktivität des HERV Promoters von LXS_N-HERV-H-MC16 in MIAPaCa-2 Zellen nach Behandlung mit epigenetisch wirksamen Medikamenten

Beide Zellklone wiesen, obwohl die Reporterexpression bereits nach wenigen Wochen deutlich reduziert war, keine signifikanten Mutationen im Bereich des HERV Promoters oder des *egfp* Gens auf. Dies lässt auf epigenetische Inaktivierungsmechanismen schließen. Um dies zu überprüfen wurden stellvertretend Zellen des Klons LXS_N-HERV-H-MC16/MIAPaCa-2 mit verschiedenen Medikamenten behandelt, die nachweislich auf die Chromatinstruktur oder auf die DNA-Methylierung wirken können. VPA beispielsweise könnte als Histon-deacetylase Inhibitor die Chromatinstruktur verändern, während 5-Azacytidin eine DNA-Demethylierung bewirken kann. Auch anderer Medikamente wie Haloperidol oder Clozapin könnten epigenetische Veränderungen bewirken (vgl. 1.2.9).

Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie ausschließlich im nicht-zytotoxischen Bereich lagen (VPA: 1 mM; Haloperidol, Risperidon und Clozapin: 5 μ M; 5-Azacytidin: 1 μ M). Um mögliche synergistische Effekte zu nutzen, wurden zusätzlich Zellen mit der Kombination VPA/5-Azacytidin behandelt. Aufgrund der Instabilität von 5-Azacytidin in wässrigen Lösungen wurde dieses stets frisch hergestellt und das Medium nach 24 h erneuert.

Die eGFP Expression behandelter Zellen, sowie die Intensität der Grünfluoreszenz wurde mittels FACS Analyse bestimmt und zum besseren Vergleich eines möglichen Einflusses auf unbehandelte Zellen normiert. Alle fünf Medikamente zeigten nach 24 h keine Steigerung der Reporteraktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 35A). Der leichte Rückgang bei einigen Medikamenten ist wahrscheinlich auf Schwankungen der Zellkulturbedingungen zurückzuführen. Nach 48 Stunden Behandlung waren Unterschiede in der Reporteraktivität zu verzeichnen (Abb. 35B). Eine Behandlung mit 5-Azactidin bewirkte nach 48 h eine geringe Zunahme der relativen eGFP Expression um das 1,4-fache, während die Behandlungen mit VPA, Haloperidol, Risperidon und Clozapin bei relativen Werten um 0,75 schwankten. Auch nach Behandlung mit der Kombination VPA/5-Azactidin war ein mäßiger Anstieg grün fluoreszierender Zellen zu erkennen.

Nach 72 h war ein Rückgang in Abhängigkeit von VPA und VPA/5-Azacytidin zu verzeichnen (Abb. 35C). Während Haloperidol und Clozapin keinen Effekt zu haben schienen, war eine leichte Erhöhung im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach einer Behandlung mit Risperidon und 5-Azactidin gemessen worden. Jedoch unterlagen diese Werte ebenfalls deutlichen Schwankungen.

Insgesamt konnte keine wesentliche Erhöhung der relativen eGFP Expression mit 5-Azacytidin, VPA/5-Azacytidin und Risperidon erzielt werden. Die Intensitäten der Grünfluoreszenz blieben bei allen Behandlungen unabhängig vom Zeitraum unverändert (Daten nicht gezeigt).

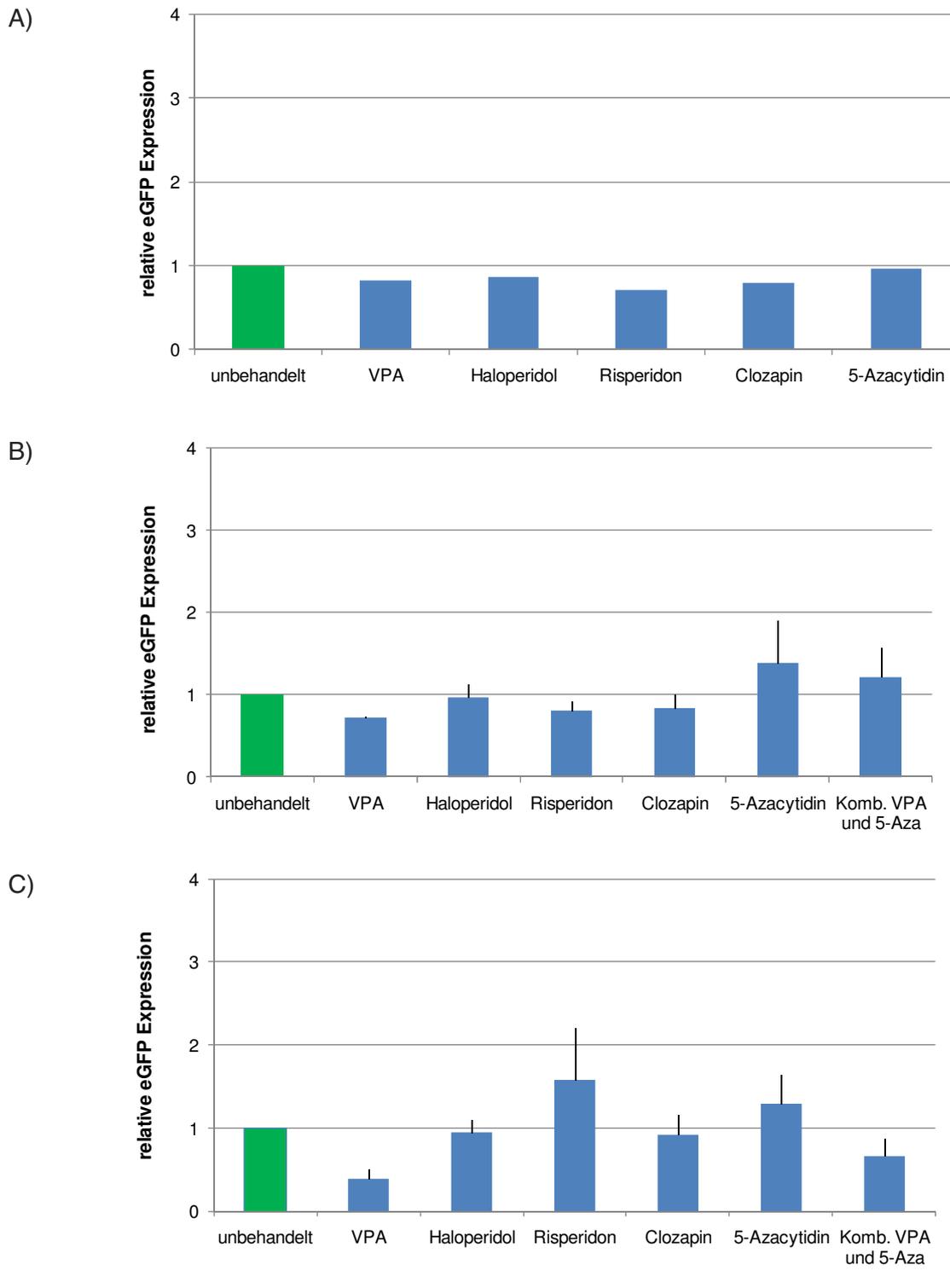


Abb. 35: Behandlungen des Zellklons LXSN-HERV-H-MC16/MIAPaCa-2 mit epigenetisch wirksamen Medikamenten. Die HERV vermittelte Expression des Reportergens *egfp* wurde 28 Wochen mittels FACS Analyse verfolgt und ein deutlicher Rückgang der Expression verzeichnet. Nach 28 Wochen wurden die Zellen zur Reaktivierung des HERV-Promotors 24 h (A), 48h (B) und 72 (C) mit VPA (1 mM), Haloperidol, Risperidon und Clozapin (je 5 μ M) und 5-Azacytidin (1 μ M) behandelt. Mit Ausnahme der 24 h Behandlung wurden alle Experimente in Triplikaten durchgeführt. Grün dargestellt ist die eGFP Expression in unbehandelten Zellen, die jeweils zur Normierung herangezogen wurde.

4. Diskussion

In früheren Untersuchungen wurden HERVs mehrfach mit der Ätiopathogenese von Schizophrenie assoziiert (O'Reilly *et al.* 1996; Yolken *et al.* 2000; Yolken *et al.* 2001; Voisset *et al.* 2008; Fatemi *et al.* 2009; Christensen 2010). So wurde in zahlreichen Studien eine erhöhte Aktivität vor allem von HERV-W, aber auch von ERV9 in schizophrenen Patienten im Vergleich zu Gesunden gefunden (Huang *et al.* 2006; Perron *et al.* 2008). Dies basierte überwiegend auf dem Nachweis einzelner Transkripte im Blut, im CSF oder in Gehirnen von Patienten mit Schizophrenie (Karlsson *et al.* 2001; Karlsson *et al.* 2004; Huang *et al.* 2006; Yao *et al.* 2008). Es wurde beispielsweise RNA des ERV9 *pol* Gens ausschließlich in über einem Drittel der Patienten gefunden, jedoch in keiner Probe der gesunden Kontrollen (Huang *et al.* 2006). Außerdem konnte eine unterschiedliche Expression einzelner HERV Elemente auf Proteinebene nachgewiesen werden (Huang *et al.* 2006; Perron *et al.* 2008).

Desweiteren ist eine Subgruppe von HERV-K(HML-2), HERV-K10, in Patienten mit Schizophrenie und Bipolaren Störungen signifikant überrepräsentiert (Frank *et al.* 2005). Von einer anderen Arbeitsgruppe wurden leicht erhöhte Transkriptmengen von HERV-K(HML-2) *pol* im frontalen Kortex von *postmortem* Proben gefunden (Karlsson *et al.* 2001).

Jedoch konnte bislang nicht geklärt werden, ob HERVs eine Rolle bei der Ätiopathogenese spielen, eine Konsequenz der Erkrankung darstellen oder ob das erhöhte Vorkommen in Patienten eine Folge der Medikation ist (Balada *et al.* 2009). Der Einfluss antipsychotischer Medikamenten auf die HERV Expression blieb bisher völlig unbeachtet. Andererseits ist bekannt, dass antipsychotische Medikamente die Genexpression verändern können (Chong *et al.* 2002; Dong *et al.* 2008; Szyf 2009). Es stellt sich daher die Frage, ob die in vorangegangenen Untersuchungen erlangten Resultate über die Aktivierung von HERVs in Schizophreniepatienten möglicherweise eine Folge der Medikation sein könnten und nicht direkt mit der Erkrankung assoziiert sind.

Die Möglichkeit einer transkriptionellen Aktivierung von HERVs wurde bereits durch vielfältige Faktoren, wie Mikroorganismen, Strahlung, aber auch durch Cytokine, Hormone oder Chemikalien demonstriert (Hohenadl *et al.* 1999; Torrey *et al.* 2001; Torrey *et al.* 2003; Frank *et al.* 2006; Yolken *et al.* 2006; Balada *et al.* 2009; Petersen *et al.* 2009). Zum Beispiel ist bekannt, dass HERV-W durch Viren wie HSV-1 aktiviert werden kann (Nellaker *et al.* 2006; Ruprecht *et al.* 2006). Desweiteren konnte eine Aktivierung von HERV-K(HML-2) Elementen durch das Krebsmedikament 5-Azacytidin nachgewiesen werden (Götzinger *et al.* 1996; Stengel *et al.* 2010).

Eine wesentliche Komponente bei der Behandlung von psychischen Störungen wie Schizophrenie sind antipsychotische Medikamente. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit die Medikation die HERV-Expression beeinflussen kann. Um diesem Aspekt nachzugehen, musste zuerst eine geeignete Modellzelllinie gefunden werden.

4.1 Das HERV Expressionsmuster menschlicher Gehirnzelllinien entspricht im Wesentlichen dem spezifischen HERV-Expressionsprofil des Gehirns.

Ein wesentliches Kriterium für Modellzellen war deren Übereinstimmung mit der von Frank *et al.* ermittelten retroviralen „Core“-Aktivität im menschlichen Gehirn. Um einen guten Überblick zu bekommen, wurde ein möglichst breites Spektrum an unterschiedlichen Gehirnzelllinien untersucht. Generell ist in jedem Gewebe unabhängig vom Gehirnareal oder Krankheitsmuster ein spezifisches HERV Aktivitätsprofil zu finden (Frank *et al.* 2005; Seifarth *et al.* 2005; Frank *et al.* 2008). Charakteristisch für das menschliche Gehirn ist die ubiquitäre Expression der Klasse I HERVs HERV-E, HERV-F, ERV9 sowie der Klasse II HERVs HML-2, HML-4, HML-6, HML-9 und HML-10 (Frank *et al.* 2005). Neben diesen sind sowohl in Patienten mit Schizophrenie oder Bipolaren Störungen als auch in Gesunden eine Reihe differentiell aktiver HERVs identifiziert worden.

Einige der von Frank *et al.* definierten differentiell aktiven HERVs (Frank *et al.* 2005) zeigten teilweise Abweichungen in den hier untersuchten Gehirnzelllinien. Individuelle Abweichungen in der Regulation der Transkription können durch Unterschiede im Methylierungsmuster oder anderen epigenetischen Variablen innerhalb der HERV LTR oder im Bereich der flankierenden Sequenzen des Integrationsortes zustande kommen (Lavie *et al.* 2005, Khodosevich 2004). Außerdem könnte die Verfügbarkeit von zellulären Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen, die neben epigenetischen Veränderungen eine essentielle Rolle bei der Regulation der HERV LTR spielt (Schön *et al.* 2001; Fuchs *et al.* 2011). Eine Abweichung im Hybridisierungsmuster der Gehirnzelllinien bezüglich der „Core“-Aktivität konnte lediglich bei einigen HERV-K(HML-2) Elementen festgestellt werden. Dies könnte auch auf im Zellkulturmodell fehlende Interaktionen, die im Gehirn vorhanden sind, zurückgeführt werden.

Insgesamt zeigten alle neun Zelllinien (vier Glioblastom- und zwei Neuroblastom-Zelllinien, eine neurale Stammzelllinie und primäre Gehirnzellen), die mit Hilfe des Retrovirus-spezifischer Microarrays untersucht wurden, ein sehr ähnliches Expressionsprofil verglichen mit der charakteristischen „Core“-Aktivität in Gehirngewebe. Deshalb wurden repräsentative Vertreter eines jeden Zelltyps ausgewählt, die sich sehr gut als Modell eignen, um die spezifischen HERV Aktivitäten nach Behandlung mit Antipsychotika zu messen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Technik des HERV-spezifischen Microarrays erfolgreich für Gehirnzellen eingesetzt werden und stellt seitdem ein gut etabliertes System in unserer Arbeitsgruppe dar.

4.2 Das antipsychotische Medikament Valproinsäure kann die HERV Expression beeinflussen - Haloperidol, Risperidon und Clozapin zeigen kaum Wirkung

Die vorliegende Studie ist die erste, die sich mit dem Einfluss von Antipsychotika auf die HERV Expression in Gehirnzellen beschäftigt (Abb. 36). Anhand einer umfassenden Analyse des HERV Expressionsprofils mittels Microarray wurde der Einfluss von antipsychotischen Medikamenten auf

die HERV Aktivität in den Modellzelllinien untersucht. Es konnte klar gezeigt werden, dass in Glioblastom- und Neuroblastom-Zelllinien, sowie auch in primären Gehirnzellen nach Behandlung mit VPA mehrere HERV Gruppen wie auch das zelluläre Gen p21 aktiviert werden. Diese Aktivierung zeigte sich bereits bei Konzentrationen von 1 mM, was ungefähr der therapeutisch eingesetzten Menge des Medikaments entspricht (Coryell *et al.* 1998). Starke Effekte waren unter anderem bei den Klasse I HERVs HERV-W, ERV9 und HERV-F, sowie bei den Klasse II HERVs HML-3 und HERV-KC4 zu sehen. Eine Ausnahme stellt die neurale Stammzelllinie HNSC.100 dar, in der keine signifikante HERV Aktivierung beobachtet wurde.

Im Gegensatz zu VPA zeigen Haloperidol, Risperidon und Clozapin einen weit geringeren oder gar keinen Einfluss. Um die Ergebnisse der Microarray Experimente zu verifizieren, wurden die Expressionsunterschiede der aktivierten HERV Gruppen mit einer alternativen Methode (qRT-PCR) quantitativ erfasst. Mit einer bis zu 22- bzw. 18-fachen Erhöhung gegenüber unbehandelten Zellen wurden HERV-W und ERV9 Elemente durch Behandlung mit VPA am stärksten aktiviert. Interessanterweise werden mit HERV-W und ERV9 zwei HERV Gruppen durch VPA stimuliert, die bereits mehrfach mit Schizophrenie, aber auch mit anderen neurologischen Erkrankungen, wie zum Beispiel Bipolaren Störungen und MS in Verbindung gebracht worden waren (Christensen 2010; Weis *et al.* 2007; Karlsson *et al.* 2001; Huang *et al.* 2006).

Der Wirkung von VPA auf die Expression von HERV-W und ERV9 liegt wahrscheinlich derselbe Mechanismus zugrunde wie der VPA-Aktivierung zellulärer Gene. Diese beruht auf einem inhibierenden Effekt von VPA auf Histon-Deacetylase (HDAC), einem Enzym, das durch posttranslationale Chromatin-Modifikation eine Repression der Genexpression bedingt (Camphausen *et al.* 2005). Sharma *et al.* konnten mittels Western-Blot Analyse eine Erhöhung von acetyliertem Histon H3 in Lymphozyten von 14 Patienten mit Bipolaren Störungen oder Schizophrenie nach vierwöchiger VPA Behandlung nachweisen (Sharma *et al.* 2006). Hierbei korrelierte die VPA Konzentration deutlich mit dem Anteil an acetyliertem Histon.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine starke, konzentrationsabhängige Induktion (bis über 1000 fach) des zellulären Gens p21 durch VPA in HNSC.100 Zellen gezeigt werden, wo hingehend die HERV Expression weitgehend unbeeinflusst blieb. In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass p21 eine kausale Rolle bei der Inhibierung von Genen, die eine Zellzyklus-Progression bedingen, spielt und die Aktivierung von p21 somit in einen Zellzyklusarrest führt (Chang *et al.* 2000; Gartel *et al.* 2005). Desweiteren wurde nachgewiesen, dass p21 selektiv die Expression einer Vielzahl von Genen inhibiert, die mit der Mitose, der DNA-Replikation, Segregation oder der DNA Reparatur assoziiert sind (Chang *et al.* 2000). Die sehr hohen p21 Werte in Abhängigkeit der VPA Behandlung und der möglicherweise daraus resultierende Zellzyklusarrest könnten erklären, warum in HNSC.100 Zellen keine Aktivierung einzelner HERV Gruppen nach einer Behandlung mit VPA gefunden wurde.

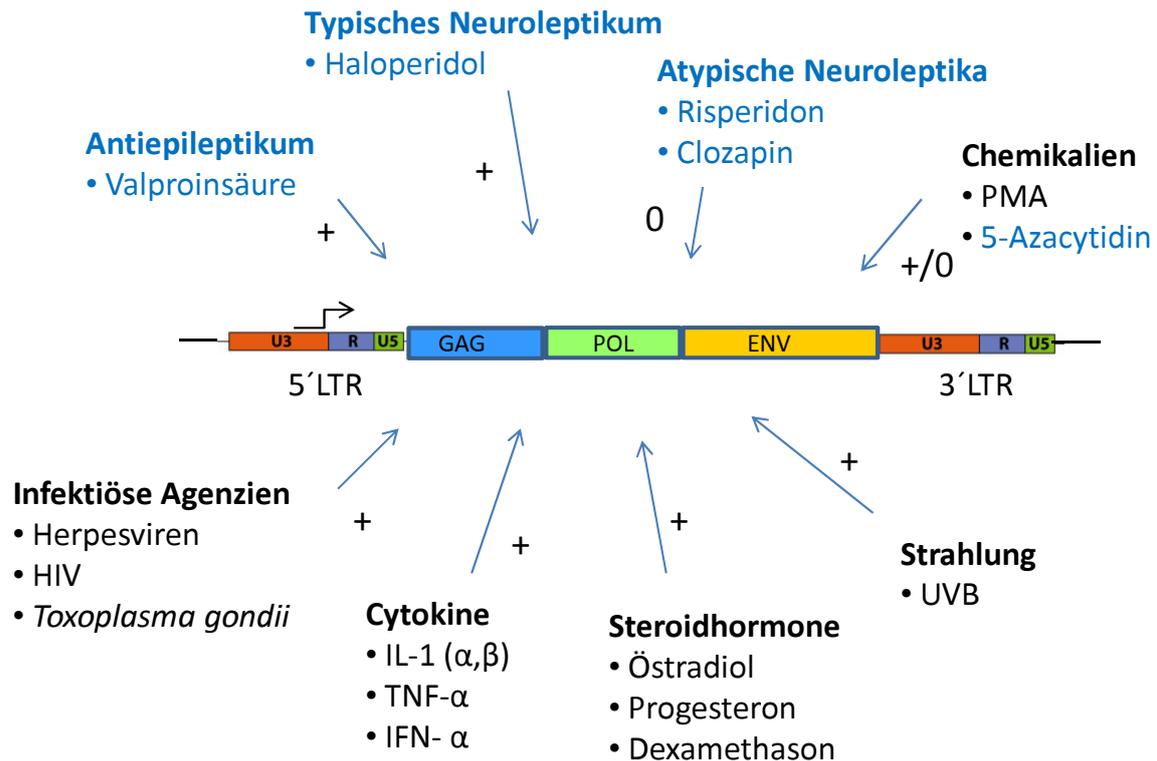


Abb. 36: Schematischer Überblick über Faktoren, die die HERV Aktivität beeinflussen können (verändert und ergänzt nach Balada *et al.* 2009, Yolken *et al.* 2000, Huang *et al.* 2010). Aufgeführt sind alle Faktoren, deren Einfluss auf die HERV Expression in verschiedenen Studien untersucht wurde. Blau markierte Agenzien wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht (+ zeigt einen aktivierenden Effekt, 0 keinen Effekt und – deutet einen reduzierenden Effekt an).

Um zu untersuchen, ob die im Zellkulturmodell gewonnenen Daten durch *in vivo* Experimente bestätigt werden können, wurden Gehirnproben von mit Haloperidol und Clozapin behandelten Rhesusaffen (*M. mulatta*) und unbehandelten Kontrolltieren mittels eines spezifischen Microarrays analysiert, der Sequenzen aller bekannter ERV Gruppen der Altweltaffen enthielt (Diem *et al.* 2010). Übereinstimmend mit den Zellkulturergebnissen konnte weder in mit Haloperidol noch in mit Clozapin behandelten Rhesusaffen eine signifikante ERV Aktivierung nachgewiesen werden. Ähnlich wie beim Menschen sind einige ERV Gruppen sowohl in behandelten als auch in unbehandelten Tieren differentiell aktiv, was auf individuelle epigenetische Einflüsse hinweist. Dies kann zum Beispiel auf Unterschiede im Methylierungsmuster der HERV LTR Sequenzen beruhen (Lavie *et al.* 2005, Khodosevich *et al.* 2004).

Bisher sind die detaillierten Auswirkungen von Neuroleptika im Allgemeinen nicht ausreichend geklärt. Jedoch konnte die Arbeitsgruppe um Choi *et al.* nachweisen, dass verschiedene typische (z. B. Haloperidol) oder atypische Neuroleptika (z. B. Risperidon) die Expression zellulärer Gene und biologische Funktionen in *postmortem* Proben der Leber von Schizophrenen beeinflussen können (Choi *et al.* 2009). Typische Neuroleptika nehmen zum einen Einfluss auf Gene, die für nukleäre Proteine codieren, unter anderem für Transkriptionsfaktoren und andere DNA bindende Proteine, die eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Expression anderer Gene spielen

können (Choi *et al.* 2009). Zum anderen sind in der Leber auch Gene betroffen, die mit der Stressantwort oder der Phosphorylierung assoziiert sind. Im Gegensatz dazu bewirken atypische Neuroleptika ausschließlich eine Hochregulierung verschiedener Gene, die mit dem Transport im Zytoplasma oder dem Endoplasmatischen Retikulum verbunden sind. Ebenso wird ein Einfluss auf den Lipidmetabolismus und die Mitochondrienaktivität vermutet (Choi *et al.* 2009). Gestützt wird dieser Befund durch eine Untersuchung von Iwamoto *et al.*, die ebenfalls eine veränderte Expression mitochondrialer Gene in *postmortem* Gehirnprouben von Patienten mit Schizophrenie und Bipolaren Störungen beobachten konnten (Iwamoto *et al.* 2005).

Ähnliche Ergebnisse über einen Einfluss von Haloperidol auf die Expression von zellulären Genen wurden in früheren Studien mit Ratten und Mäusen erzielt (Fasulo *et al.* 2003; Narayan *et al.* 2007; Pillai *et al.* 2008). Microarray Experimenten mit Proben des Striatums von Ratten beispielsweise enthüllten 14 Gene, die aufgrund einer Langzeitbehandlung mit Haloperidol eine veränderte Genexpression aufweisen (Chong *et al.* 2002). Während davon sechs Gene herunter reguliert waren, wurden die restlichen acht Gene hochreguliert. Davon betroffen war das Gen Synapsin II, welches mit Schizophrenie in Zusammenhang stehen soll (Chong *et al.* 2002). Desweiteren resultierte eine Behandlung von Ratten mit Haloperidol in einer signifikanten Veränderung der Expression von über 17 Genen im Mittelhirn (Fasulo *et al.* 2003). Betroffen waren beispielsweise Gene, die als Signalproteine oder Transkriptionsfaktoren fungieren oder als GABA Rezeptor Untereinheit eine Rolle spielen.

Außerdem wurden auch geringe Haloperidol-bedingte Effekte auf DNA-Methylierung oder Chromatin-Modifikationen im Gehirn von Nagern beobachtet (Shimabukuro *et al.* 2006; Li *et al.* 2004). Erstmals von Li *et al.* beschrieben, wirken antipsychotische Medikamente mit einer Affinität zu D2- Rezeptoren (zum Beispiel Haloperidol) auf die Phospho-Acetylierung von Histon H3 im Striatalen Chromatin der Maus. Dies kann über den cAMP-Protein-Kinase A (PKA) und den post-synaptischen NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor „Pathway“ vermittelt werden (Li *et al.* 2004). An dieser Stelle sei zusätzlich erwähnt, dass VPA (Narayan *et al.* 2010) vor allem in Kombination mit Clozapin eine Aktivierung der DNA-Demethylase im Gehirn von Mäusen zur Folge haben kann (Dong *et al.* 2008).

Ebenso konnten mittels Microarray-Technik Auswirkungen von Clozapin auf die Genexpression im Gehirn von Mäusen oder Ratten nachgewiesen werden (Takahashi *et al.* 2004; MacDonald *et al.* 2005). Außerdem zeigten Rhesusaffen nach einer Langzeit-Behandlung mit Clozapin (180 Tage) einerseits einen signifikanten Rückgang der GRIA1 Expression und andererseits eine Erhöhung der GRIA3 Expression, während eine Kombination von Clozapin mit Haloperidol die Expression der GRIA2 Untereinheit erhöhte (O'Connor *et al.* 2007). Insgesamt bestehen sogenannte AMPA-Rezeptoren aus vier GRIA-Untereinheiten (GRIA1-4), die, wie auch NMDA-Rezeptoren, eine Untereinheit der Glutamat-Rezeptoren bilden und zu den verbreitetsten Neurotransmitter-Rezeptoren im Zentralnervensystem gehören. Eine Veränderung der Glutamat-Neurotransmission wird mit Schizophrenie assoziiert (Coyle *et al.* 2002). So wurde erstmals von O'Connor gezeigt, dass eine Langzeittherapie mit Antipsychotika Veränderungen in der Expression der AMPA Rezeptor-Untereinheiten im Präfrontalen Cortex von Primaten hervorrufen kann (O'Connor *et al.* 2007).

Diese Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass auch atypische oder typische Neuroleptika durchaus die Regulation einzelner Gene beeinflussen können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte allerdings weder in Zellkulturmodellen noch *in vivo* ein signifikanter Einfluss dieser Medikamente auf die Expression endogener Retroviren festgestellt werden. Da mit den hier verwendeten Methoden (Microarray, quantitative RT-PCR) jedoch immer nur (H)ERV Gruppen oder Subgruppen, aber keine individuellen Transkripte erfasst werden, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass diese Medikamente möglicherweise einzelne (H)ERV Loci beeinflussen können.

4.3 Antipsychotika beeinflussen nicht die Gesamtaktivität der HERV-K(HML-2) Gruppe

Im Fall der HERV-K(HML-2) Gruppe war bei allen Microarrayexperimenten sowie der quantitativen RT-PCR kein wesentlicher Einfluss von VPA, Haloperidol, Risperidon oder Clozapin auf die Expressionsaktivität erkennbar. Dieser Befund war überdies unabhängig von der Konzentration der Medikamente und dem Zelltyp. Der fehlende Einfluss der getesteten Medikamente lässt darauf schließen, dass die Überrepräsentation von HERV-K10, einer Subgruppe von HERV-K(HML-2), in Patienten mit Schizophrenie oder Bipolaren Störungen im Vergleich zu gesunden Personen (Frank *et al.* 2005) in engem Zusammenhang mit der Krankheit steht. Dadurch wird die Hypothese einer direkten Assoziation der HERV-K(HML-2) Gruppe mit der Erkrankung gestützt (Voisset *et al.* 2008; Christensen 2010).

Unterschiedliche Expressionsmuster von HERV-K Elementen in Verbindung mit Schizophrenie oder Bipolaren Störungen wurden in mehreren vorausgegangenen Studien gefunden (Karlsson *et al.* 2001; Christensen 2010). Nakamura *et al.* identifizierten einen HERV-K(HML-2) Locus, HERV-K102, auf Chromosom 1q21.q22, der im menschlichen Gehirn aktiv sein könnte und innerhalb eines mit Schizophrenie assoziierten Genbereiches, SCZD9, liegt (Nakamura *et al.* 2003). Weitere Analysen der Genomumgebung ergaben eine Vielzahl von charakterisierten und nicht charakterisierten Genen, die möglicherweise bei der neuronalen Funktion, aber auch bei der neuronalen Differenzierung und Krankheitsentstehung eine Rolle spielen könnten (Skaper *et al.* 2001). Darunter zählen das Adenosindesaminasegen (ADAR), das in die Editierung der RNA von Glutamat Rezeptoren involviert ist und der Serotonin Rezeptor 5-HT_{2C}, sowie Gene, die für Chromatin-Interaktions Proteine kodieren.

Eine Aktivierung von HERV-K102 könnte die Expression eines oder mehrerer dieser Gene beeinflussen und damit an der Krankheitsentstehung beteiligt sein (Nakamura *et al.* 2003). Eine weitere Studie berichtet von einer Assoziation zwischen dem Risiko schizophrener Patienten an Diabetes Typ 2 zu erkranken und zwei Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in der *env* Region von HERV-K-18 (Dickerson *et al.* 2008). HERV-K-18 liegt innerhalb des ersten Introns des Gens CD48 auf Chromosom 1q22. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang ungeklärt. Interessanterweise wurde auch ein Einfluss von atypischen Neuroleptika wie Clozapin und Risperidon in Bezug zur Inzidenz von Diabetes untersucht (Dickerson *et al.* 2008), da beispielsweise die Me-

dikation Abweichungen in der Glucose-Homöostase bewirken könnte. Während Risperidon keinen Einfluss auf Diabetes zu haben scheint, waren unter den Patienten mit Clozapinbehandlung mehr Diabetes-Erkrankungen zu verzeichnen.

Ein weiteres Indiz für einen Zusammenhang zwischen einem Element der HERV-K(HML-2) Gruppe und Schizophrenie lieferte Otowo *et al.*, indem sie die Häufigkeit eines polymorphen HERV-K115 Elements (8p 23.1) in schizophrenen Patienten in Japan untersuchten (Otowa *et al.* 2006). Zwar war kein Unterschied im Vergleich zu Gesunden zu beobachten, jedoch war die Insertion von HERV-K115 häufiger in Patienten mit einem früheren Krankheitsausbruch zu finden. Diese Befunde lassen vermuten, dass HERV-K115 weniger mit der Krankheitsentstehung generell als vielmehr mit dem Krankheitsverlauf assoziiert sein könnte (Otowo *et al.* 2006).

4.4 Untersuchungen an *postmortem* Gehirnproben von Patienten weisen auf einen leichten Einfluss von VPA hin

Basierend auf den im Zellkulturmodell gefundenen Einflüssen von VPA auf HERV-W und ERV9 und der Assoziation dieser HERV-Gruppen, sowie der HERV-K(HML-2) Gruppe mit Schizophrenie und Bipolaren Störungen stellte sich folglich die Frage, ob diese HERV Elemente auch in Patienten unter Behandlung mit VPA eine erhöhte Expression aufweisen.

Für dieses Vorhaben wurden *postmortem* Gehirnproben beider Patientengruppen, die mit VPA therapiert worden waren, ausgesucht, um deren HERV-W, ERV9 und HERV-K(HML-2) Expressionen im Vergleich zu Patienten ohne VPA Behandlung oder einer gesunden Kontrollgruppe quantitativ mit qRT-PCR zu erfassen.

Betrachtet man die durchschnittliche Aktivität von ERV9, so war in beiden Patientengruppen eine leicht erhöhte Aktivität bei Patienten mit VPA-Therapie zu erkennen. Eine erhöhte Expression von HERV-W nach VPA Behandlung wurde in Schizophreniepatienten beobachtet, konnte allerdings nicht in Bipolaren Störungen bestätigt werden. Auf die Aktivität von HERV-K(HML-2) dagegen schien eine Behandlung mit VPA bei Patienten mit Schizophrenie keinen Einfluss zu haben. Dafür war in beiden Patientengruppen die durchschnittliche Expression von HML-2 im Vergleich zu Gesunden leicht erhöht und bestätigt somit frühere Untersuchungen mit Hilfe des Retrovirus-spezifischen Microarrays (Frank *et al.* 2005).

Von besonderer Bedeutung ist auch die unabhängig von einer VPA-Therapie statistisch signifikant höhere Expression von ERV9 in Schizophrenie-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Bisher wurden ERV9-*pol* Transkripte nur in der CSF und Blut von Schizophreniepatienten gefunden (Karlsson *et al.* 2001, Huang *et al.* 2006). Außerdem konnten Antikörper gegen ERV9 Pol-Protein im Blut 20 schizophrener Patienten nachgewiesen werden (Huang *et al.* 2006). Diese Daten weisen insgesamt auf eine Beteiligung von ERV9 an der Erkrankung hin.

Konträr zu anderen Experimenten (Weis *et al.* 2007; Yao *et al.* 2008; Huang *et al.* 2010), jedoch in Übereinstimmung mit der Untersuchung der gleichen *postmortem* Proben mit Hilfe des Retrovirus-

spezifischen Microarrays (Frank *et al.* 2005) wurde keine statistisch signifikant erhöhte Expression von HERV-W in beiden Patientengruppen gefunden.

Insgesamt spiegeln die Ergebnisse der Untersuchungen an den *postmortem* Proben die durch die Zellkulturexperimente gewonnenen Erkenntnisse wieder, jedoch weniger klar und zum Teil äußerst schwer zu interpretieren, da es nicht möglich ist alle Faktoren und äußeren Einflüsse zu berücksichtigen. Ein Vergleich wird vor allem dadurch erschwert, dass die Auswertung der Daten auf der Verlässlichkeit klinischer Angaben über die Art der medikamentösen Behandlung, regelmäßige Einnahme und medizinische Diagnose angewiesen ist (Torrey *et al.* 2000). Klinische Informationen über einen Patienten sind oft nicht vollständig. Zeitpunkt, Dauer und Dosierung der Medikation ist bei den einzelnen Patienten unterschiedlich, viele erhalten mehrere Medikamente in Kombination. Über die Kompliance der Patienten zum Zeitpunkt des Todes ist in der Regel ebenfalls nichts bekannt. Eine andere Herausforderung in Studien mit *postmortem* Proben ist die unterschiedliche Qualität des Probenmaterials. Dies kann zum Beispiel am sogenannten PMI-Wert (*postmortem* Interval), aber auch an der Todesursache durch Suizid liegen (Torrey *et al.* 2000).

Außerdem ist wenig über individuelle Daten, wie familiäre Häufung oder mögliche Einflüsse anderer Faktoren, bekannt. Die Aufteilung der Expressionsaktivitäten einzelner *postmortem* Gehirnproben hinsichtlich Drogen- oder Alkoholeinfluss erbrachte eine neue Perspektive und ergab für HERV-W, ERV9, und HERV-K(HML-2) teils leichte, aber nicht signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von Drogen- oder Alkoholmissbrauch. Während HML-2 beinahe völlig unbeeinflusst auf dem gleichen Expressionsniveau blieb, war bei ERV9 eine leicht erhöhte Expression in Verbindung mit Alkohol oder Drogen zu sehen. Im Gegensatz dazu war die durchschnittliche HERV-W Expression in der Alkohol- bzw. Drogengruppe leicht erniedrigt.

Eine Ausdehnung der Analysen mit erhöhten Fallzahlen wäre sicherlich von Vorteil. Jedoch sind dies alles Faktoren, die stets bei jeder Patientenstudie eine Auswertung der Daten erschweren (Dickerson *et al.* 2008; Choi *et al.* 2009). Trotz dieser Einschränkungen leisten die vorliegenden Erkenntnisse einen Beitrag zur Beurteilung einer möglichen Assoziation von HERVs mit neurologischen Erkrankungen, wie Schizophrenie oder Bipolaren Störungen.

4.5 Epigenetische Modifikationen der HERV-K(HML-2) LTR-Sequenzen in verschiedenen Zelltypen und unter Einfluss von VPA

Elemente der HERV-K(HML-2) Gruppe werden mit Schizophrenie und Bipolaren Störungen assoziiert (Frank *et al.* 2005). In Gehirnproben von Patienten konnten im Vergleich zu Gesunden unterschiedlich transkriptionell aktive Loci identifiziert werden (Flockerzi *et al.* 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Regulation der Aktivität verschiedener HERV-K(HML-2) Proviren im Detail untersucht. Das Hauptaugenmerk lag auf der Analyse des Methylierungsstatus, da bekannt ist, dass HERVs häufig durch DNA-Methylierung inaktiviert werden (Lavie *et al.* 2005; Kann *et al.* 2004; Reiss *et al.* 2007; Stengel *et al.* 2010). Als Referenz diente aufgrund ihrer hohen HERV-K(HML-2) Aktivität die Teratokarzinom-Zelllinie Tera-1.

Der Methylierungsgrad der untersuchten HERV-K(HML-2) Loci war bei Tera-1 Zellen insgesamt deutlich niedriger als in den Gehirnproben eines Schizophreniepatienten und einer gesunden Person. In den Gehirnproben waren beinahe alle Loci unabhängig vom Krankheitsbild zu über 80% methyliert. Dies bestätigt frühere Befunde, die auf gewebespezifische Unterschiede im Methylierungsstatus von HERV Sequenzen hinweisen. So liegt zum Beispiel der Methylierungsgrad von HERV-E im menschlichen Gehirn etwa 20% über dem in der Plazenta (Reiss *et al.* 2007). Prinzipiell scheinen Retroelemente während der frühen Embryogenese zu einem großen Teil hypomethyliert zu sein (Maksakova *et al.* 2008). Dazu kommt, dass HERVs in Tumoren tendenziell weniger methyliert vorliegen (Romanish *et al.* 2010). Beides könnte eine Erklärung für die Demethylierung sämtlicher untersuchter HERV-K(HML-2) Loci in der Teratokarzinomzelllinie Tera-1 sein.

Vorangegangene Studien haben ergeben, dass einzelne HERV-K(HML-2) Loci unterschiedlich häufig im Gehirn transkriptionell aktiv sind (Flockerzi *et al.* 2008; Ruprecht *et al.* 2008). Anhand dieser Analysen erfolgte die Auswahl der Loci, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Beispielsweise wurde der Locus c22_A als Positivkontrolle ausgewählt, da dieser in Tera-1 Zellen hoch aktiv ist und einen Anteil von 50% aller Transkripte ausmacht (Ruprecht *et al.* 2008). Vergleicht man nun den ermittelten Methylierungsgrad für diesen Locus, so findet man eine stimmige inverse Korrelation zwischen dem Methylierungsniveau von knapp 2% in Tera-1 und der hohen transkriptionellen Aktivität. Auch in Gehirngewebe findet man diese inverse Korrelation, wenn man zum Beispiel die beiden im Gehirn inaktiven Loci c12_A und c22_A betrachtet. Sowohl in gesundem Gehirngewebe (Methylierungsgrad 98% bzw. 89%), als auch im Gehirn eines Patienten mit Schizophrenie (Methylierungsgrad 94% bzw. 96%) sind beide Loci stark methyliert. Insgesamt stehen die ermittelten Werte des Methylierungsgrades im Einklang mit der transkriptionellen Aktivität und deuten damit an, dass die DNA Methylierung eine entscheidende Rolle bei der Regulation von HERV-K(HML-2) Loci im Gehirn spielt.

Dieser Zusammenhang wurde bereits mehrfach für andere Zelltypen postuliert (Stengel *et al.* 2010, Khodosevich *et al.* 2004; Lavie *et al.* 2005; Reiss *et al.* 2007). Einen indirekten Hinweis für die Rolle der DNA Methylierung bei der HERV-K(HML-2) Transkription in Tera-1 Zellen erbrachten erstmals Götzinger *et al.*, indem sie zeigten, dass eine Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5-Azacytidin die Expression des HERV-K(HML-2) Gag Proteins steigert (Götzinger *et al.* 1996).

Lavie *et al.* untersuchten die Rolle der DNA Methylierung von CpG Dinukleotiden ausgewählter HERV-K(HML-2) Loci in Bezug auf deren transkriptioneller Aktivität in Tera-1 Zellen und der Brustkrebs-Zelllinie T47D (Lavie *et al.* 2005). Dabei wurden auch drei der hier analysierten Loci mit einbezogen. In Tera-1 Zellen war der Locus c6_A komplett unmethyliert, c11_A zu 36% und Locus c12_A zu 71% methyliert. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den in dieser Arbeit erhaltenen Resultaten für die Loci c6_A (31%), c11_A (14%) und c12_A (43%). Solche Differenzen innerhalb eines Zelltyps können möglicherweise durch die unterschiedliche Passagenzahl oder veränderte Zellkulturbedingungen bedingt sein (Brorson *et al.* 2002). Deshalb gilt es generell zu beachten, dass das Ausgangsmaterial zur Bestimmung des Expressionsprofils einer HERV-LTR

und für die Methylierungsanalyse aus derselben Zellcharge stammen. Übereinstimmend wurde eine große Schwankungsbreite des Methylierungsgrades verschiedener Loci (0-71%) in Tera-1 Zellen festgestellt (Lavie *et al.* 2005). Im Gegensatz dazu wurde von Lavie *et al.* in T47D Zellen ein Locus identifiziert, der transkriptionell inaktiv, aber komplett unmethyliert vorlag. Dies weist daraufhin, dass der CpG Methylierungsstatus wahrscheinlich nicht allein die Aktivität von HERV-K(HML-2) LTRs bestimmt. Nach Lavie *et al.* könnte dies auf einen Einfluss zellulärer Faktoren, wie Repressoren oder „Enhancer“ hindeuten, die in die Transkription involviert sind (Lavie *et al.* 2005; Fuchs *et al.* 2011).

In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie konnte anhand von Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzymen eine klare Korrelation zwischen DNA Methylierung und Aktivität von zehn HERV-K(HML-2) Loci in verschiedenen Melanomzelllinien gezeigt werden (Stengel *et al.* 2010). Melanomzellen mit wenig HERV-K(HML-2) Expression reagierten auf 5-Azacytidin mit einer gesteigerten HERV-K(HML-2) Aktivität (Stengel *et al.* 2010). Stengel *et al.* kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass eine hohe HERV-K(HML-2) mRNA Expression in Melanomzellen das Resultat aus wenigstens zwei Prozessen sein muss. Zum einen müssen HERV-K(HML-2) aktivierende Transkriptionsfaktoren hochreguliert werden und zum anderen muss das Aufrechterhalten der LTR Methylierung gestört sein. Die Demethylierung der LTR könnte auf einer genetischen Veränderung der Zelle basieren, wie zum Beispiel dem Verlust der DNMT1 Aktivität (Stengel *et al.* 2010).

Eine gerade erst veröffentlichte Studie besagt, dass HERV-K(HML-2) LTRs in Teratokarzinom- und Melanomzelllinien durch die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 reguliert werden (Fuchs *et al.* 2011). Zusätzlich konnten Bindungsstellen für YY1 (Knossl *et al.* 1999), AP1 (Kwun *et al.* 2002) und GRE nachgewiesen werden (Ono *et al.* 1986). Generell müssten HERV-K aktivierende Transkriptionsfaktoren sensitiv auf eine CpG Methylierung reagieren. In der Tat wurde berichtet, dass YY1 *in vitro* an keine methylierte DNA bindet (Kim *et al.* 2003).

Über weitere Mechanismen, die bei der Regulation der HERV-K(HML-2) Expression eine Rolle spielen, wie der Chromatinstatus der aktiven und inaktiven Loci ist bisher noch wenig bekannt. Sowohl die Microarray Analyse als auch die quantitative Bestimmung der Gesamttranskription durch qRT-PCR lieferte keinen Hinweis auf eine Aktivierung der HERV-K(HML-2) Gruppe durch antipsychotische Medikamente. Jedoch sollte diese Frage ergänzend anhand der Untersuchung einzelner HERV-K(HML-2) Loci geklärt werden, da ein fehlender Einfluss der Medikamente auf die Gesamtaktivität von HERV-K(HML-2) nicht zwangsläufig auch für jeden einzelnen Locus zutreffen muss.

Zuerst wurde der Methylierungsstatus ausgewählter Loci in der unbehandelten humanen neuronalen Stammzelllinie HNSC.100 bestimmt. Im Vergleich zu Gehirngewebe zeigten die untersuchten HERV-K(HML-2) LTRs in HNSC.100 Zellen einen eher niedrigen Methylierungsgrad im Bereich von 26-60%, wie man es für undifferenzierte Zellen erwarten würde (Berdasco *et al.* 2010). Nach 24 stündiger Behandlung mit VPA, Haloperidol, Risperidon oder Clozapin konnte keine signifikante Änderung des Methylierungsgrades von Locus c3_B festgestellt werden. Die Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5-Azacytidin hatte ebenfalls keine Hypomethylierung des Locus zur Folge; ist allerdings in diesem Fall sehr wahrscheinlich auf die geringe Teilungsrate der

HNSC.100 Zellen während des untersuchten Zeitraums zurückzuführen, da der Effekt von 5-Azacytidin erst nach erfolgter Replikation zu beobachten ist.

Frühere Untersuchungen in Mäusen haben gezeigt, dass VPA allein oder in Kombination mit Clozapin direkt oder indirekt eine DNA Demethylierung der Gene *GAD67* oder *reelin* bewirken kann (Dong *et al.* 2008; Kundakovic *et al.* 2009; Narayan *et al.* 2010). Diese Eigenschaft wird im Fall von Haloperidol kontrovers diskutiert. Während Dong *et al.* keine demethylierende Eigenschaft im Präfrontalen Cortex der Maus sieht (Dong *et al.* 2008), wurden von einer anderen Arbeitsgruppe im Gehirn von Nagern geringe Haloperidol-bedingte Effekte auf die DNA Methylierung oder den Chromatinstatus beobachtet (Li *et al.* 2004; Shimabukuro *et al.* 2006).

Es ist naheliegend zu vermuten, dass neben dem Methylierungsgrad auch der Chromatinstatus als weitere epigenetische Modifikation eine Rolle bei der Regulation der transkriptionellen Aktivität einer HERV LTR spielt (Lavie *et al.* 2005; Kouzarides *et al.* 2007; Sugimoto *et al.* 2009). Jedoch wurde der Einfluss der Chromatinumgebung auf HERV-K(HML-2) und andere HERV Gruppen bislang nicht experimentell untersucht. Es ist außerdem durchaus denkbar, dass VPA als HDAC-Inhibitor den Chromatinstatus von HERV-K(HML-2) ändern und somit einzelne Loci aktivieren könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Chromatinstatus einzelner HERV-K(HML-2) Loci unter VPA Einfluss untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass VPA die meisten HERV-K(HML-2) Loci nicht beeinflusst. Lediglich für Locus c7_A war nach einer Behandlung mit VPA das Verhältnis von acetyliertem zu nicht-acetyliertem Chromatin des Histons H3 um das 40-fache gestiegen.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass VPA über die Hemmung von HDAC auf den Chromatinstatus zumindest einzelner HERV-K(HML-2) Loci wirken kann. Jedoch bewirkte dieser Effekt offensichtlich keine Erhöhung der Gesamttranskriptionsaktivität von HERV-K(HML-2).

Es ist bekannt, dass einzelne HERV Loci differentiell reguliert werden (Reiss *et al.* 2007) und deshalb möglicherweise auch unterschiedlich auf Einflüsse von außen reagieren können. Die Befähigung auf Medikamente wie VPA zu reagieren, hängt offensichtlich nicht allein vom HERV-Typ ab, sondern auch von Sequenzvariationen unter den Mitgliedern einer HERV Gruppe und dem jeweiligen Integrationsort. So kann beispielsweise die Anzahl von CpG Dinukleotiden in der LTR oder der Umgebung des Integrationsortes für die DNA Methylierung eine Rolle spielen. Insbesondere der Integrationsort kann durch „Spreading“ sowohl den Methylierungsstatus der HERV LTR, als auch die Chromatinstruktur im Allgemeinen beeinflussen (Reiss *et al.* 2007). In einer Untersuchung von Reiss *et al.* variiert der Methylierungsstatus von HERV-E LTRs in der Plazenta erheblich (4-91%) und könnte durch die Genomumgebung beeinflusst werden. Jedoch konnte keine systematische Korrelation zwischen dem Methylierungsstatus einer LTR und dem im flankierenden Bereich nachgewiesen werden (Reiss *et al.* 2007).

Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigt überdies, dass LTRs der HERV-K(HML-2) Gruppe in Teratokarzinom- und Melanomzelllinien als TATA-unabhängige Promotoren von drei GC Boxen und den Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 reguliert werden (Fuchs *et al.* 2011). Der Transkriptionsfaktor Sp1 ist an der Aktivierung vieler „Housekeeping Gene“ beteiligt und vermittelt regulatorische Prozesse, wie das Chromatin-Remodelling und den Erhalt von methylierungsfreien

„CpG islands“ vorwiegend während der Embryogenese und in der Keimbahn (Brandeis *et al.* 1994; Macleod *et al.* 1994; Ellis *et al.* 1996). Interessanterweise betrifft dies überwiegend Zellen, in denen sich HERVs replizieren müssen, um sich im Genom verbreiten zu können. Außerdem wird vermutet, dass die nachgewiesene Konvertierung von C zu T in der GC Box 4, sowie G zu A in der GC Box 1 auf einer Desaminierung von 5-Methyl Cytosin zu Thymin beruht, die im Laufe der Evolution stattgefunden haben muss und durch transkriptionelles Stilllegen durch CpG Methylierung nach der Integration entstanden ist (Fuchs *et al.* 2011).

Insgesamt zeigen diese Befunde, dass eine epigenetische Veränderung allein nicht ausreichend ist, um die transkriptionelle Aktivität einer HERV Gruppe grundlegend zu verändern.

4.6 HERV-Promotoren können Transgene über einen längeren Zeitraum stabil exprimieren

HERV Elemente sind seit Millionen Jahren Bestandteil des menschlichen Genoms. Seit ihrer Integration vor 70 bis 40 Millionen Jahren sind sie stabil persistent und werden ähnlich wie zelluläre Gene reguliert (Leib-Mösch *et al.* 2005). Die meisten HERVs sind genetisch oder epigenetisch inaktiviert, können jedoch, wie die vorangegangenen Studien zeigen, zumindest zum Teil durch äußere Faktoren wie zum Beispiel Medikamente reaktiviert werden. Es stellte sich nun die Frage, wie HERV LTRs reguliert werden, die *de novo* durch Infektion ins Genom eingebracht werden. Da keine infektiösen HERV Partikel zur Verfügung standen, wurden HERV-MLV Hybridvektoren verwendet (Schön *et al.* 2009). Diese Vektoren enthalten als Promotor eine HERV U3 oder HERV U3-R LTR Region. Es wurde die HERV vermittelte Reporter-gen-Aktivität in verschiedenen Zellklonen, die mit pLXSN-HERV-L-CordR oder pLXSN-HERV-H Hybridvektoren infiziert worden waren über einen Zeitraum von sechs Monaten mittels FACS Analyse verfolgt.

Sechs von acht repräsentativen Zellklonen zeigten eine stabile Expression des Reportergens *egfp* über den gesamten Zeitraum ohne Selektionsdruck. Dies ist neben einer zelltypspezifischen Expression ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von HERV Promotoren für die Konstruktion gentherapeutischer Vektoren (Schön *et al.* 2009). Gerade die konstante Expression eines ins Genom eingebrachten Gens über einen langen Zeitraum ist ein wesentliches Kriterium für ein erfolgreiches Vektorsystem (Howarth *et al.* 2010).

Zwei LXSN-HERV-H-Zellklone wiesen in Pankreaskarzinomzellen eine verminderte eGFP Expressionen auf, die nachweislich nicht auf einen Verlust des integrierten Provirus zurückzuführen sind. Sequenzanalysen der LTR und des Reportergens ließen weder im Zellklon LXSN-HERV-H-MC16R/MIAPaCa-2, noch im Klon LXSN-HERV-H-MC16/MIAPaCa-2 Veränderungen erkennen. Da somit eine Mutation sowohl im regulatorischen als auch im Reporter-gen-Bereich als mögliche Ursache für die verminderte Expression des Letzteren ausgeschlossen werden kann, muss davon ausgegangen werden, dass die HERV Promotoren durch epigenetische Modifikationen stillgelegt werden. Um dies zu testen, wurde eine Reaktivierung durch 5-Azacytidin und/oder VPA versucht, allerdings mit geringem Erfolg. Eine fehlende Wirkung des demethylierenden Agens

5-Azacytidin wurde bereits öfters im Zusammenhang mit retroviralem „Vektorsilencing“ berichtet (McInerney *et al.* 2000; Swindle *et al.* 2002; Mok *et al.* 2007). Auch in Kombination mit einem Histondeacetylase Inhibitor wie Trichostatin A (TSA) kann häufig keine signifikante Reaktivierung erzielt werden (McInerney *et al.* 2000). So berichten zwei Studien von unterschiedlichen Reaktivierungserfolgen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Reaktivierungsversuche (Mok *et al.* 2007; Senigl *et al.* 2008). Senigl *et al.* berichteten von einer Aktivierung durch 5-Azacytidin und TSA bei einer Mehrzahl inaktivierter Klone innerhalb der ersten 39 Tage nach Selektion, wobei bereits eine Abnahme des Effekts zwischen 21 und 39 Tagen festzustellen war. Nach 112 Tagen war kein Effekt mehr weder durch 5-Azacytidin oder TSA, noch durch Kombination der beiden Agentien zu beobachten (Senigl *et al.* 2008).

Sehr wahrscheinlich spielen insbesondere nach einer längeren Kultivierung neben DNA-Methylierung und Chromatin-Modifikationen noch weitere zelluläre Mechanismen eine Rolle, die in die Regulation der Aktivität retroviraler Promotoren eingreifen können (McInerney *et al.* 2000; Swindle *et al.* 2002; Katz *et al.* 2007).

4.7 HERVs und Schizophrenie

Die Identifizierung spezifischer HERV Transkripte in Gehirnproben und CSF von Patienten mit Schizophrenie kann unterschiedliche Bedeutungen haben: Zum Einen können HERVs eine ursächliche Rolle bei der Ätiopathogenese von Schizophrenie spielen, andererseits kann ihre Expression jedoch auch eine Folge der Erkrankung darstellen (Zur Hausen 2009; Balada *et al.* 2009). Außerdem müssen Effekte der Medikation berücksichtigt werden, die zu einer Veränderung der Genexpression und damit auch der Expression von HERVs führen können.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass zumindest einige in der Therapie der Schizophrenie eingesetzten Medikamente *in vitro* einen erheblichen Einfluss auf die HERV Aktivität haben können und somit eine Beurteilung der Bedeutung der HERV Transkripte in Patienten erschweren. Die hier gewonnenen Resultate deuten an, dass die in Patienten gefundenen erhöhten Aktivitäten von HERV-W und ERV9 möglicherweise eher eine Folge der Medikation sein können, während HERV-K(HML-2) vielmehr mit der Erkrankung assoziiert zu sein scheint.

Schizophrenie, eine schwerwiegende psychische Erkrankung, wird als multifaktorielle Erkrankung rätselhaften Ursprungs angesehen, deren Entstehung sowohl eine genetische Komponente als auch Umweltfaktoren in sich vereint. HERVs könnten sowohl zu den genetischen als auch zu den äußeren Faktoren gezählt werden. Eine Rolle von HERVs bei Schizophrenie wurde erstmals von Yolken *et al.* 2000 postuliert und wird bis heute diskutiert (Yolken *et al.* 2000; Yolken *et al.* 2001; Otowo *et al.* 2006; Voisset *et al.* 2008; Christensen 2010). Diese Hypothese stützt sich auf verschiedene experimentelle Befunde, die den Nachweis von HERV Transkripten und Proteinen in Gehirngewebe, CSF oder Blut um fassen (Karlsson *et al.* 2001; Frank *et al.* 2005; Huang *et al.* 2006; Yao *et al.* 2008).

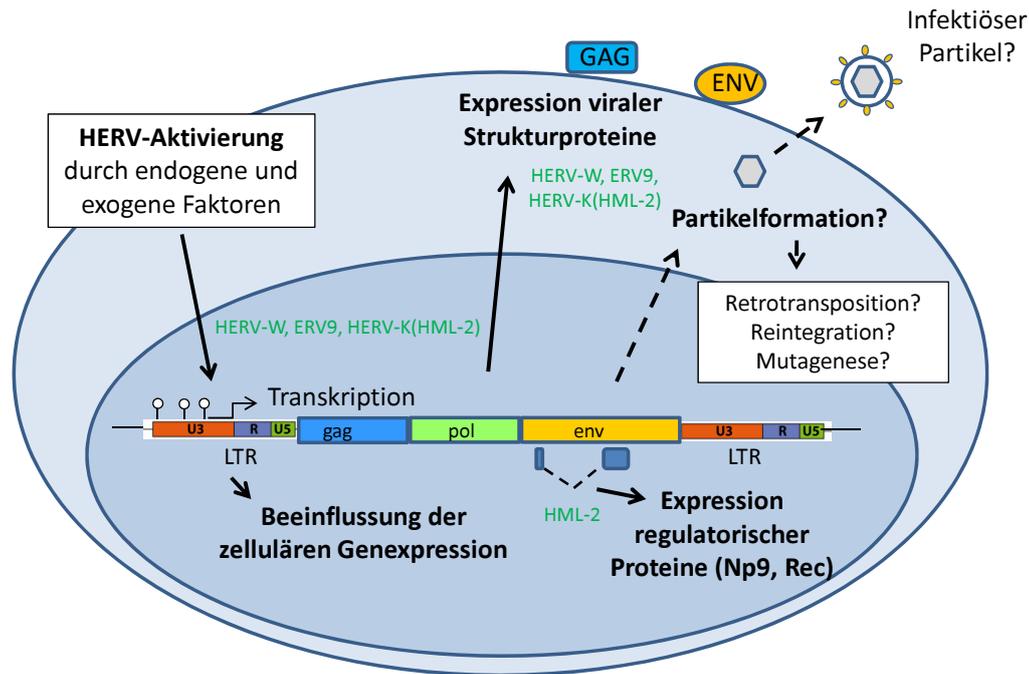


Abb. 37: Hypothetische Überlegung zur Rolle von HERVs bei der Ätiopathogenese von Schizophrenie. Eine Aktivierung von HERVs kann unterschiedliche Auswirkungen haben. So können aktivierte HERV LTRs benachbarte Gene beeinflussen oder funktionale Strukturproteine produzieren, wie z. B. Env Proteine, die bereits mit anderen neurologischen Erkrankungen assoziiert worden sind. Einige HERVs exprimieren regulatorische Proteine, die mit zellulären Transkriptionsfaktoren interagieren und somit die Expression zellulärer Gene verändern können. [Graphik verändert nach Moyes *et al.* 2007; Balada *et al.* 2009; Huang *et al.* 2010].

Da insgesamt wenig über die Pathogenese der Schizophrenie auf molekularer Ebene bekannt ist, ist es auch entsprechend schwierig, sich mögliche Pathogenesemechanismen vorzustellen, in die HERVs involviert sein könnten. Einige Anhaltspunkte liefern jedoch andere Erkrankungen, bei denen eine Rolle von HERVs postuliert wird, wie zum Beispiel Multiple Sklerose oder Krebs (Romanish *et al.* 2010; Voisset *et al.* 2008; Christensen 2010). Unter diesem Aspekt können hauptsächlich drei verschiedene Mechanismen unterschieden werden, die möglicherweise auch bei Schizophrenie mitwirken könnten.

Zum einen können manche aktivierte HERV Gruppen, wie HERV-W funktionale Strukturproteine bilden. Dies beruht darauf, dass eine Reihe von HERVs noch intakte ORFs aufweisen (Mager *et al.* 2003). Nach einigen Autoren sind Env oder Gag Proteine von zentraler Bedeutung vor allem bei Autoimmunerkrankungen wie MS, da sie Entzündungsreaktionen auslösen und durch Interaktion mit dem „Toll-like“ Rezeptor 4 Immunantworten hervorrufen können (Moyes *et al.* 2007; Perron *et al.* 2010; Antony *et al.* 2011).

Huang *et al.* konnten zeigen, dass eine Überexpression des HERV-W Env Proteins in der Glioblastomzelllinie U-251MG zu einer Hochregulierung verschiedener Gene führt (Huang *et al.* 2010). Darunter sind auch einige mit Schizophrenie assoziierte Gene, wie das BDNF („brain-derived neurotrophic factor“)-Gen, sowie das Tyrosinkinase Gen (NTRK2) und das Gen für den Dopaminrezeptor D3 (DRD3).

Ein weiterer Pathogenesemechanismus betrifft vor allem Elemente der HERV-K(HML-2) Gruppe, welche neben den Strukturproteinen auch regulatorische Proteine, wie Rec und Np9 produzieren können, die mit zellulären Transkriptionsfaktoren interagieren. Eine Beteiligung der Proteine Rec und Np9 an der Krebsentstehung wurde des Öfteren postuliert (Romanish *et al.* 2010). Bemerkenswert ist eine Studie von Galli *et al.*, die zeigen konnten, dass transgene Mäuse, die induzierbar Rec exprimieren, ein Carcinoma *in situ* entwickeln, das einer Vorstufe von Keimzelltumoren des Menschen entspricht (Galli *et al.* 2005). Eine erhöhte Expression von HERV-K(HML-2) Elementen, insbesondere von gespleißten, Rec codierenden Transkripten in menschlichen Keimzelltumoren wie Seminomen, wurde mehrfach in der Literatur beschrieben (Löwer *et al.* 1995; Herbst *et al.* 1996; Sauter *et al.* 1996; Magin *et al.* 1999, Yang *et al.* 1999). Das Rec Protein interagiert mit dem transkriptionellen Repressor PLZF („Promyelocytic leukemia zinc-finger protein“) (Denne *et al.* 2001). Außerdem konnte auch eine Interaktion mit dem Repressor TZFP („testicular zinc-finger protein“) nachgewiesen werden, bei der die N- und C-terminalen Domänen von Rec und die C-terminale Domäne von TZFP involviert sind (Kaufmann *et al.* 2010). Np9 wurde ebenfalls in Keimzelltumoren, aber auch in Melanomen detektiert (Buscher *et al.* 2005). Dieses Protein interagiert mit einem Liganden des Numb Proteins X (LNx) und hat eine destabilisierende Auswirkung auf den Notch-Signaltransduktionsweg (Armbrüster *et al.* 2004).

Zuletzt sei die Stimulierung von benachbarten, zellulären Genen durch aktivierte HERV LTRs genannt. Dazu ist nicht unbedingt eine Neuintegration eines Provirus durch Retrotransposition oder Neuinfektion durch retrovirale Partikel erforderlich. Das menschliche Genom beinhaltet eine enorme Anzahl von LTR Elementen mit einer Vielzahl regulatorischer Sequenzen, welche nachweislich die Expression zellulärer Gene beeinflussen können (Landry und Mager, 2002; Jordan *et al.*, 2003; Jern und Coffin 2008). Dabei können durch alternatives Splicing, variable Transkriptionsstartstellen oder Polyadenylierungsstellen neue Genprodukte entstehen (Villesen *et al.* 2004; Leib-Mösch *et al.* 2005; Christensen 2010). Zum Beispiel konnten Lamprecht *et al.* nachweisen, dass eine abweichende LTR Regulierung des Gens *CSF1R* („colony-stimulating factor 1 receptor“) an der Pathogenese von menschlichen Lymphomen beteiligt ist (Lamprecht *et al.* 2010). Nakamura *et al.* fanden, dass zwei im Gehirn aktive HERV Loci der Gruppen HERV-K(HML-2) und HERV-H in unmittelbarer Nähe von mit Schizophrenie assoziierten Genombereichen (SCZD9 und SCZD4) lokalisiert sind (Nakamura *et al.* 2003). Damit wäre eine krankheitsrelevante Interaktion mit Genen, die für die Gehirn-Entwicklung oder Funktion essentiell sind, denkbar.

4.8 Ausblick

Ein verbessertes Verständnis über die Rolle von HERVs bei der Ätiopathogenese von Schizophrenie kann zu neuen Methoden bei der Diagnose, Behandlung, aber auch bei der Prävention dieser schwerwiegenden psychischen Erkrankung führen (Yolken *et al.* 2000; Balada *et al.* 2009). Dazu ist es auch wichtig, Einflüsse der Medikation von krankheitsrelevanten Zusammenhängen klar zu unterscheiden. All dies stärkt die Notwendigkeit, dass die Rolle von HERVs aber auch ihre Biologie besser verstanden werden muss. Zumal der hohe Prozentsatz von bis zu 9% im menschlichen Genom und die zahlreichen Untersuchungen, die eine Rolle bei der Krankheitsentstehung andeuten, sehr gute Gründe liefern, diese verstärkt in Zukunft weiter zu erforschen.

5 Zusammenfassung

Mehr als 8% des menschlichen Genoms bestehen aus Relikten früherer Keimbahninfektionen durch exogene Retroviren. Einige Gruppen dieser sogenannten humanen endogenen Retroviren (HERVs) werden mit verschiedenen Krankheiten, wie Krebs, Autoimmun-, aber auch neurologischen Erkrankungen assoziiert. Ein Beispiel hierfür ist Schizophrenie, eine sehr komplexe und schwerwiegende psychische Störung mit einer weltweiten Prävalenz von 1%. Die Ursache dieser Erkrankung ist bislang nicht geklärt, jedoch gilt ein Zusammenspiel zwischen einer genetischen Prädisposition und Umweltfaktoren als erwiesen. Unter anderem werden infektiöse Agenzien wie verschiedene Viren in Verbindung mit Schizophrenie diskutiert. So wurden wiederholt Transkripte und Proteine von mindestens drei HERV Gruppen, HERV-W, ERV9 und HERV-K(HML-2) in Gehirnproben von Patienten mit Schizophrenie oder auch Bipolaren Störungen identifiziert. Dies lässt vermuten, dass eine Aktivierung oder Hochregulierung verschiedener HERV Elemente bei der Ätiopathogenese eine Rolle spielen könnte. Mit Hilfe eines Retrovirus spezifischen Microarrays wurde schließlich das Expressionsprofil einer Vielzahl von HERVs in *postmortem* Gehirnproben von Patienten mit Schizophrenie und Bipolaren Störungen, sowie einer gesunden Kontrollgruppe analysiert. Auffallend war, dass die Gruppe HERV-K(HML-2) in beiden Patientengruppen signifikant überrepräsentiert war. Da jedoch die Mehrheit aller Patienten mit psychischen Störungen medikamentös behandelt wird und manche dieser Neuroleptika oder Antidepressiva die zelluläre Genexpression beeinflussen können, sind auch Auswirkungen der Medikation auf die HERV Expression nicht auszuschließen.

Um dies zu untersuchen, wurden die HERV Expressionsprofile eines breiten Spektrums humaner Gehirnzelllinien nach Behandlung mit Valproinsäure (VPA), Haloperidol, Risperidon und Clozapin mit Hilfe des Retrovirus spezifischen Microarrays bestimmt. Anhand eines MTT Tests wurde sichergestellt, dass die einzelnen Medikamente im nicht zytotoxischen Bereich verwendet wurden. Insgesamt wurden 24 HERV Gruppen mit 59 Subgruppen analysiert. Nach Behandlung mit VPA zeigten einige Vertreter der Klasse I HERVs sowie der Klasse II HERVs konzentrationsabhängig eine erhöhte Expression, während die anderen Medikamente die HERV Aktivität kaum zu ändern vermochten. Am stärksten betroffen waren HERV-W und ERV9. Interessanterweise wird die Gesamtexpression von HERV-K(HML-2) nicht wesentlich durch die getestete antipsychotische Medikation beeinflusst. Dies stärkt die Annahme, dass die HERV-K(HML-2) Expression mit der Erkrankung assoziiert ist. Alle Ergebnisse konnten durch qRT-PCR verifiziert werden. Gehirnproben von Rhesusaffen, die mit Haloperidol oder Clozapin behandelt worden waren, zeigten in Übereinstimmung mit den Zellkulturexperimenten keine signifikant veränderte HERV Aktivität. Um zu prüfen, ob sich die gewonnenen Erkenntnisse über eine aktivierende Wirkung von VPA auf Patienten übertragen lassen, wurde die HERV-W, ERV9 und HERV-K(HML-2) Aktivität unter Berücksichtigung der Medikation in *postmortem* Gehirnproben von Patienten mit Schizophrenie, Bipolaren Erkrankungen und gesunden Kontrollen quantifiziert. Mit VPA behandelte schizophrene Patienten zeigten eine geringfügig erhöhte Aktivität von HERV-W und ERV9 im Vergleich zu unbehandelten Personen. Unabhängig von der Medikation konnte eine erhöhte Expression von ERV9 und HERV-K(HML-2) in Patienten im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit VPA durchaus die HERV Expression vor allem der Gruppen HERV-W und ERV9 aktivieren kann, während HERV-K(HML-2) nicht signifikant beeinflusst wird.

In früheren Untersuchungen wurden 16 transkriptionell aktive HERV-K(HML-2) Proviren von insgesamt etwa 60 proviralen Loci pro haploidem Genom als im menschlichen Gehirn aktiv identifiziert. Während manche ubiquitär exprimiert werden, sind andere nur selten zu finden. Bemerkenswert ist, dass Transkripte von zwei HML-2 Loci nur in einem Patienten mit Schizophrenie detektiert wurden.

Um herauszufinden, warum manche HERV-K(HML-2) Loci im Gehirn aktiv sind, wurde der Methylierungsstatus ausgewählter Loci in Gehirnproben eines Gesunden und eines Schizophreniepatienten untersucht. Alle Loci waren in beiden Gehirnproben meist stark methyliert (80-96%). Als Kontrolle diente aufgrund der hohen HERV-K(HML-2) Aktivität die Teratokarzinom-Zelllinie Tera-1, die einen weit geringeren Methylierungsgrad aufwies (14-46%). Die Daten zeigen eine deutliche inverse Korrelation zwischen DNA Methylierung und transkriptioneller Aktivität einzelner HERV-K(HML-2) Loci.

Außerdem konnte in einer neuronalen Stammzelllinie als Modellsystem gezeigt werden, dass VPA, Haloperidol, Risperidon, sowie Clozapin keinen Einfluss auf den Methylierungsstatus eines einzelnen Locus haben. Im Gegensatz dazu konnte ein veränderter Chromatinstatus bei einem von vier ausgewählten HERV-K(HML-2) Loci nach Behandlung mit VPA nachgewiesen werden, obwohl die gesamte HERV-K(HML-2) Expression unbeeinflusst blieb. Diese Resultate zeigen, dass beim Stilllegen, wie auch bei der Aktivierung von HERVs eine Vielzahl von Faktoren, wie DNA Methylierung und Chromatinmodifikation zusammenspielen müssen.

Zuletzt wurde untersucht, wie *de novo* ins Genom integrierte HERV LTR Sequenzen im Vergleich zu bereits seit Millionen Jahren stabil im Genom integrierten Elementen reguliert werden. Hierfür wurden Zellklone verwendet, die mit vier unterschiedlichen pLXSN-HERV-H bzw. pLXSN-HERV-L-CordR Hybridvektoren infiziert worden waren. Die durch den HERV Promotor vermittelte, zellspezifische Expression des Reportergens *egfp* wurde über einen Zeitraum von sechs Monaten mittels FACS Analyse untersucht. Sechs von acht Zellklonen zeigten während der Langzeitstudie eine stabile Expression des Transgens. Lediglich in einer Pankreaskarzinomzelllinie (MIAPaCa-2) wurde ein kontinuierlicher Rückgang der Reportergenaktivität in zwei LXSN-HERV-H-MC16 Zellklonen beobachtet. Da dies nicht auf Mutationen zurückgeführt werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass epigenetische Modifikationen zu dem „Silencingprozess“ geführt haben. Insgesamt zeigen die Resultate jedoch, dass sich HERV LTRs sehr gut für die Konstruktion gewebespezifischer retroviraler Vektoren eignen und eine stabile Expression des Transgens vermitteln können.

6 Summary

About 8% of the human genome is composed of endogenous retroviruses (HERVs). Some HERV groups are associated with pathological conditions such as cancer, autoimmunity and neurological diseases. One example is schizophrenia, a highly complex and severe neuropsychiatric disorder with a prevalence of 1% worldwide. While the etiology is uncertain, it is known that the etiopathogenesis involves the interplay of complex polygenic influences and environmental risk factors. An association of infectious agents such as viruses with schizophrenia has often been hypothesized. Indeed, transcripts and proteins derived from at least three HERV groups, HERV-W, ERV9 and HERV-K(HML-2), were detected repeatedly in brain samples of patients with schizophrenia suggesting activation or upregulation of distinct HERV sequences may play a role in the etiopathogenesis. The expression profiles of a broad range of HERVs analyzed in brain samples from patients with schizophrenia, bipolar disorders and healthy controls using a retrovirus specific microarray particularly revealed a prevalence of HERV-K(HML-2) elements in both patient groups. Since most patients were treated with different neuroleptics and/or antidepressants that may influence gene expression, the question arises if antipsychotic medication can influence HERV activity and whether the overrepresentation of certain HERV transcripts may be due to the effects of drugs.

Therefore, HERV expression profiles of a broad range of human brain cells treated with different concentrations of valproic acid (VPA), haloperidol, risperidone and clozapine were analyzed using the retrovirus-specific microarray. MTT Assays were performed to make sure that the drugs were used in non-cytotoxic concentrations. The investigation of 24 HERV groups and 59 subgroups revealed that several HERV elements belonging to class I and class II HERVs are upregulated by the treatment with VPA showing the highest influence on HERV-W and ERV9. These results were quantified and confirmed using quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) methods. Remarkably, the expression level of HERV-K(HML-2) elements was not influenced by antipsychotic medication suggesting a possible association with the disease. Analysis of brain tissue of rhesus monkeys treated with haloperidol and clozapine resulted in no increase of endogenous retrovirus transcript levels in accordance with the cell culture results.

Using qRT-PCR, the expression of HERV-W, ERV9 and HERV-K(HML-2) was then quantified in *postmortem* brain samples of patients with schizophrenia, bipolar disorders and a healthy control group with regard to their medication. Patients with schizophrenia showed a slightly higher HERV-W and ERV9 expression associated with VPA treatment. Taken together these results suggest that antipsychotic medication may increase the expression of HERV-W and ERV9, but does not significantly influence the overall expression of HERV-K(HML-2) elements. An increased expression of ERV9 and HERV-K(HML-2) transcripts was observed in patients independent of medication.

A previous characterization of the HERV-K(HML-2) group revealed that, in total, 16 different proviruses out of about 60 HERV-K(HML-2) loci per haploid human genome are transcribed in human brain. Their activity profile ranges from ubiquitous to differentially or rarely expressed. Notably, transcripts derived from two HML-2 proviruses were only detected in a patient with

schizophrenia. The current study investigates why specific HERV-K(HML-2) Loci may be transcriptionally active in human brain. Since promoter methylation is the most common reason for HERV silencing, the methylation status of selected HERV-K(HML-2) loci was investigated in brain tissue from a schizophrenic patient as well as a healthy individual. All loci investigated in the brain of both individuals are highly methylated (80-96%). In contrast, the methylation level of HERV-K(HML-2) loci in human teratocarcinoma cells (Tera-1) showing particularly high HERV-K(HML-2) activity was much lower (14-46%). These results strongly indicate an inverse correlation between DNA methylation and transcriptional activity of HERV-K(HML-2) loci. Using human neural stem cells as a model system, no influence of VPA, haloperidol, risperidone or clozapine on the methylation status of a single HERV-K(HML-2) locus was observed. In contrast, VPA shows a clear effect on the chromatin status of one out of four selected HERV-K(HML-2) loci although HML-2 expression in total seems to remain unaffected. These data suggest that HERV silencing as well as activation may involve a variety of mechanisms including chromatin modification and DNA methylation and requires several steps for implementation.

Another goal of the current study was to compare the regulation of *de novo* integrated HERV LTRs and of HERV elements stably integrated in the human genome for millions of years. A leukemia virus (MLV)-based promoter conversion vector with the reporter gene *egfp* controlled by a cell type-specific HERV promoter was used to follow the long-term expression of the transgene. Cell clones infected with four different HERV-MLV hybrid vectors containing HERV-H and HERV-L sequences were monitored by FACS analysis over a period of six months. Six of eight analyzed clones showed a stable expression of the transgene over time. In one cell line (human pancreas carcinoma cells MIAPaCa-2) a decrease of the expression activity of two HERV-H vectors was observed. Since no essential mutations within the promoter region were detected, the HERV promoters were probably silenced by epigenetic modifications. In summary, by virtue of their high cell type specificity and longterm stability, HERV LTRs may be a useful tool for the construction of tissue-specific retroviral expression vectors.

A Anhang

Sequenzen der Oligonukleotide

Tab. 10: Lokalisierung, Sequenz-Quelle, Name und Oligonukleotid-Sequenz der Retrovirus-spezifischen, 5'-NH₂-markierten Oligonukleotiden ("Capture Probes")

Lokalisierung auf dem Microarray	Quelle	Name	Oligonukleotid-Sequenz (5'→3')
A6	U35102 (Medstrand <i>et al.</i> , 1993)	SEQHML1-1	ATGCTAAATAGCCCAACTGTTTGT TAAACTTATGTCAGAAAGCTA
		SEQHML1-2	TTAAGCCAGTTAGAGAACAGTTTA AAAAATGTTATATCATCCATT
A10	S77579 (Lefebvre <i>et al.</i> , 1995)	MOP 29-1	ATGTTAAATAGCCCAACTATTTTGT CAAACCTATGTTGGGAAAGTT
		MOP 29-2	ATTAAGCCAGTTAGAGAACAGTTT TAAAAATGTTATAGTATTCAT
E1	M14123 (Ono <i>et al.</i> , 1986)	HERV-K10-1	ATGCTTAATAGTCCAACCTATTTTGT CAGACTTTTGTAGGTCGAGCT
		HERV-K10-2	CTTCAACCAGTGAGAGAAAAGTT TTCAGACTGTTATATTATTCAT
E13	U87595 (Zsiros <i>et al.</i> , 1998)	HERV-K(D1.2)-1	ATGCTTAATAGTCCAACCTATTTTGT CAGACTTTTGTAGCTCAAGTT
		HERV-K(D1.2)-2	CTTCAACCAGTTAGAGACAAGTTT TCAGACTGTTATATCATTCAT
E5	AF298587, (Mayer <i>et al.</i> , 1999)	HERV-K(HML-2-HOM)-1	ATGCTTAATAGTCCAACCTATTTTGT CAGACTTTTGTAGGTCGAGCT
		HERV-K(HML-2-HOM)-2	CTTCAACCAGTTAGAGAAAAGTTT TCAGACTGTTATATTATTCAT
E9	U87588, (Zsiros <i>et al.</i> , 1998)	HERV-K(HP1)-1	ATGCTTAATAGTCCAACCTATTTTGT CAGACTTTTGTAGGTCGTGCT
		HERV-K(HP1)-2	CTTTAACCAGTTAGAGACAAGTTT TCAGACTGTTATATCATTCAT
E2	U35236 (Medstrand <i>et al.</i> , 1993)	SEQHML3-1	ATGTTAAACAGTCCAACAATTTGC CAGACTTATATGGGCAAGCAA
		SEQHML3-2	TTGAACCTACTCTTAAAAAATTTT CACAGTGTTACATTATTCATT

E6	S66676 (Kalden <i>et al.</i> , 1993)	HERV1SLE S66676-1	ATGATAAACAGTCCAACAATTTGC CAGGCATATGTAGGGCAAAC
		HERV1SLE S66676-2	AAWTGAACCTACYTGTA AAAAATT TTCAGTGTTACATTATTCATT
E17	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ26-1	CGTGTTAAACAGTCCGACTATTTG CCAGAAGTATGTGGGGGCAAG
		SEQ26-2	CAATTGAATCTACTCGTAAAAAAT TTTCACAGTGTTACATTATTC
E21	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ34-1	ATGTTAAATGGTCCCACAATTTGC CAGACATATGTGGGGCAAGCA
		SEQ34-2	CTTGAACCTTACTCATAAAAAATTT TCAGTGTTACATTATTTACTA
E10	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ43-1	ATGTTAAACAGTCCAACAATTTGC CAGATGTACGTGGTGCAAGC
		SEQ43-2	AATTGAACCTACTTGTAAAAAATT TTTGGTGTTACATTNTTCNTTA
E18	AF020092 (Seifarth <i>et al.</i> , 1995)	HERV-K-T47D-1	CATGCTTAATAGTCCCACTATTTG TCAGTATTTTGTGGGGCGTGT
		HERV-K-T47D-2	GCTTCAACCTGTCAGGGATCAGT TTCCCGATGTTACATCGTTCA
E14	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ10-1	ATGCTTAATAGTCCCACTATTTGT CAGTATTTTGTGGGGGTGTGC
		SEQ10-2	TTCAACCTGTCAGGGATTCAGTTT CCCCGATGTTACATCGTTTAC
E22	U35161 (Medstrand <i>et al.</i> , 1993)	SEQHML5-1	ATGCTGAACAGTCCTACCATGTG TCAGTAACATGTAAATCAAGCT
		SEQHML5-2	TTGCTCCCCAGTAGAAAATAATTT CCTAATTGCAAGATTATTCAT
A14	U60269 (Medstrand <i>et al.</i> , 1997)	HERV-K(HML-6)-1	ATGCTTAACAGTCTTACGCTATGT CAGCATTTTGTAGGACAGGCA
		HERV-K(HML-6)-2	TTAAAGAAGCCTCGGAATATGTTT CCTACTGCTTACATCATTTCAT
A18	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ38-1	ATGCTCAACACCTACGTTAAGTCA GCATTTTGTAGGAAGAGCATT

		SEQ38-2	AAAGGACTCTCAGAATATGTTTCC CACTGCCTACATCGTTCATTA
A22	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ56-1	ATGCTTAACAGCATTATATCAGCA TGTTGTAGGATAGGCATTA
		SEQ56-2	GGTGCCTCTGAATATGTTTCCCA CAGCCTACATCCGTCATTATAT
B6	U07856, (Dangel <i>et al.</i> , 1994)	HERV-KC4 U07856-1	ATGTAAATAGTCCCACAGTTTGT CAAACTTTTGTAGGCAGAACT
		HERV-KC4 U07856-2	ATCCAGCCTGTTAGAGATCAGTTT CCAGATTTGTGCAGCAAAAAG
B10	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ31-1	ATGTAAACAGTTCACAGTTTGT CAAACTTTTGTAGGCAAAGCT
		SEQ31-2	ATCCAGCTAGTTAGAGATCAATTT CCAGATTGTTACATCATTAT
B21	U39937 (Li <i>et al.</i> , 1995)	HERV-K U39937-1 = HERV-K10	ATGCTTAATAGTCCAACATTTTGT CAGACTTTTTGTAGGTCGAGCT
		HERV-K U39937-2 = HERV-K10	CTTCAACCAGTTAGAGAAAAGTTT TCAGACTGTTATATTATTAT
B22	(NMWV7) (HERVK11DI)	HML7-1	ATGATTAACAGTCCTACTATTTTGT CAGTTGTTTGTGCGTACTGT
	Repbase (Jurka, 2000)	HML7-2	GTTACAACCTATCCGACAGACTTT TAAAATAATTACATTCTTCAT
B18	(NMWV3) (HERVK11)	HML8-1	ATGCTAAATAGCCCTACAATCTGC CAGCTTTATGTTGGACAAGTG
	Repbase (Jurka, 2000)	HML8-2	CTTTCACCAGTTCGAGCCCAATTT CCCAGGCCTATATTCTTCAT
B14	AC025569 nt 93650- 93890	HML9-1	ATGATAAATAGCCCACTACATGTC AGCTTTACGTACTTGAAGCCT
	Repbase (Jurka, 2000)	HML9-2	TACTTTCTGTGCGTCCATCCTTCC CCCAGGCAAAAATCTTCCAC
B2	(Zsiros <i>et al.</i> , 1998)	HERV-K(P3)-1	CTGCTCAATAGCCCCACTATTTTGT CAATATTATGTGGGATGCATA
	(AF030047)	HERV-K(P3)-2	TTAAAGCCAGTTAGAGATAAATTT CCCCAATGTTATATTATTAT

A7	G895836 (Cordonnier <i>et al.</i> , 1995)	HERV-L G895836-1	TATATCAACTCTCCGGCTTTGTGT CATAATCTTATTCAGAGTGT
		HERV-L G895836-2	CTTGATCACTTTTCACTGCCACAA GATATCACACTGGTCCATTAC
A11	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ39-1	GTATATCAACTCTCCAGCTTTGTG TCATCATCTTATTCAGAGATA
		SEQ39-2	CCTTGATCACTTTTCACTTCTGCA AGATATCATGCTGGTCCATTA
E15	(Z93019) (Tristem, 2000)	HS49C23-1	TTTACCGAAGCCCCTTCATATTTT TCCCAAACATTGCATCAGGAA
		HS49C23-2	TTGGCACTACAATTCGTCAAAAT TCTACTCTCATT CAGTACATA
A15	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ45-1	TATATCAGTTATCTGGCTTTGTGA CGTAATCTTATTTGGAGAGAT
		SEQ45-2	CTAGATAACTTTTCACTTCCACAA GATATCACACTGGTCCACTAC
A4	(Z84470) (Tristem, 2000)	HERV-S-1	TATGTGCATAGCCCCACCATTTGT CATGGTTTTGTTGCCATGGAC
		HERV-S-2	TTAGCCGCCTGGAATTGTCCAAA AGGGGTCAGCCTGTTTCATTAT
A19	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ51-1	TGTATCAACTCTCTGGCTTTGTGT CATAATCTTACCTGGAGACAT
		SEQ51-2	CTTGATCGCTTTTTGCTTCCACNA GATATCACACTGGTCCATTAT
A23	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ58-1	TATATCAACTCTCCAGTTTTGTGT CATAGTCTTAGTCAGAGAGAC
		SEQ58-2	CTTGATCACTTTTTGCTTCCATAA GACATCACACTGGCCATTAC
E7	U12970 (Haltmeier <i>et al.</i> , 1995)	S71pCRTK1-1	TTTAAAACTCCCCTACCCTTTTT GGGGAAGCCCTCCAACAGGAT
		S71pCRTK1-2	CTTATACCATTCTGAGCCAGTAAC CCTCACTGCACTCTTCTCCAG
E3	U12969 (Haltmeier <i>et al.</i> , 1995)	S71pCRTK6-1	TTTAAAAATTCCGCCACCCTTTTT GGGGAAGCCCTCCAACAAGAT

		S71pCRTK6-2	CTTCTACCATTCTGAGCCAGTCC CCTTAACTGTAACCTCTTCTTCA
E4	M10976 (Repaske <i>et al.</i> , 1985)	HERVE41-1	TTCAAGAACTCCCCACCATCTTT GGGGAGGCGTTGGCTCGAGA
		HERVE41-2	CCTCCAGAAGTTTCCCACCAGAG ACCTAGGCTGCGTGTGCTCC
E8	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ32-1	TTCAAGAACTCCCTTACTATCTTC GGGGAGGCTCTGACTTGAGAC
		SEQ32-2	TTGCAAAAGTTTCCTGCTAAAGAC CTAGGCTATGTCTTGCTCCTG
E11	U27240 (Seifarth <i>et al.</i> , 1995)	ERV-FRD-1	TTCAGAGATAGTCCCCATTTGTTT GGGCAAGCCTTGGCTAGATA
		ERV-FRD-2	TTTGCAGGACCTAAGTCTTTATAT GGAAGGGCATCTCCTACAG
A12	M92067 (Maeda <i>et al.</i> , 1990)	HERV-I-1	TTCATGGATTCACCCAACCTTTTT GGTCAAATTTTAGAACAAGTG
		HERV-I-2	CTAGACAAAGTTTCTGTTCCAAAA CAATTATGCCTGCTTCAATAT
A16	U27241 (Seifarth <i>et al.</i> , 1995)	ERV-FTD-1	TTCACAGACTCCCCTAATATTTTT GGTCAAATTTTAGAACAAGC
		ERV-FTD-2	ATTAGAAAAAGTTTTTCATTCCAGA ACAAATATGCCTTCTCCAG
A20	Herrmann, 1998 (pers. comm.)	SEQ65-1	AGACTCCCCTAATCTTTTTGGCCA AATTTTAGAACAAGTGTTAG
		SEQ65-2	AAAAAGTGGTCATCCCAAAGCAA ATATGCTTGCTCTAGTACATG
E16	AF026252 (Lindeskog <i>et al.</i> , 1998)	HERV-H AF026252-1	TTCACAGACAGCCCCATTACTT CAGTCAAGCCCAAATTTCTTCC
		HERV-H AF026252-2	TTATCTGTTACCTATCTCCGCATA ATTCTCATAAAAACACACGTG
E19	(Z69907) (Tristem, 2000)	HERV-Z-1	TTTAGGGATAGTCCCCATCCCATT GGGAATGCGTTGGCAAATAA
		HERV-Z-2	TTAAGGGAACACTACAGTTAACAAT GGATCTCTCCTACAATATGTG

E20	Hohenadl 1998 (pers. comm.)	SEQ66-1	TTCAGAGACAGCCCCCATTACTTT AGTCAAGCTCTTTCTCATGAT
		SEQ66-2	CTACTTTCTTTCCATCCATCTGTT TCTCACCTTATTCAATATATG
E12	HERV-H(RGH2 D11078)	RGH2-1	TTCAGGGGCAGCCCTTATTATTTT AGCCAAGCTCTTTCTCATGAT
		RGH2-2	TACTTTCTTTCCACCCCTCCACT TCTCACCTTATTCAATATATT
B20	HERV-Fb AC000378	HERV-Fb-1	TTCCAGGATAGCCTTCTTTTCTTC GGGCAAGCCCTAGCCCAAGAC
	= HERV-XA (Tristem, 2000)	HERV-Fb-2	CTTGCCCTCCTTGGATCTTTCCCC AGCCGCCTTCTTCAATATCTA
B11	AF009668 (Blond <i>et al.</i> , 1999) (MSRV)	HERV-W-1	TTCAGGGATAGCCCCCATCTATTT GGCCAGGCATTAGCCCAAG
		HERV-W-2	ACTTGAGTCAATTCTCATACCTGG ACACTCTTGTCCCTTCAGTAC
E23	HERV-R AC004609	HERV-R(ERV3)-1	TTCAAAAACCTCTTTACAATCTTT GAGGAAGCACTGGCCTCAAAC
		HERV-R(ERV3)-2	CTCAAGGCCTATACCCTGCCAAA TGATAACTGTGCCTTGTTTCAG
B24	(AC004045) (Tristem, 2000)	HERV-Rb-1	TTTAAAAACTCCCCAAGTATATTT GGAGAGGCTTTGATTCAAGAC
		HERV-Rb-2	TTGAGAGGTTACAATTAGAAAATG GGGTGCTACTTCAATATGTG
B12	(AC002416) (Tristem, 2000)	HERV-F2-1	TTCAGAAACAGCCCCCACCATTTT GGGCAGGCCCTTGCTCATGAC
		HERV-F2-2	CTCTGTATCTTATCCCTAAAACCG TCCACTCTCCTTCAATATGTT
B16	(Z94277) (Tristem, 2000)	HERV-F-1	TTTAGAGACGGCCCTCACTATTTT AGTCAGGCACTTCAGTTGGAC
		HERV-F-2	CTTTCCCAACTACCTCTATGATCC AGCATCTTGCTTCAGCACGAG
A8	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ77-1	TGGAAGGGAGGACTTGAGCACAT TCTTAAATGT

		SEQ77-2	GGCTCCTGTAATTTTTAACACATT GACACATGCTA
B23	HSERV9, X57147 (La Mantia <i>et al.</i> , 1991)	ERV9-1	TTTAGGGATAGCCCTCATCTGTTT GGTCAGGCCCTAGCCAAA
		ERV9-2	GATCTAGGCCACTTCTCAAGTCC AGGCACTCTGGTCCTTCAA
E24	(AC005741) (Tristem, 2000)	HERV-ADP-1	TTCAAATTTGTTCAAATCTTAGAA AACGTCCTGGAGGAATCCCAA
		HERV-ADP-2	ACTTCCAGGGGAACCCAGTTGTT GCAATATTGTA
B4	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ59-1	TTTAGGGATAGCCCTCATCTGTTT GGTCAGGCACAGGCCCAAG
		SEQ59-2	ATCTAGTTCACTTCTCAAGTCCAG GCACTCTGGTTGTTTCAGTAC
B8	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ60-1	TTTAGGGACAGCCCTCACTATTTT GGTCAGGCACTTCAATTAG
		SEQ60-2	ACCTCTCCCAGCTACATCTNCNN CCYNGCATCTTGCTTCAGTA
B19	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ63-1	TTCAGGGATAGCTCCCATCTATTT GGCCAGGCATTAACCCGAG
		SEQ63-2	ACTTAAGCCAGTTCTCATACGTG GACTCTTGTCTTTGGTA
B15	Herrmann 1998 (pers. comm.)	SEQ64-1	TTTAGAGATAGCCCTCACCTGTTT GGCCAAGCATTGGCCAAGA
		SEQ64-2	TTTAAGTCACTTCTTGCACCCAGG TACCCTAATTCTTCAATAT
A17	human beta actin E01094	bact-1 (exon)	ATGCCCCCGGGCCGTCTTCCCC TCCATCGTGGGGCGCCCCAGGC
		bact-2 (exon)	GCCCAGAGCAAGAGAGGCATCCT CACCTGAAGTACCCATCGAG
A5	human ubiquitin U49869	ubi-1 (exon)	GGTGGACGTGGTTGGTGATTGGC AGGATCCTGGTATCCGCTAACA
		ubi-2 (exon)	AAATGCAGATCTTCGTGAAAACC CTTACCGGCAAGACCATCACCC

A13	RPL19 NM_000981	RPL19	CACATCCACAAGCTGAAGGCAGA CAAGGCCCGCAAGAAGCT
A9	GAPD NM_002046.1	GAPD-1	ACTCTGGTAAAGTGGATATTGTTG CCATCAATGACCCCTTCATTG
		GAPD-2	ATGTTCCAATATGATTCCACCCAT GGCAAATTCATGGCACCGTC
A21	human HPRT NM_000194	HPRT-1	GGAAAGGGTGTATTTCCTCATG GACTAATTATGGACAGGACTGA
		HPRT-2	AGGGGGGCTATAAATTCTTTGCT GACCTGCTGGATTACATCAAAG
F4		MacERV1-1	ATTCAAAACTCTCCTACCCTGTT CGATGAGGCCCTCCATGAAGA
		MacERV1-2	CCTGGGTGAGTACCGACGCAAAC ACCCTGAAATAACCTTACTAC
F8		MacERV2-1	TCAAGAACTCGCCAACCCTGTTC GATGAAGCCCTTCATGAAGATC
		MacERV2-2	TGGGTGAGTACCGCGGCAACA CCCTGAAATAACTCTTTTGCAA
F12		MacERV3-1	TCAAGAACTCTCCCACTCTCTTCG ATGAGGCTCTTCATCGAGACCT
		MacERV3-2	GACCGACTTCCGGACCCAAAATC CAGAAGTGACTCTACTCCAGTAT G
F16		MacERV4-1	TGGCCAATAGTCCTACCTTGTGT CAAAAATATGTAGCTGCCGCTA
		MacERV4-2	TAGAGCCAGTCAGAAAAACGTGG GCACAAATGTATATTATACATT
F20		MacERV5-1	TCCGAGATAGCCCCATTTTTTCG GACAGGCACTGGCACGGG
		MacERV5-2	ACATCCTCCTCTGCCCCCTAACC CATAGCACCTTCTACAAT
B9		MacERV6-1	TCCGAGACAGCCCCACTTCTTT GGCAGGCATTGGCCAAAG
		MacERV6-2	ACCTAGCCCAGTGCCCATTCGCG TCCAGCACCTTATCCAG

B1		MacERVK1-1	TGCTTAATAGTCCTACCTTATGTC AAGAGTTTGTTCATAGAGCCT
		MacERVK1-2	TAAATCCTGTTAGATGTCAATTCC CTACTGTGTTAATATACCATT
B5		MacERVK2-1	TGTTAAACAGCCCTACCTTGTGTC AAGAATTTGTCCATCGGGCCT
		MacERVK2-2	TGGATCCTGTTCGAAAGCGTCAT CCTTCTGTTCTTTTATATCATT

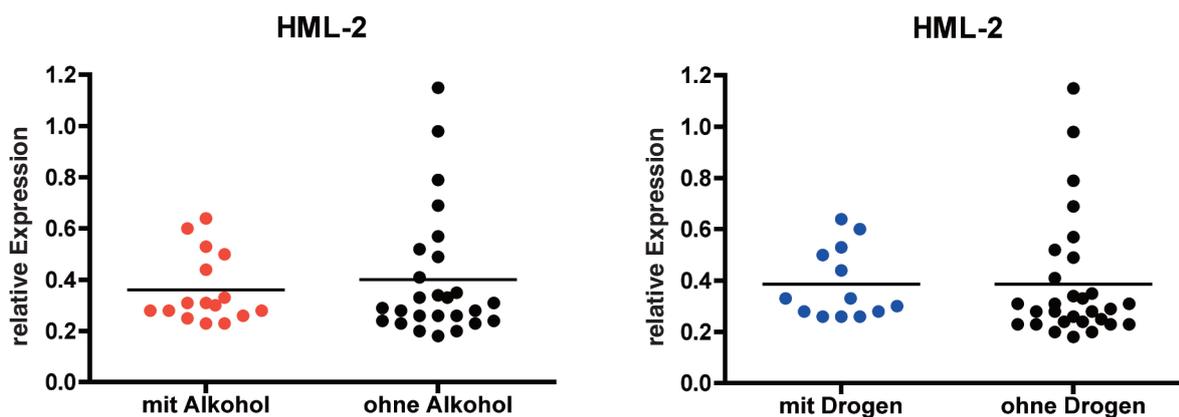
Tab. 11: Position und Oligonukleotid-Sequenz der Lokalisierungsnukleotide auf dem Retrovirus-spezifischen Microarray (nach Seifarth, unveröffentlicht).

Lokalisierung auf dem Microarray	Name	Oligonukleotid-Sequenz (5'→3')	Markierung	Oligomer
A1, A2, A3, F1, F2	Lokalisierungs-Oligonukleotide	TGGAAAGTGTTACCA CAAGG	5'-NH ₂ -C6-Seq-Cy3-3'	20-mer

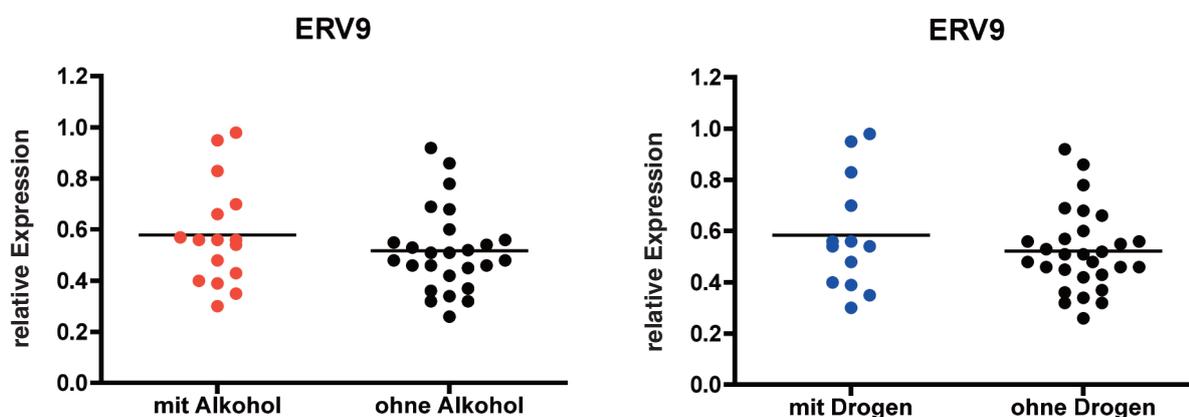
Tab.12: Kontroll-Oligonukleotid-Sequenzen für den Retrovirus-spezifischen Microarray (nach Seifarth, unveröffentlicht).

Name	Oligonukleotid-Sequenz (5'→3')	Markierung	Oligomer
antisense-2HOM	AGCTCGACCTACAAAAGTCTGACAAATA GTTGGACT	5'-Cy3-3'	42-mer
antisense-HERV-W	ATGAATAATCTTGCAATTAGGAAATTATT TTCTACTGGGGAG	5'-Cy3-3'	36-mer
antisense-HML-1	TAGCTTTCTGACATAAGTTTAACAAACA GTTGGGCT	5'-Cy3-3'	42-mer
antisense-HML-5	GTAAGGACAAGAGTGTCCAGGTA TGAGAATTGACTCAA	5'-Cy3-3'	36-mer
antisense-MMTV	CACAATATATGAGTCTTGGTATTTACTC CTTACAGTCAATAT	5'-Cy3-3'	42-mer

A



B



C

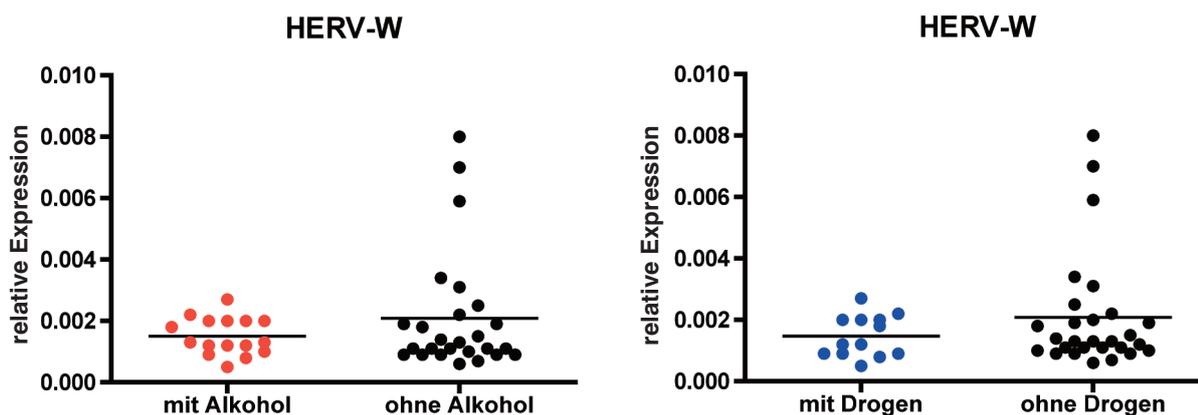


Abb. 38: Quantitative Analyse der HML-2 (A), ERV9 (B) und HERV-W (C) Expression von 42 *postmortem*-Proben mittels qRT-PCR. Es wurden 12 Patienten mit Schizophrenie, 20 Patienten mit Bipolaren Störungen und zehn Gesunde analysiert und hinsichtlich ihres Drogen- bzw. Alkoholkonsums aufgeteilt. Die Auswahl beruhte auf Patientendaten des „Stanley Medical Research Institute“ (SMRI), Baltimore, USA (Tab. 5). Die Auswertung der Daten erfolgte nach Pfaffl *et al.* (2001), keine der Messungen hatte ein Signifikanzniveau von 95%.

B Abkürzungen

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
5HT _{2A}	Serotonin-Rezeptor
A	Adenin
bp	Basenpaar
BPE	“Bovine pituitary extract”
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	Komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Cp	“crossing point”
CSF	„Cerebrospinal fluid“ (Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRD3	Dopamin Rezeptor D3
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	“Epidermal growth factor”
EGFP	„Enhanced Green Fluoreszenz Protein“
<i>env</i>	Gen für retrovirales Hüllprotein (Env)
Env	Retrovirales Hüllprotein Env
ERV	Endogenes Retrovirus
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i>
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
<i>gag</i>	Gen für retrovirales, gruppenspezifisches Antigen
Gag	Retrovirales, gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H1	Histamin-Rezeptor
H3	Histon 3
H3Ac	Acetyliertes Histon H3
HDAC	Histondeactylase

HERV	Humanes endogenes Retrovirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HKG	„Housekeeping“ Gen
HML	„Human MMTV-like“
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HSV	Herpes simplex virus
HTLV	Humanes T-Zell Leukämie Virus
IgG	Immunglobulin Gamma
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
LC	Light Cycler
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LINEs	„Long interspersed nuclear elements“
LTR	“Long terminal repeat”
M	Molar
M1	Acetylcholin-Rezeptor
MacERV	Makaken endogenes Retrovirus
MaLR	„Mammalian apparent LTR retrotransposition“
MLV	Murines Leukämievirus
mM	Millimolar
MMTV	„Mouse mammary tumor virus“
MOP	„Mixed oligonucleotide primer“
mRNA	messenger-RNA
MS	Multiple Sklerose
MSRV	Multiple Sklerosis-assoziiertes Retrovirus
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ORF	„Open reading frame“
PBS-Puffer	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
pmol	Picomol
<i>pol</i>	Gen für Polymerase
Pol	Polymerase
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase-PCR

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPII	RNA Polymerase II
rpm	„Revolutions per minute“
RT	Reverse Transkriptase
SA	Spleißakzeptor
SCZD	Schizophrenia
SD	Spleißdonor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SINEs	„Short interspersed nuclear elements“
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TF	Transkriptionsfaktor
T _m	Schmelztemperatur (Primer)
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Units, Einheit der Enzymaktivität
U3	„3C end unique“
U5	„5C end unique“
UV	Ultraviolett
VPA	Valproinsäure
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

C Literatur

- Albright, A. V., S. S. Soldan and F. Gonzalez-Scarano (2003). „Pathogenesis of human immunodeficiency virus-induced neurological disease.“ *J Neurovirol* **9**(2): 222-7.
- Andersson, M. L., M. Lindeskog, P. Medstrand, B. Westley, F. May, *et al.* (1999). „Diversity of human endogenous retrovirus class II-like sequences.“ *J Gen Virol* **80**(Pt 1): 255-60.
- Antony, J. (2011). „Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: Innocent bystanders or disease determinants?“ *Biochimica et Biophysica Acta* **1812**: 162-176.
- Armbruster, V., M. Sauter, E. Krautkraemer, E. Meese, A. Kleiman, *et al.* (2002). „A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells.“ *Clin Cancer Res* **8**(6): 1800-7.
- Armbruster, V., M. Sauter, K. Roemer, B. Best, S. Hahn, *et al.* (2004). „Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with ligand of numb protein X.“ *J Virol* **78**(19): 10310-9.
- Baay, M. F., W. G. Quint, J. Koudstaal, H. Hollema, J. M. Duk, *et al.* (1996). „Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas.“ *Journal of clinical microbiology* **34**(3): 745.
- Babushok, D. V. and H. H. Kazazian (2007). „Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1.“ *Human Mutation* **28**(6): 527-539.
- Balada, E., J. Ordi Ros and M. Vilardell Tarrés (2009). „Molecular mechanisms mediated by human endogenous retroviruses (HERVs) in autoimmunity.“ *Reviews in Medical Virology* **19**(5): 273-286.
- Bannert, N. and R. Kurth (2004). „Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **101 Suppl 2**: 14572-9.
- Barbulescu, M., G. Turner, M. Su, R. Kim, M. I. Jensen-Seaman, *et al.* (2001). „A HERV-K provirus in chimpanzees, bonobos and gorillas, but not humans.“ *Curr Biol* **11**(10): 779-83.
- Baust, C., W. Seifarth, H. Germaier, R. Hehlmann and C. Leib-Mosch (2000). „HERV-K-T47D-Related long terminal repeats mediate polyadenylation of cellular transcripts.“ *Genomics* **66**(1): 98-103.
- Belshaw, R., A. L. Dawson, J. Woolven-Allen, J. Redding, A. Burt, *et al.* (2005). „Genomewide screening reveals high levels of insertional polymorphism in the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML2): implications for present-day activity.“ *J Virol* **79**(19): 12507-14.
- Belshaw, R., A. Katzourakis, J. Paces, A. Burt and M. Tristem (2005). „High copy number in human endogenous retrovirus families is associated with copying mechanisms in addition to reinfection.“ *Mol Biol Evol* **22**(4): 814-7.
- Belshaw, R., V. Pereira, A. Katzourakis, G. Talbot, J. Paces, *et al.* (2004). „Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(14): 4894-9.
- Benit, L., J. B. Lallemand, J. F. Casella, H. Philippe and T. Heidmann (1999). „ERV-L elements: a family of endogenous retrovirus-like elements active throughout the evolution of mammals.“ *J Virol* **73**(4): 3301-8.
- Benkert, H. (2005). *Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie*. Springer Verlag.
- Berdasco, M. and M. Esteller (2010). „Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry.“ *Developmental Cell* **19**(5): 698-711.
- Bickmore, W. A. and S. M. van der Maarel (2003). „Perturbations of chromatin structure in human genetic disease: recent advances.“ *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2**: R207-13.

- Bieche, I., A. Laurent, I. Laurendeau, L. Duret, Y. Giovangrandi, *et al.* (2003). „Placenta-specific INSL4 expression is mediated by a human endogenous retrovirus element.“ *Biol Reprod* **68**(4): 1422-9.
- Bird, A. (2002). „DNA methylation patterns and epigenetic memory.“ *Genes Dev* **16**(1): 6-21.
- Bird, A. P. (1986). „CpG-rich islands and the function of DNA methylation.“ *Nature* **321**: 209-213.
- Bird, E. L. a. A. (2006). DNA Methylation in Mammals. *Epigenetics*. J. Allis C. D., T. and Reinberg D. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY: 341-353.
- Blond, J. L., F. Beseme, L. Duret, O. Bouton, F. Bedin, *et al.* (1999). „Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family.“ *J Virol* **73**(2): 1175-85.
- Boese, A., M. Sauter and N. Mueller-Lantzsch (2000). „A rev-like NES mediates cytoplasmic localization of HERV-K cORF.“ *FEBS Lett* **468**(1): 65-7.
- Boller, K., O. Janssen, H. Schuldes, R. R. Tonjes and R. Kurth (1997). „Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K.“ *J Virol* **71**(6): 4581-8.
- Boller, K., H. Konig, M. Sauter, N. Mueller-Lantzsch, R. Lower, *et al.* (1993). „Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV.“ *Virology* **196**(1): 349-53.
- Bonnaud, B., J. Beliaeff, O. Bouton, G. Oriol, L. Duret, *et al.* (2005). „Natural history of the ERVWE1 endogenous retroviral locus.“ *Retrovirology* **2**: 57.
- Bonnaud, B., O. Bouton, G. Oriol, V. Cheynet, L. Duret, *et al.* (2004). „Evidence of selection on the domesticated ERVWE1 env retroviral element involved in placentation.“ *Mol Biol Evol* **21**(10): 1895-901.
- Brady, T., Y. N. Lee, K. Ronen, N. Malani, C. C. Berry, *et al.* (2009). „Integration target site selection by a resurrected human endogenous retrovirus.“ *Genes Dev* **23**(5): 633-42.
- Brandeis, M., D. Frank, I. Keshet, Z. Siegfried, M. Mendelsohn, *et al.* (1994). „Spl elements protect a CpG island from de novo methylation.“ *Nature* **371**(6496): 435-438.
- Brorson, K., C. de Wit, E. Hamilton, M. Mustafa, P. G. Swann, *et al.* (2002). „Impact of cell culture process changes on endogenous retrovirus expression.“ *Biotechnology and bioengineering* **80**(3): 257-267.
- Brown, A. S. (2006). „Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia.“ *Schizophr Bull* **32**(2): 200.
- Buscher, K., U. Trefzer, M. Hofmann, W. Sterry, R. Kurth, *et al.* (2005). „Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines.“ *Cancer Res* **65**(10): 4172-80.
- Callahan, R., W. Drohan, S. Tronick and J. Schlom (1982). „Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(18): 5503-7.
- Camphausen, K., D. Cerna, T. Scott, M. Sproull, W. E. Burgan, *et al.* (2005). „Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by valproic acid.“ *International journal of cancer* **114**(3): 380-386.
- Chang, B. D., K. Watanabe, E. V. Broude, J. Fang, J. C. Poole, *et al.* (2000). „Effects of p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8): 4291.
- Chen, Y. X., J. Y. Fang, H. Y. Zhu, R. Lu, Z. H. Cheng, *et al.* (2004). „Histone acetylation regulates p21^{WAF1} expression in human colon cancer cell lines.“ *World journal of Gastroenterology* **10**(18): 2643-2646.
- Chen, Z., D. Li, L. Tong, P. Stewart, C. Chu, *et al.* (2006). „Targeted inhibition of p57 and p15 blocks transforming growth factor -inhibited proliferation of primary cultured human limbal epithelial cells.“ *Molecular vision* **12**: 983.
- Choi, K. H., B. W. Higgs, S. Weis, J. Song, I. C. Llenos, *et al.* (2009). „Effects of typical and atypical antipsychotic drugs on gene expression profiles in the liver of schizophrenia subjects.“ *BMC psychiatry* **9**(1): 57.

- Chong, V. Z., L. T. Young and R. K. Mishra (2002). „cDNA array reveals differential gene expression following chronic neuroleptic administration: implications of synapsin II in haloperidol treatment.“ *J Neurochem* **82**(6): 1533-9.
- Christensen, T. (2010). „HERVs in neuropathogenesis.“ *Journal of Neuroimmune Pharmacology*: 1-10.
- Christensen, T., P. Dissing Sorensen, H. Riemann, H. J. Hansen, M. Munch, *et al.* (2000). „Molecular characterization of HERV-H variants associated with multiple sclerosis.“ *Acta Neurol Scand* **101**(4): 229-38.
- Christman, J. K. (2002). „5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy.“ *Oncogene* **21**(35): 5483.
- Citrome, L. (2003). „Schizophrenia and valproate.“ *Psychopharmacology bulletin* **37**: 74.
- Clausen, J. (2003). „Endogenous retroviruses and MS: using ERVs as disease markers.“ *Int MS J* **10**(1): 22-8.
- Coffin, J. M., S. H. Hughes and H. E. Varmus (1997). *Retroviruses*.
- Colmegna, I. and R. F. Garry (2006). „Role of endogenous retroviruses in autoimmune diseases.“ *Infectious disease clinics of North America* **20**(4): 913.
- Conley, A. B., J. Piriyaopongsa and I. K. Jordan (2008). „Retroviral promoters in the human genome.“ *Bioinformatics* **24**(14): 1563-7.
- Contreras-Galindo, R., S. Almodovar-Camacho, S. Gonzalez-Ramirez, E. Lorenzo and Y. Yamamura (2007). „Comparative longitudinal studies of HERV-K and HIV-1 RNA titers in HIV-1-infected patients receiving successful versus unsuccessful highly active antiretroviral therapy.“ *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**(9): 1083-6.
- Contreras-Galindo, R., M. Gonzalez, S. Almodovar-Camacho, S. Gonzalez-Ramirez, E. Lorenzo, *et al.* (2006). „A new Real-Time-RT-PCR for quantitation of human endogenous retroviruses type K (HERV-K) RNA load in plasma samples: Increased HERV-K RNA titers in HIV-1 patients with HAART non-suppressive regimens.“ *J Virol Methods*.
- Contreras-Galindo, R., M. H. Kaplan, P. Leissner, T. Verjat, I. Ferlenghi, *et al.* (2008). „Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer.“ *J Virol* **82**(19): 9329-36.
- Cordonnier, A., J. F. Casella and T. Heidmann (1995). „Isolation of novel human endogenous retrovirus-like elements with foamy virus-related pol sequence.“ *J Virol* **69**(9): 5890-7.
- Coryell, W., D. D. Miller and P. J. Perry (1998). „Haloperidol plasma levels and dose optimization.“ *American Journal of Psychiatry* **155**(1): 48.
- Costello, J. F. and C. Plass (2001). „Methylation matters.“ *J Med Genet* **38**(5): 285-303.
- Coyle, J. T., G. Tsai and D. C. Goff (2002). „Ionotropic glutamate receptors as therapeutic targets in schizophrenia.“ *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders* **1**(2): 183-189.
- Crow, T. J. (1984). „A re-evaluation of the viral hypothesis: is psychosis the result of retroviral integration at a site close to the cerebral dominance gene?“ *Br J Psychiatry* **145**: 243-53.
- Dangel, A. W., A. R. Mendoza, B. J. Baker, C. M. Daniel, M. C. Carroll, *et al.* (1994). „The dichotomous size variation of human complement C4 genes is mediated by a novel family of endogenous retroviruses, which also establishes species-specific genomic patterns among Old World primates.“ *Immunogenetics* **40**(6): 425-36.

- Das, C. M., D. Aguilera, H. Vasquez, P. Prasad, M. Zhang, *et al.* (2007). „Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (/) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines.“ *Journal of Neuro-Oncology* **85**(2): 159-170.
- de Parseval, N., V. Lazar, J. F. Casella, L. Benit and T. Heidmann (2003). „Survey of human genes of retroviral origin: identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins.“ *J Virol* **77**(19): 10414-22.
- Denne, M., M. Sauter, V. Armbruster, J. D. Licht, K. Roemer, *et al.* (2007). „Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein.“ *J Virol* **81**(11): 5607-16.
- Depil, S., C. Roche, P. Dussart and L. Prin (2002). „Expression of a human endogenous retrovirus, HERV-K, in the blood cells of leukemia patients.“ *Leukemia* **16**(2): 254-9.
- Dewannieux, M., F. Harper, A. Richaud, C. Letzelter, D. Ribet, *et al.* (2006). „Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements.“ *Genome Res* **16**(12): 1548-56.
- Di Cristofano, A., M. Strazullo, L. Longo and G. La Mantia (1995). „Characterization and genomic mapping of the ZNF80 locus: expression of this zinc-finger gene is driven by a solitary LTR of ERV9 endogenous retroviral family.“ *Nucleic Acids Res* **23**(15): 2823-30.
- Dickerson, F., E. Rubalcaba, R. Viscidi, S. Yang, C. Stallings, *et al.* (2008). „Polymorphisms in human endogenous retrovirus K-18 and risk of type 2 diabetes in individuals with schizophrenia.“ *Schizophr Res* **104**(1-3): 121-126.
- Diem O., Schäffner S., Frohnmeyer M., Hemby S.E., Frank O., Seifarth W., Leib-Mösch C. (2010). „Influence of antipsychotic medication on endogenous retrovirus (ERV) expression in brain cells“. *Proceeding Medimond Centennial Retrovirus Meeting*, M501C0043, Prague (Czech Republic).
- Dong, E., M. Nelson, D. R. Grayson, E. Costa and A. Guidotti (2008). „Clozapine and sulpiride but not haloperidol or olanzapine activate brain DNA demethylation.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(36): 13614-9.
- Dragunow, M., J. M. Greenwood, R. E. Cameron, P. J. Narayan, S. J. O'Carroll, *et al.* (2006). „Valproic acid induces caspase 3-mediated apoptosis in microglial cells.“ *Neuroscience* **140**(4): 1149-56.
- Dunn, C. A., P. Medstrand and D. L. Mager (2003). „An endogenous retroviral long terminal repeat is the dominant promoter for human beta1,3-galactosyltransferase 5 in the colon.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22): 12841-6.
- Dunn, C. A., L. N. van de Lagemaat, G. J. Baillie and D. L. Mager (2005). „Endogenous retrovirus long terminal repeats as ready-to-use mobile promoters: the case of primate beta3GAL-T5.“ *Gene* **364**: 2-12.
- Ellis, J., K. C. Tan-Un, A. Harper, D. Michalovich, N. Yannoutsos, *et al.* (1996). „A dominant chromatin-opening activity in 5'hypersensitive site 3 of the human beta-globin locus control region.“ *Embo J* **15**(3): 562.
- Fasulo, W. H. and S. E. Hemby (2003). „Time-dependent changes in gene expression profiles of midbrain dopamine neurons following haloperidol administration.“ *J Neurochem* **87**(1): 205-19.
- Fatemi, S. H. and T. D. Folsom (2009). „The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited.“ *Schizophr Bull* **35**(3): 528.
- Feinberg, A. P. (2007). „Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease.“ *Nature* **447**(7143): 433-40.

- Ferno, J., S. Skrede, A. O. Vik-Mo, B. Havik and V. M. Steen (2006). „Drug-induced activation of SREBP-controlled lipogenic gene expression in CNS-related cell lines: marked differences between various antipsychotic drugs.“ *BMC Neurosci* **7**: 69.
- Feuchter-Murthy, A. E., J. D. Freeman and D. L. Mager (1993). „Splicing of a human endogenous retrovirus to a novel phospholipase A2 related gene.“ *Nucleic Acids Res* **21**(1): 135-43.
- Feuchter, A. and D. Mager (1990). „Functional heterogeneity of a large family of human LTR-like promoters and enhancers.“ *Nucleic Acids Res* **18**(5): 1261-70.
- Flockerzi, A., J. Maydt, O. Frank, A. Ruggieri, E. Maldener, *et al.* (2007). „Expression pattern analysis of transcribed HERV sequences is complicated by ex vivo recombination.“ *Retrovirology* **4**: 39.
- Flockerzi, A., A. Ruggieri, O. Frank, M. Sauter, E. Maldener, *et al.* (2008). „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* **9**: 354.
- Forsman, A., Z. Yun, L. Hu, D. Uzhameckis, P. Jern, *et al.* (2005). „Development of broadly targeted human endogenous gammaretroviral pol-based real time PCRs Quantitation of RNA expression in human tissues.“ *J Virol Methods* **129**(1): 16-30.
- Frangou, S. (2008). „Schizophrenia.“ **36**(8): 405-409.
- Frangou, S. and J. Kington (2004). „Schizophrenia.“ **32**(7): 21-25.
- Frank, O., M. Giehl, C. Zheng, R. Hehlmann, C. Leib-Mösch, *et al.* (2005). „Human endogenous retrovirus expression profiles in samples from brains of patients with schizophrenia and bipolar disorders.“ *J Virol* **79**(17): 10890-901.
- Frank, O., L. Jones-Brando, C. Leib-Mösch, R. Yolken and W. Seifarth (2006). „Altered transcriptional activity of human endogenous retroviruses in neuroepithelial cells after infection with *Toxoplasma gondii*.“ *J Infect Dis* **194**(10): 1447-9.
- Frank, O., C. Verbeke, N. Schwarz, J. Mayer, A. Fabarius, *et al.* (2008). „Variable transcriptional activity of endogenous retroviruses in human breast cancer.“ *J Virol* **82**(4): 1808-18.
- Fuchs, N. V., M. Kraft, C. Tondera, K. M. Hanschmann, J. Lower, *et al.* (2011). „Expression of the human endogenous retrovirus group HML-2/HERV-K does not depend on canonical promoter elements but is regulated by the transcription factors Sp1 and Sp3.“ *J Virol*: JVI. 02539-10v1.
- Galli, U. M., M. Sauter, B. Lecher, S. Maurer, H. Herbst, *et al.* (2005). „Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors.“ *Oncogene* **24**(19): 3223-8.
- Gartel, A. L. and S. K. Radhakrishnan (2005). „Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences.“ *Cancer research* **65**(10): 3980.
- Gibbs, R. A., J. Rogers, M. G. Katze, R. Bumgarner, G. M. Weinstock, *et al.* (2007). „Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome.“ *Science* **316**(5822): 222-34.
- Golan, M., A. Hizi, J. H. Resau, N. Yaal-Hahoshen, H. Reichman, *et al.* (2008). „Human endogenous retrovirus (HERV-K) reverse transcriptase as a breast cancer prognostic marker.“ *Neoplasia (New York, NY)* **10**(6): 521.
- Gottlicher, M., S. Minucci, P. Zhu, O. H. Kramer, A. Schimpf, *et al.* (2001). „Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells.“ *Embo J* **20**(24): 6969-78.
- Göttinger, N., M. Sauter, K. Roemer and N. Mueller-Lantzsch (1996). „Regulation of human endogenous retrovirus-K Gag expression in teratocarcinoma cell lines and human tumours.“ *J Gen Virol* **77**(Pt 12): 2983-90.

- Greenwood, A. D., A. Stengel, V. Erfle, W. Seifarth and C. Leib-Mosch (2005). „The distribution of pol containing human endogenous retroviruses in non-human primates.“ *Virology* **334**(2): 203-13.
- Griffiths, D. J. (2001). „Endogenous retroviruses in the human genome sequence.“ *Genome Biol* **2**(6): Reviews 1017.
- Guidotti, A., J. Auta, Y. Chen, J. M. Davis, E. Dong, *et al.* (2010). „Epigenetic GABAergic Targets in Schizophrenia and Bipolar Disorder.“ *Neuropharmacology*.
- Gurvich, N., O. M. Tsygankova, J. L. Meinkoth and P. S. Klein (2004). „Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation.“ *Cancer research* **64**(3): 1079.
- Haltmeier, M., W. Seifarth, J. Blusch, V. Erfle, R. Hehlmann, *et al.* (1995). „Identification of S71-related human endogenous retroviral sequences with full-length pol genes.“ *Virology* **209**(2): 550-60.
- Han, K., M. K. Konkel, J. Xing, H. Wang, J. Lee, *et al.* (2007). „Mobile DNA in Old World monkeys: a glimpse through the rhesus macaque genome.“ *Science* **316**(5822): 238-40.
- Herbst, H., M. Sauter and N. Mueller-Lantsch (1996). „Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumors.“ *Am J Pathol* **149**(5): 1727-35.
- Herniou, E., J. Martin, K. Miller, J. Cook, M. Wilkinson, *et al.* (1998). „Retroviral diversity and distribution in vertebrates.“ *J Virol* **72**(7): 5955-66.
- Hohenadl, C., H. Germaier, M. Walchner, M. Hagenhofer, M. Herrmann, *et al.* (1999). „Transcriptional activation of endogenous retroviral sequences in human epidermal keratinocytes by UVB irradiation.“ *J Invest Dermatol* **113**(4): 587-94.
- Howarth, J. L., Y. B. Lee and J. B. Uney (2010). „Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells).“ *Cell biology and toxicology* **26**(1): 1-20.
- Hsiao, F. C., M. Lin, A. Tai, G. Chen and B. T. Huber (2006). „Cutting edge: Epstein-Barr virus transactivates the HERV-K18 superantigen by docking to the human complement receptor 2 (CD21) on primary B cells.“ *J Immunol* **177**(4): 2056-60.
- Hsiao, F. C., A. K. Tai, A. Deglon, N. Sutkowski, R. Longnecker, *et al.* (2009). „EBV LMP-2A employs a novel mechanism to transactivate the HERV-K18 superantigen through its ITAM.“ *Virology* **385**(1): 261-6.
- Huang, W., S. Li, Y. Hu, H. Yu, F. Luo, *et al.* (2010). „Implication of the env Gene of the Human Endogenous Retrovirus W Family in the Expression of BDNF and DRD3 and Development of Recent-Onset Schizophrenia.“ *Schizophr Bull.*
- Huang, W. J., Z. C. Liu, W. Wei, G. H. Wang, J. G. Wu, *et al.* (2006). „Human endogenous retroviral pol RNA and protein detected and identified in the blood of individuals with schizophrenia.“ *Schizophr Res* **83**(2-3): 193-9.
- Hughes, J. F. and J. M. Coffin (2004). „Human endogenous retrovirus K solo-LTR formation and insertional polymorphisms: implications for human and viral evolution.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(6): 1668-72.
- Iwamoto, K., M. Bundo and T. Kato (2005). „Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis.“ *Hum Mol Genet* **14**(2): 241.
- Jaenisch, R. and A. Bird (2003). „Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.“ *Nat Genet* **33 Suppl**: 245-54.

- Jennings, H. R. and F. Romanelli (1999). „The use of valproic acid in HIV-positive patients.“ The Annals of pharmacotherapy **33**(10): 1113.
- Jern, P. and J. M. Coffin (2008). „Effects of retroviruses on host genome function.“ Annu Rev Genet **42**: 709-32.
- Jern, P., G. O. Sperber and J. Blomberg (2004). „Definition and variation of human endogenous retrovirus H.“ Virology **327**(1): 93-110.
- Jern, P., G. O. Sperber and J. Blomberg (2005). „Use of endogenous retroviral sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy.“ Retrovirology **2**: 50.
- Johnston, J. B., C. Silva, J. Holden, K. G. Warren, A. W. Clark, *et al.* (2001). „Monocyte activation and differentiation augment human endogenous retrovirus expression: implications for inflammatory brain diseases.“ Ann Neurol **50**(4): 434-42.
- Jones-Brando, L. V., J. L. Buthod, L. E. Holland, R. H. Yolken and E. Fuller Torrey (1997). „Metabolites of the antipsychotic agent clozapine inhibit the replication of human immunodeficiency virus type 1.“ Schizophr Res **25**(1): 63-70.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2007). „The epigenomics of cancer.“ Cell **128**(4): 683-92.
- Jordan, I. K., I. B. Rogozin, G. V. Glazko and E. V. Koonin (2003). „Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements.“ Trends Genet **19**(2): 68-72.
- Jurka, J. (2000). „Rebase update: a database and an electronic journal of repetitive elements.“ Trends in genetics **16**(9): 418-420.
- Jurka, J., V. V. Kapitonov, A. Pavlicek, P. Klonowski, O. Kohany, *et al.* (2005). „Rebase Update, a database of eukaryotic repetitive elements.“ Cytogenet Genome Res **110**(1-4): 462-7.
- Kalden, J. R. and M. Herrmann (1993). „Autoimmune diseases in humans, e.g. autoimmune rheumatic diseases.“ Intervirology **35**(1-4): 176-85.
- Kannan, P., R. Buettner, D. R. Pratt and M. A. Tainsky (1991). „Identification of a retinoic acid-inducible endogenous retroviral transcript in the human teratocarcinoma-derived cell line PA-1.“ J Virol **65**(11): 6343-8.
- Kapitonov, V. V. and J. Jurka (1999). „The long terminal repeat of an endogenous retrovirus induces alternative splicing and encodes an additional carboxy-terminal sequence in the human leptin receptor.“ J Mol Evol **48**(2): 248-51.
- Karlsson, H., S. Bachmann, J. Schroder, J. McArthur, E. F. Torrey, *et al.* (2001). „Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia.“ Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4634-9.
- Karlsson, H., J. Schroder, S. Bachmann, C. Bottmer and R. H. Yolken (2004). „HERV-W-related RNA detected in plasma from individuals with recent-onset schizophrenia or schizoaffective disorder.“ Mol Psychiatry **9**(1): 12-3.
- Kato, N., S. Pfeifer-Ohlsson, M. Kato, E. Larsson, J. Rydnert, *et al.* (1987). „Tissue-specific expression of human provirus ERV3 mRNA in human placenta: two of the three ERV3 mRNAs contain human cellular sequences.“ J Virol **61**(7): 2182-91.
- Kato, N., K. Shimotohno, D. VanLeeuwen and M. Cohen (1990). „Human proviral mRNAs down regulated in choriocarcinoma encode a zinc finger protein related to Kruppel.“ Mol Cell Biol **10**(8): 4401-5.
- Katsumata, K., H. Ikeda, M. Sato, A. Ishizu, Y. Kawarada, *et al.* (1999). „Cytokine Regulation of env Gene Expression of Human Endogenous Retrovirus-R in Human Vascular Endothelial Cells* 1.“ Clinical Immunology **93**(1): 75-80.

- Katz, R. A., E. Jack-Scott, A. Narezkina, I. Palagin, P. Boimel, *et al.* (2007). „High-frequency epigenetic repression and silencing of retroviruses can be antagonized by histone deacetylase inhibitors and transcriptional activators, but uniform reactivation in cell clones is restricted by additional mechanisms.“ *J Virol* **81**(6): 2592.
- Kaufmann, S., M. Sauter, M. Schmitt, B. Baumert, B. Best, *et al.* (2010). „Human endogenous retrovirus protein Rec interacts with the testicular zinc-finger protein and androgen receptor.“ *Journal of General Virology* **91**(6): 1494.
- Khodosevich, K., Y. Lebedev and E. D. Sverdlov (2004). „Large-scale determination of the methylation status of retrotransposons in different tissues using a methylation tags approach.“ *Nucleic Acids Res* **32**(3): e31.
- Kim, J., A. Kollhoff, A. Bergmann and L. Stubbs (2003). „Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3.“ *Hum Mol Genet* **12**(3): 233.
- Kjellman, C., H. O. Sjogren and B. Widegren (1999). „HERV-F, a new group of human endogenous retrovirus sequences.“ *J Gen Virol* **80**(Pt 9): 2383-92.
- Klein, D., S. Indraccolo, K. von Rombs, A. Amadori, B. Salmons, *et al.* (1997). „Rapid identification of viable retrovirus-transduced cells using the green fluorescent protein as a marker.“ *Gene Ther* **4**(11): 1256-60.
- Klose, R. J. and A. P. Bird (2006). „Genomic DNA methylation: the mark and its mediators.“ *Trends Biochem Sci* **31**(2): 89-97.
- Knossl, M., R. Lower and J. Lower (1999). „Expression of the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K is enhanced by cellular transcription factor YY1.“ *J Virol* **73**(2): 1254-61.
- Kouzarides, T. (2007). „Chromatin modifications and their function.“ *Cell* **128**(4): 693-705.
- Kowalski, P. E., J. D. Freeman and D. L. Mager (1999). „Intergenic splicing between a HERV-H endogenous retrovirus and two adjacent human genes.“ *Genomics* **57**(3): 371-9.
- Kundakovic, M., Y. Chen, A. Guidotti and D. R. Grayson (2009). „The reelin and GAD67 promoters are activated by epigenetic drugs that facilitate the disruption of local repressor complexes.“ *Molecular pharmacology* **75**(2): 342.
- Kwun, H. J., H. J. Han, W. J. Lee, H. S. Kim and K. L. Jang (2002). „Transactivation of the human endogenous retrovirus K long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein 0.“ *Virus Res* **86**(1-2): 93-100.
- La Mantia, G., D. Maglione, G. Pengue, A. Di Cristofano, A. Simeone, *et al.* (1991). „Identification and characterization of novel human endogenous retroviral sequences preferentially expressed in undifferentiated embryonal carcinoma cells.“ *Nucleic Acids Res* **19**(7): 1513-20.
- Laderoute, M. P., A. Giulivi, L. Larocque, D. Bellfooy, Y. Hou, *et al.* (2007). „The replicative activity of human endogenous retrovirus K102 (HERV-K102) with HIV viremia.“ *Aids* **21**(18): 2417-24.
- Lamprecht, B., K. Walter, S. Kreher, R. Kumar, M. Hummel, *et al.* (2010). „Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma.“ *Nat Med* **16**(5): 571-9, 1p following 579.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, *et al.* (2001). „Initial sequencing and analysis of the human genome.“ *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Landry, J. R. and D. L. Mager (2002). „Widely spaced alternative promoters, conserved between human and rodent, control expression of the Opitz syndrome gene MID1.“ *Genomics* **80**(5): 499-508.

- Landry, J. R., A. Rouhi, P. Medstrand and D. L. Mager (2002). „The Opitz syndrome gene Mid1 is transcribed from a human endogenous retroviral promoter.“ *Mol Biol Evol* **19**(11): 1934-42.
- Lania, L., A. Di Cristofano, M. Strazzullo, G. Pengue, B. Majello, *et al.* (1992). „Structural and functional organization of the human endogenous retroviral ERV9 sequences.“ *Virology* **191**(1): 464-8.
- Laufer, G., J. Mayer, B. F. Mueller, N. Mueller-Lantsch and K. Ruprecht (2009). „Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W env loci clarifies the origin of multiple sclerosis-associated retrovirus env sequences.“ *Retrovirology* **6**: 37.
- Lavie, L., M. Kitova, E. Maldener, E. Meese and J. Mayer (2005). „CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2).“ *J Virol* **79**(2): 876-83.
- Lebedev, Y. B., O. S. Belonovitch, N. V. Zybrova, P. P. Khil, S. G. Kurdyukov, *et al.* (2000). „Differences in HERV-K LTR insertions in orthologous loci of humans and great apes.“ *Gene* **247**(1-2): 265-77.
- Leboyer, M. and D. J. Kupfer (2010). „Bipolar Disorder: New Perspectives in Health Care and Prevention.“ *J Clin Psychiatry* **71**(12): 1689-1695.
- Lee, Y. N. and P. D. Bieniasz (2007). „Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus.“ *PLoS Pathog* **3**(1): e10.
- Lefebvre, S., B. Hubert, F. Tekaiia, M. Brahic and J. F. Bureau (1995). „Isolation from human brain of six previously unreported cDNAs related to the reverse transcriptase of human endogenous retroviruses.“ *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**(2): 231-7.
- Leib-Mösch, C., W. Seifarth and U. Schön (2005). Influence of human endogenous retroviruses on cellular gene expression. *Retroviruses and primate evolution*. E. D. Sverdlov. Georgetown, Texas, USA, Landes Bioscience.
- Leysen, J. E., P. M. Janssen, A. A. Megens and A. Schotte (1994). „Risperidone: a novel antipsychotic with balanced serotonin-dopamine antagonism, receptor occupancy profile, and pharmacologic activity.“ *J Clin Psychiatry* **55**: 5.
- Li, B., M. Carey and J. L. Workman (2007). „The role of chromatin during transcription.“ *Cell* **128**(4): 707-719.
- Li, J., Y. Guo, F. A. Schroeder, R. M. Youngs, T. W. Schmidt, *et al.* (2004). „Dopamine D2-like antagonists induce chromatin remodeling in striatal neurons through cyclic AMP-protein kinase A and NMDA receptor signaling.“ *J Neurochem* **90**(5): 1117-31.
- Li, M. D., D. L. Bronson, T. D. Lemke and A. J. Faras (1995). „Restricted expression of new HERV-K members in human teratocarcinoma cells.“ *Virology* **208**(2): 733-41.
- Li, W. H., Z. Gu, H. Wang and A. Nekrutenko (2001). „Evolutionary analyses of the human genome.“ *Nature* **409**(6822): 847-9.
- Li, X. N., Q. Shu, J. M. F. Su, L. Perlaky, S. M. Blaney, *et al.* (2005). „Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC.“ *Molecular cancer therapeutics* **4**(12): 1912.
- Lindeskog, M., P. Medstrand and J. Blomberg (1993). „Sequence variation of human endogenous retrovirus ERV9-related elements in an env region corresponding to an immunosuppressive peptide: transcription in normal and neoplastic cells.“ *J Virol* **67**(2): 1122-6.
- Lindeskog, M., P. Medstrand, A. A. Cunningham and J. Blomberg (1998). „Coamplification and dispersion of adjacent human endogenous retroviral HERV-H and HERV-E elements; presence of spliced hybrid transcripts in normal leukocytes.“ *Virology* **244**(1): 219-29.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). „Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ method.“ *Methods* **25**(4): 402-408.

- Löwer, R., K. Boller, B. Hasenmaier, C. Korbmacher, N. Müller-Lantzsch, *et al.* (1993). „Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(10): 4480-4.
- Löwer, R., R. R. Tonjes, C. Korbmacher, R. Kurth and J. Lower (1995). „Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K.“ *J Virol* **69**(1): 141-9.
- MacDonald, M. L., M. E. Eaton, J. T. Dudman and C. Konradi (2005). „Antipsychotic drugs elevate mRNA levels of presynaptic proteins in the frontal cortex of the rat.“ *Biol Psychiatry* **57**(9): 1041-51.
- Macfarlane, C. and P. Simmonds (2004). „Allelic variation of HERV-K(HML-2) endogenous retroviral elements in human populations.“ *J Mol Evol* **59**(5): 642-56.
- Macleod, D., J. Charlton, J. Mullins and A. P. Bird (1994). „Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island.“ *Genes Dev* **8**(19): 2282.
- Maeda, N. and H. Kim (1990). „Three Independent Insertions of Retrovirus-like Sequences in the Haptoglobin Gene Cluster of Primates.“ *Genomics* **8**: 671-683.
- Mager, D. L. and J. D. Freeman (1995). „HERV-H endogenous retroviruses: presence in the New World branch but amplification in the Old World primate lineage.“ *Virology* **213**(2): 395-404.
- Mager, D. L. and N. L. Goodchild (1989). „Homologous recombination between the LTRs of a human retrovirus-like element causes a 5-kb deletion in two siblings.“ *Am J Hum Genet* **45**(6): 848-54.
- Mager, D. L. and P. S. Henthorn (1984). „Identification of a retrovirus-like repetitive element in human DNA.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(23): 7510-4.
- Mager, D. L. and P. Medstrand (2003). Retroviral Repeat Sequences. *Nature encyclopedia of the human genome*. D. Cooper. London, United Kingdom, Nature Publishing Group: 57-63.
- Magin-Lachmann, C., S. Hahn, H. Strobel, U. Held, J. Lower, *et al.* (2001). „Rec (formerly Corf) function requires interaction with a complex, folded RNA structure within its responsive element rather than binding to a discrete specific binding site.“ *J Virol* **75**(21): 10359-71.
- Magin, C., R. Lower and J. Lower (1999). „cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K.“ *J Virol* **73**(11): 9496-507.
- Maksakova, I. A., D. L. Mager and D. Reiss (2008). „Keeping active endogenous retroviral-like elements in check: the epigenetic perspective.“ *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **65**(21): 3329.
- Mamedov, I., Y. Lebedev, G. Hunsmann, E. Khusnutdinova and E. Sverdlov (2004). „A rare event of insertion polymorphism of a HERV-K LTR in the human genome.“ *Genomics* **84**(3): 596-9.
- Mameli, G., L. Poddighe, V. Astone, G. Delogu, G. Arru, *et al.* (2009). „Novel reliable real-time PCR for differential detection of MSRVenv and syncytin-1 in RNA and DNA from patients with multiple sclerosis.“ *Journal of virological methods* **161**(1): 98-106.
- Martens, J. H. A., R. J. O’Sullivan, U. Braunschweig, S. Opravil, M. Radolf, *et al.* (2005). „The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome.“ *Embo J* **24**(4): 800-812.
- Matousková, M., J. Blazková, P. Pajer, A. Pavlíček and J. Hejnar (2006). „CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues.“ *Experimental cell research* **312**(7): 1011-1020.
- Mayer, J., S. Ehlhardt, M. Seifert, M. Sauter, N. Müller-Lantzsch, *et al.* (2004). „Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec protein coding capacity and transcriptional activity.“ *Virology* **322**(1): 190-8.

- Mayer, J. and E. Meese (2005). „Human endogenous retroviruses in the primate lineage and their influence on host genomes.“ *Cytogenet Genome Res* **110**(1-4): 448-56.
- Mayer, J., E. Meese and N. Mueller-Lantzsch (1997). „Multiple human endogenous retrovirus (HERV-K) loci with gag open reading frames in the human genome.“ *Cytogenet Cell Genet* **78**(1): 1-5.
- Mayer, J., E. Meese and N. Mueller-Lantzsch (1998). „Human endogenous retrovirus K homologous sequences and their coding capacity in Old World primates [In Process Citation].“ *J Virol* **72**(3): 1870-5.
- Mayer, J., M. Sauter, A. Racz, D. Scherer, N. Mueller-Lantzsch, *et al.* (1999). „An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7.“ *Nat Genet* **21**(3): 257-8.
- McInerney, J. M., J. R. Nawrocki and C. H. Lowrey (2000). „Long-term silencing of retroviral vectors is resistant to reversal by trichostatin A and 5-azacytidine.“ *Gene therapy* **7**(8): 653-663.
- Medstrand, P. and J. Blomberg (1993). „Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential transcription in normal human tissues.“ *J Virol* **67**(11): 6778-87.
- Medstrand, P., J. R. Landry and D. L. Mager (2001). „Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans.“ *J Biol Chem* **276**(3): 1896-903.
- Medstrand, P. and D. L. Mager (1998). „Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family.“ *J Virol* **72**(12): 9782-7.
- Medstrand, P., D. L. Mager, H. Yin, U. Dietrich and J. Blomberg (1997). „Structure and genomic organization of a novel human endogenous retrovirus family: HERV-K (HML-6).“ *J Gen Virol* **78**(Pt 7): 1731-44.
- Meisler, M. H. and C. N. Ting (1993). „The remarkable evolutionary history of the human amylase genes.“ *Crit Rev Oral Biol Med* **4**(3-4): 503-9.
- Mellert, W., A. Kleinschmidt, J. Schmidt, H. Festl, S. Emler, *et al.* (1990). „Infection of human fibroblasts and osteoblast-like cells with HIV-1.“ *Aids* **4**(6): 527-35.
- Mi, S., X. Lee, X. Li, G. M. Veldman, H. Finnerty, *et al.* (2000). „Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis.“ *Nature* **403**(6771): 785-9.
- Mikkelsen, T. S., M. Ku, D. B. Jaffe, B. Issac, E. Lieberman, *et al.* (2007). „Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells.“ *Nature* **448**(7153): 553-560.
- Miller, C. L., S. Diglisic, F. Leister, M. Webster and R. H. Yolken (2004). „Evaluating RNA status for RT-PCR in extracts of postmortem human brain tissue.“ *Biotechniques* **36**(4): 628-633.
- Mok, H. P., S. Javed and A. Lever (2007). „Stable gene expression occurs from a minority of integrated HIV-1-based vectors: transcriptional silencing is present in the majority.“ *Gene therapy* **14**(9): 741-751.
- Mortensen, P. B., C. B. Pedersen, T. Westergaard, J. Wohlfahrt, H. Ewald, *et al.* (1999). „Effects of family history and place and season of birth on the risk of schizophrenia.“ *New England Journal of Medicine* **340**(8): 603-608.
- Mosmann, T. (1983). „Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.“ *Journal of immunological methods* **65**(1-2): 55-63.
- Moyes, D., D. J. Griffiths and P. J. Venables (2007). „Insertional polymorphisms: a new lease of life for endogenous retroviruses in human disease.“ *Trends in genetics* **23**(7): 326-333.
- Muradrasoli, S., A. Forsman, L. Hu, V. Blikstad and J. Blomberg (2006). „Development of real-time PCRs for detection and quantitation of human MMTV-like (HML) sequences HML expression in human tissues.“ *J Virol Methods*.

- Muster, T., A. Waltenberger, A. Grassauer, S. Hirschl, P. Caucig, *et al.* (2003). „An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells.“ Cancer Res **63**(24): 8735-41.
- Nakagawa, K., V. Brusic, G. McColl and L. C. Harrison (1997). „Direct evidence for the expression of multiple endogenous retroviruses in the synovial compartment in rheumatoid arthritis.“ Arthritis Rheum **40**(4): 627-38.
- Nakamura, A., Y. Okazaki, J. Sugimoto, T. Oda and Y. Jinno (2003). „Human endogenous retroviruses with transcriptional potential in the brain.“ J Hum Genet **48**(11): 575-81.
- Nan, X., F. J. Campoy and A. Bird (1997). „MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin.“ Cell **88**(4): 471-81.
- Narayan, P. and M. Dragunow (2010). „Pharmacology of epigenetics in brain disorders.“ British journal of pharmacology **159**(2): 285-303.
- Narayan, S., K. E. Kass and E. A. Thomas (2007). „Chronic haloperidol treatment results in a decrease in the expression of myelin/oligodendrocyte-related genes in the mouse brain.“ J Neurosci Res **85**(4): 757-65.
- Nellaker, C., Y. Yao, L. Jones-Brando, F. Mallet, R. H. Yolken, *et al.* (2006). „Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection.“ Retrovirology **3**: 44.
- Nexø, B. A., T. Christensen, J. Frederiksen, A. Møller-Larsen, A. B. Oturai, *et al.* (2011). „The Etiology of Multiple Sclerosis: Genetic Evidence for the Involvement of the Human Endogenous Retrovirus HERV-Fc1.“ PLoS One **6**(2): e16652.
- O'Connor, J. A., W. Hasenkamp, B. M. Horman, E. C. Muly and S. E. Hemby (2006). „Region specific regulation of NR1 in rhesus monkeys following chronic antipsychotic drug administration.“ Biol Psychiatry **60**(6): 659-62.
- O'Connor, J. A., E. C. Muly, S. E. Arnold and S. E. Hemby (2007). „AMPA receptor subunit and splice variant expression in the DLPFC of schizophrenic subjects and rhesus monkeys chronically administered antipsychotic drugs.“ Schizophr Res **90**(1-3): 28-40.
- O'Reilly, R. L. and S. M. Singh (1996). „Retroviruses and schizophrenia revisited.“ Am J Med Genet **67**(1): 19-24.
- Ono, M., M. Kawakami and H. Ushikubo (1987). „Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D.“ J Virol **61**(6): 2059-62.
- Ono, M., T. Yasunaga, T. Miyata and H. Ushikubo (1986). „Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome.“ J Virol **60**(2): 589-98.
- Otowa, T., M. Tochigi, M. Rogers, T. Umekage, N. Kato, *et al.* (2006). „Insertional polymorphism of endogenous retrovirus HERV-K115 in schizophrenia.“ Neuroscience letters **408**(3): 226-229.
- Patzke, S., M. Lindeskog, E. Munthe and H. C. Aasheim (2002). „Characterization of a novel human endogenous retrovirus, HERV-H/F, expressed in human leukemia cell lines.“ Virology **303**(1): 164-73.
- Perron, H., C. Bernard, J. B. Bertrand, A. B. Lang, I. Popa, *et al.* (2009). „Endogenous retroviral genes, Herpesviruses and gender in Multiple Sclerosis.“ J Neurol Sci **286**(1-2): 65-72.
- Perron, H., J. A. Garson, F. Bedin, F. Beseme, G. Paranhos-Baccala, *et al.* (1997). „Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis.“ Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7583-8.
- Perron, H., C. Geny, A. Laurent, C. Mouriquand, J. Pellat, *et al.* (1989). „Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles.“ Research in virology **140**: 551-561.

- Perron, H., E. Jouvin-Marche, M. Michel, A. Ounanian-Paraz, S. Camelo, *et al.* (2001). „Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal V [beta] 16 T-lymphocyte activation.“ *Virology* **287**(2): 321-332.
- Perron, H., B. Lalande, B. Gratacap, A. Laurent, O. Genoulaz, *et al.* (1991). „Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis.“ *Lancet* **337**(8745): 862.
- Perron, H. and A. Lang (2010). „The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation.“ *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* **39**(1): 51-61.
- Perron, H., L. Mekaoui, C. Bernard, F. Veas, I. Stefan, *et al.* (2008). „Endogenous retrovirus type W GAG and envelope protein antigenemia in serum of schizophrenic patients.“ *Biol Psychiatry* **64**(12): 1019-23.
- Petersen, T., A. Moller-Larsen, S. Thiel, T. Brudek, T. K. Hansen, *et al.* (2009). „Effects of interferon-beta therapy on innate and adaptive immune responses to the human endogenous retroviruses HERV-H and HERV-W, cytokine production, and the lectin complement activation pathway in multiple sclerosis.“ *J Neuroimmunol* **215**(1-2): 108-116.
- Pfaffl, M. W. (2001). „A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.“ *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Pillai, A., R. Veeranan Karmegam, K. M. Dhandapani and S. P. Mahadik (2008). „Cystamine prevents haloperidol induced decrease of BDNF/TrkB signaling in mouse frontal cortex.“ *J Neurochem* **107**(4): 941-951.
- Piriyapongsa, J., N. Polavarapu, M. Borodovsky and J. McDonald (2007). „Exonization of the LTR transposable elements in human genome.“ *BMC Genomics* **8**: 291.
- Portis, J. L. (2002). „Perspectives on the role of endogenous human retroviruses in autoimmune diseases.“ *Virology* **296**(1): 1.
- Prusty, B. K., H. zur Hausen, R. Schmidt, R. Kimmel and E. M. de Villiers (2008). „Transcription of HERV-E and HERV-E-related sequences in malignant and non-malignant human haematopoietic cells.“ *Virology* **382**(1): 37-45.
- Qiu, J. (2006). „Epigenetics: Unfinished symphony.“ *Nature* **441**(7090): 143-145.
- Radonic, A., S. Thulke, I. M. Mackay, O. Landt, W. Siegert, *et al.* (2004). „Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR.“ *Biochem Biophys Res Commun* **313**(4): 856-862.
- Razin, A. (1998). „CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection.“ *Embo J* **17**(17): 4905-8.
- Reiss, D., Y. Zhang and D. L. Mager (2007). „Widely variable endogenous retroviral methylation levels in human placenta.“ *Nucleic Acids Res* **35**(14): 4743-54.
- Repaske, R., P. E. Steele, R. R. O'Neill, A. B. Rabson and M. A. Martin (1985). „Nucleotide sequence of a full-length human endogenous retroviral segment.“ *J Virol* **54**(3): 764-72.
- Reus, K., J. Mayer, M. Sauter, H. Zischler, N. Muller-Lantzsch, *et al.* (2001). „HERV-K(OLD): ancestor sequences of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2).“ *J Virol* **75**(19): 8917-26.
- Robertson, K. D. (2005). „DNA methylation and human disease.“ *Nature Reviews Genetics* **6**(8): 597-610.
- Robertson, K. D. and A. P. Wolffe (2000). „DNA methylation in health and disease.“ *Nat Rev Genet* **1**(1): 11-9.
- Romanish, M. T., C. J. Cohen and D. L. Mager (2010). „Potential mechanisms of endogenous retroviral-mediated genomic instability in human cancer.“ *Semin Cancer Biol* **20**(4): 246-53.

- Rosebush, P. I. and M. F. Mazurek (1999). „Neurologic side effects in neuroleptic-naive patients treated with haloperidol or risperidone.“ *Neurology* **52**(4): 782.
- Ruprecht, K., H. Ferreira, A. Flockerzi, S. Wahl, M. Sauter, *et al.* (2008). „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* **82**(20): 10008-16.
- Ruprecht, K., K. Obojes, V. Wengel, F. Gronen, K. S. Kim, *et al.* (2006). „Regulation of human endogenous retrovirus W protein expression by herpes simplex virus type 1: implications for multiple sclerosis.“ *J Neurovirol* **12**(1): 65-71.
- Sambrook, J., E. V. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular cloning - a laboratory manual*, Cold Spring Harbour Press.
- Samuelson, L. C., K. Wiebauer, D. L. Gumucio and M. H. Meisler (1988). „Expression of the human amylase genes: recent origin of a salivary amylase promoter from an actin pseudogene.“ *Nucleic Acids Res* **16**(17): 8261-76.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
- Santi, D. V., A. Norment and C. E. Garrett (1984). „Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(22): 6993.
- Sauter, M., K. Roemer, B. Best, M. Afting, S. Schommer, *et al.* (1996). „Specificity of antibodies directed against Env protein of human endogenous retroviruses in patients with germ cell tumors.“ *Cancer Res* **56**(19): 4362-5.
- Sauter, M., S. Schommer, E. Kremmer, K. Remberger, G. Dolken, *et al.* (1995). „Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas.“ *J Virol* **69**(1): 414-21.
- Schön, U., O. Diem, L. Leitner, W. H. Gunzburg, D. L. Mager, *et al.* (2009). „Human endogenous retroviral long terminal repeat sequences as cell type-specific promoters in retroviral vectors.“ *J Virol* **83**(23): 12643-50.
- Schön, U., W. Seifarth, C. Baust, C. Hohenadl, V. Erfle, *et al.* (2001). „Cell type-specific expression and promoter activity of human endogenous retroviral long terminal repeats.“ *Virology* **279**(1): 280-91.
- Schotte, A., P. F. M. Janssen, W. Gommeren, W. H. M. L. Luyten, P. Gompel, *et al.* (1996). „Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: in vitro and in vivo receptor binding.“ *Psychopharmacology* **124**(1): 57-73.
- Schulz, W., C. Steinhoff and A. Florl (2006). „Methylation of endogenous human retroelements in health and disease.“ *DNA Methylation: Development, Genetic Disease and Cancer*: 211-250.
- Schwarz, C., A. Volz, C. Li and S. Leucht (2008). „Valproate for schizophrenia.“ *Cochrane database of systematic reviews (Online)*(3): CD004028.
- Seifarth, W., C. Baust, A. Murr, H. Skladny, F. Krieg-Schneider, *et al.* (1998). „Proviral structure, chromosomal location, and expression of HERV-K- T47D, a novel human endogenous retrovirus derived from T47D particles.“ *J Virol* **72**(10): 8384-91.
- Seifarth, W., O. Frank, U. Zeilfelder, B. Spiess, A. D. Greenwood, *et al.* (2005). „Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus transcriptional activity in human tissues with a retrovirus-specific microarray.“ *J Virol* **79**(1): 341-52.

- Seifarth, W., U. Krause, C. Hohenadl, C. Baust, R. Hehlmann, *et al.* (2000). „Rapid identification of all known retroviral reverse transcriptase sequences with a novel versatile detection assay.“ *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**(8): 721-9.
- Seifarth, W., H. Skladny, F. Krieg-Schneider, A. Reichert, R. Hehlmann, *et al.* (1995). „Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenous retroviral sequences.“ *J Virol* **69**(10): 6408-16.
- Seifarth, W., B. Spiess, U. Zeilfelder, C. Speth, R. Hehlmann, *et al.* (2003). „Assessment of retroviral activity using a universal retrovirus chip.“ *J Virol Methods* **112**(1-2): 79-91.
- Seifarth, W. F., O. Schreml, Julia. Leib-Mösch, C. (2009). RetroArray-A comprehensive Diagnostic DNA Chip for Rapid Detection and Identification of Retroviruses, Retroviral Contaminants, and Mistaken Identity of Cell Lines. DNA Fingerprinting, Sequencing and Chips. I. *Nova Sciences Publishers*, New York: 87-118.
- Senigl, F., J. Plachy and J. Hejnar (2008). „The core element of a CpG island protects avian sarcoma and leukosis virus-derived vectors from transcriptional silencing.“ *J Virol* **82**(16): 7818-27.
- Shahbazian, M. D. and H. Y. Zoghbi (2002). „Rett syndrome and MeCP2: linking epigenetics and neuronal function.“ *Am J Hum Genet* **71**(6): 1259-72.
- Sharma, R. P., C. Rosen, S. Kartan, A. Guidotti, E. Costa, *et al.* (2006). „Valproic acid and chromatin remodeling in schizophrenia and bipolar disorder: preliminary results from a clinical population.“ *Schizophr Res* **88**(1-3): 227-31.
- Shen, H. M., A. Nakamura, J. Sugimoto, N. Sakumoto, T. Oda, *et al.* (2006). „Tissue specificity of methylation and expression of human genes coding for neuropeptides and their receptors, and of a human endogenous retrovirus K family.“ *J Hum Genet* **51**(5): 440-50.
- Shih, A., R. Misra and M. G. Rush (1989). „Detection of multiple, novel reverse transcriptase coding sequences in human nucleic acids: relation to primate retroviruses.“ *J Virol* **63**(1): 64-75.
- Shimabukuro, M., Y. Jinno, C. Fuke and Y. Okazaki (2006). „Haloperidol treatment induces tissue- and sex-specific changes in DNA methylation: a control study using rats.“ *Behav Brain Funct* **2**: 37.
- Skaper, S. D., S. E. Moore and F. S. Walsh (2001). „Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues.“ *Progress in neurobiology* **65**(6): 593-608.
- Smit, A. F. A. (1993). „Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-transposons.“ *Nucleic Acids Res* **21**(8): 1863.
- Snead, C. and M. V. Miles (1985). „Treatment of status epilepticus in children with rectal sodium valproate.“ *The Journal of Pediatrics* **106**(2): 323-325.
- Sorm, F., A. Piskala, A. Cihak and J. Vesely (1964). „5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic.“ *Experientia* **20**(4): 202-3.
- Sotgiu, S., C. Serra, G. Marni, M. Pugliatti, G. Rosati, *et al.* (2002). „Multiple sclerosis-associated retrovirus and MS prognosis.“ *Neurology* **59**(7): 1071.
- Sperber, G. O., T. Airola, P. Jern and J. Blomberg (2007). „Automated recognition of retroviral sequences in genomic data—RetroTector®.“ *Nucleic Acids Res* **35**(15): 4964.
- Stauffer, Y., G. Theiler, P. Sperisen, Y. Lebedev and C. V. Jongeneel (2004). „Digital expression profiles of human endogenous retroviral families in normal and cancerous tissues.“ *Cancer Immun* **4**: 2.
- Stengel, S., U. Fiebig, R. Kurth and J. Denner (2010). „Regulation of human endogenous retrovirus-K expression in melanomas by CpG methylation.“ *Genes Chromosomes Cancer*.

- Sugimoto, J. and D. J. Schust (2009). „Human Endogenous Retroviruses and the Placenta.“ Reproductive Sciences.
- Sutkowski, N., G. Chen, G. Calderon and B. T. Huber (2004). „Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP-2A is sufficient for transactivation of the human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen.“ J Virol **78**(14): 7852-60.
- Sutkowski, N., B. Conrad, D. A. Thorley-Lawson and B. T. Huber (2001). „Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen.“ Immunity **15**(4): 579-89.
- Sverdlov, E. e. (2005). Retroviruses and primate genome evolution, Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA.
- Swindle, C. S. and C. A. Klug (2002). „Mechanisms that regulate silencing of gene expression from retroviral vectors.“ Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research **11**(3): 449-456.
- Szpakowski, S., X. Sun, J. M. Lage, A. Dyer, J. Rubinstein, *et al.* (2009). „Loss of epigenetic silencing in tumors preferentially affects primate-specific retroelements.“ Gene **448**(2): 151-67.
- Szyf, M. (2009). „Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs.“ Annual review of pharmacology and toxicology **49**: 243-263.
- Tai, A. K., J. Luka, D. Ablashi and B. T. Huber (2009). „HHV-6A infection induces expression of HERV-K18-encoded superantigen.“ J Clin Virol **46**(1): 47-8.
- Takahashi, Y., T. Kumanishi and S. Hayashi (2004). „Using a DNA microarray method to examine gene expression in brain from clozapine-injected mice.“ Ann N Y Acad Sci **1025**: 561-9.
- Ting, C. N., M. P. Rosenberg, C. M. Snow, L. C. Samuelson and M. H. Meisler (1992). „Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene.“ Genes Dev **6**(8): 1457-65.
- Torrey, E. F., M. Webster, M. Knable, N. Johnston and R. H. Yolken (2000). „The stanley foundation brain collection and neuropathology consortium.“ Schizophr Res **44**(2): 151-5.
- Torrey, E. F. and R. H. Yolken (2001). „The schizophrenia-rheumatoid arthritis connection: infectious, immune, or both?“ Brain, Behavior, and Immunity **15**(4): 401-410.
- Torrey, E. F. and R. H. Yolken (2003). „Toxoplasma gondii and schizophrenia.“ Emerging infectious diseases **9**(11): 1375.
- Tost, H., D. F. Braus, S. Hakimi, M. Ruf, C. Vollmert, *et al.* (2010). „Acute D2 receptor blockade induces rapid, reversible remodeling in human cortical-striatal circuits.“ Nature Neuroscience.
- Tristem, M. (2000). „Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database.“ J Virol **74**(8): 3715-30.
- Turcanova, V. L., B. Bundgaard and P. Hollsberg (2009). „Human herpesvirus-6B induces expression of the human endogenous retrovirus K18-encoded superantigen.“ J Clin Virol **46**(1): 15-9.
- Turner, G., M. Barbulescu, M. Su, M. I. Jensen-Seaman, K. K. Kidd, *et al.* (2001). „Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans.“ Curr Biol **11**(19): 1531-5.
- Van Driel, R., P. F. Fransz and P. J. Verschure (2003). „The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels.“ Journal of Cell Science **116**: 4067-4075.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, *et al.* (2001). „The sequence of the human genome.“ Science **291**(5507): 1304.

- Villa, A., E. Y. Snyder, A. Vescovi and A. Martínez-Serrano (2000). „Establishment and Properties of a Growth Factor-Dependent, Perpetual Neural Stem Cell Line from the Human CNS* 1.“ Experimental neurology **161**(1): 67-84.
- Villesen, P., L. Aagaard, C. Wiuf and F. S. Pedersen (2004). „Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome.“ Retrovirology **1**(1): 32.
- Voisset, C., R. A. Weiss and D. J. Griffiths (2008). „Human RNA“ rumor“ viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease.“ Microbiology and Molecular Biology Reviews **72**(1): 157.
- Wang, Y., P. E. Kowalski, I. Thalmann, D. M. Ornitz, D. L. Mager, *et al.* (1998). „Otoconin-90, the mammalian otoconial matrix protein, contains two domains of homology to secretory phospholipase A2.“ Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15345-50.
- Waterston, R. H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J. F. Abril, *et al.* (2002). „Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome.“ Nature **420**(6915): 520-62.
- Watson, J. D. and F. H. C. Crick (1953). „Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid.“ Nature **171**(4356): 737-738.
- Watt, F. and P. L. Molloy (1988). „Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter.“ Genes Dev **2**(9): 1136-43.
- Weis, S., I. C. Llenos, S. Sabunciyan, J. R. Dulay, L. Isler, *et al.* (2007). „Reduced expression of human endogenous retrovirus (HERV)-W GAG protein in the cingulate gyrus and hippocampus in schizophrenia, bipolar disorder, and depression.“ Journal of Neural Transmission **114**(5): 645-655.
- Widegren, B., C. Kjellman, S. Aminoff, L. G. Sahlford and H. O. Sjogren (1996). „The structure and phylogeny of a new family of human endogenous retroviruses.“ J Gen Virol **77**(Pt 8): 1631-41.
- Wilkinson, D. A., N. L. Goodchild, T. M. Saxton, S. Wood and D. L. Mager (1993). „Evidence for a functional subclass of the RTVL-H family of human endogenous retrovirus-like sequences.“ J Virol **67**(6): 2981-9.
- Worrel, J. A., P. A. Marken, S. E. Beckman and V. L. Ruehler (2000). „Atypical antipsychotic agents: a critical review.“ American Journal of Health-System Pharmacy **57**(3): 238.
- Xiong, Y. and T. H. Eickbush (1988). „Similarity of reverse transcriptase-like sequences of viruses, transposable elements, and mitochondrial introns.“ Mol Biol Evol **5**(6): 675-90.
- Yang, J., H. P. Bogerd, S. Peng, H. Wiegand, R. Truant, *et al.* (1999). „An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein.“ Proc Natl Acad Sci USA **96**(23): 13404-8.
- Yao, Y., J. Schroder, C. Nellaker, C. Bottmer, S. Bachmann, *et al.* (2008). „Elevated levels of human endogenous retrovirus-W transcripts in blood cells from patients with first episode schizophrenia.“ Genes Brain Behav **7**(1): 103-12.
- Yoder, J. A., C. P. Walsh and T. H. Bestor (1997). „Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites.“ Trends in genetics **13**(8): 335-340.
- Yolken, R. (2004). „Viruses and schizophrenia: a focus on herpes simplex virus.“ Herpes **11 Suppl 2**: 83A-88A.
- Yolken, R. H., H. Karlsson, T. A. Bayer, N. Johnston-Wilson, F. Yee, *et al.* (2001). „Retroviruses, genes and schizophrenia.“ Clinical Neuroscience Research **1**(1-2): 164-169.
- Yolken, R. H., H. Karlsson, F. Yee, N. L. Johnston-Wilson and E. F. Torrey (2000). „Endogenous retroviruses and schizophrenia.“ Brain Res Brain Res Rev **31**(2-3): 193-9.

- Yolken, R. H. and E. F. Torrey (1995). „Viruses, schizophrenia, and bipolar disorder.“ Clin Microbiol Rev **8**(1): 131-45.
- Yolken, R. H. and E. F. Torrey (2006). „Infectious agents and gene-environmental interactions in the etiopathogenesis of schizophrenia.“ Clinical Neuroscience Research **6**(1-2): 97-109.
- Yolken, R. H., E. F. Torrey, J. A. Lieberman, S. Yang and F. B. Dickerson (2011). „Serological evidence of exposure to Herpes Simplex Virus type 1 is associated with cognitive deficits in the CATIE schizophrenia sample.“ Schizophr Res.
- Zsiros, J., M. F. Jebbink, P. A. Voute and B. Berkhout (1998). „Identification of novel human endogenous retroviral sequences belonging to the HERV-K family.“ AIDS Res Hum Retroviruses **14**(12): 1093-8.
- zur Hausen, H. (2010). Infectious causing human cancers, Wiley-VCH Verlag, 1. Auflage (27. Oktober 2010) ISBN: 9783527329779, 304-365.

Danksagung

Ich bedanke mich bei...

Christine Leib-Mösch für die tatkräftige Unterstützung und für alles, was Sie mir während meiner Promotion ermöglicht und beigebracht hat.

Angelika Schnieke, die sich sofort bereit erklärt hat, meine Arbeit an der Hochschule zu betreuen.

Jochen Graw und Ruth Brack-Werner für die Unterstützung und hilfreichen Diskussionen.

Wolfgang Seifarth und Jens Mayer die immer hilfsbereit zur Seite standen.

meinen Kollegen, Marisa, Bianca, Markus, Manja, Stephan, Ute, Ingrid, Ingmar und alle anderen Mitarbeiter des Instituts für Virologie in Neuherberg, für die sehr nette Zusammenarbeit und Unterstützung. Ohne sie hätte die Arbeit bei weitem nicht so viel Spaß gemacht! Ich werde euch alle vermissen.

Regina, Hildegard, sowie Karin und Ana für ihre großartige Hilfe im Sekretariat und in der Spülküche.

Oliver, Sonja, Marcus und Armand für die nette Zusammenarbeit.

der „Theodore and Vada Stanley Foundation“, Bethesda, MD, USA und dem Helmholtz Zentrum München für die Finanzierung meiner Arbeit.

Martin und meinen Eltern für den Rückhalt und die liebenswerte Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.