



Michał J. Kowalczyk

**Ocena poziomu ekspresji wybranych ludzkich
endogennych sekwencji retrowirusowych w
twardzinie ograniczonej**

Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze i Klinice Dermatologii
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
pod kierunkiem
prof. dra hab. n. med. Ryszarda Żaby

Poznań, 2012

Pamięci
prof. dra hab. n. med. Janusza Prokopa

Spis treści

1. Wykaz tabel i ilustracji	6
1.1 Wykaz tabel.....	6
1.2 Wykaz ilustracji	10
2. Wykaz skrótów i akronimów	11
3. Wprowadzenie	16
3.1 Morfea – twardzina ograniczona.....	16
3.1.1 Charakterystyka choroby.....	16
3.1.2 Terminologia.....	17
3.1.3 Podział.....	17
3.1.4 Epidemiologia.....	19
3.1.5 Etiologia.....	19
3.1.6 Diagnostyka morfeii	22
3.1.7 Przeciwciała przeciwjądrowe a morfea.....	23
3.2 Ludzkie endogenne retrowirusy.....	24
3.2.1 Elementy ruchome i HERV	24
3.2.2 Nomenklatura i klasyfikacja sekwencji HERV.....	25
3.2.3 Budowa HERV.....	26
3.2.4 Potencjalne mechanizmy działania HERV.....	27
3.2.5 HERV a morfea.....	29
3.3 Wybór badanych sekwencji HERV.....	30
3.3.1 Rodzina HERV-E.....	30
3.3.2 Rodzina HERV-H.....	31
3.3.3 Rodzina HERV-K.....	32
3.3.4 Rodzina HERV-R (ERV-3).....	33
3.3.5 Rodzina HERV-W.....	34
3.4 Real-time PCR.....	36
3.4.1 Wprowadzenie.....	36
3.4.2 Systemy detekcji.....	38
3.4.2.1 SYBR Green I.....	39
3.4.2.2 Rodzina sond TaqMan.....	40
3.4.2.3 sondy HybProbes.....	41
3.4.3 Normalizacja wyników.....	42
4. Cele pracy	44
5. Materiały i metody	45
5.1 Grupy badawcze.....	45
5.2 Uzyskiwanie osocza oraz komórek.....	46
5.3 Pobieranie wycinków skóry.....	46
5.4 Wstępna izolacja RNA	
z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej.....	47
5.5 Wstępna izolacja RNA z wycinków skóry.....	48
5.6 Ocena ilości izolowanego RNA.....	50
5.7 Usuwanie genomowego DNA.....	51
5.8 Odwrotna transkrypcja.....	53
5.9 Real-time PCR.....	55
5.9.1 Termocykler.....	55
5.9.2 Wybór systemu detekcji.....	57
5.9.3 Gen referencyjny.....	58
5.9.4 Startery.....	60

5.9.5	Amplikony.....	61
5.9.6	Optymalizacja reakcji real-time PCR.....	63
5.9.7	Minimalizacja zanieczyszczeń przenoszonych z poprzednich reakcji.....	65
5.9.8	Warunki reakcji real-time PCR.....	67
5.9.8.1	HERV-E pol.....	67
5.9.8.2	HERV-H (env 62).....	68
5.9.8.3	HERV-K env.....	69
5.9.8.4	HERV-K10 gag.....	70
5.9.8.5	HERV-R pol-env.....	71
5.9.8.6	HERV-W env.....	72
5.9.8.7	GAPDH.....	73
5.9.9	Końcowa ocena czystości RNA – reakcje no-RT.....	74
5.9.10	Estymacja ilości transkryptów w badanym materiale.....	74
5.9.11	Krzywe standardowe.....	76
5.9.12	Analiza temperatury topnienia amplitonu.....	80
5.10	Elektroforeza w żelach agarozowych.....	82
5.11	Oznaczanie miana przeciwciał przeciwjądrowych – ANA.....	82
5.12	Ocena nasilenia i rozległości zmian skórnych.....	83
5.13	Ocena aktywność choroby.....	85
5.14	Analiza statystyczna.....	85
6.	Wyniki.....	86
6.1	Izolacja RNA i elektroforeza w żelach agarozowych.....	86
6.1.1	Izolacja RNA.....	86
6.1.2	Elektroforeza w żelach agarozowych.....	87
6.2	Statystyka opisowa.....	88
6.2.1	Wyniki ilościowe real-time PCR.....	88
6.2.1.1	Grupa chorych – PBMC.....	89
6.2.1.2	Grupa zdrowa – PBMC.....	89
6.2.1.3	Grupa chorych – wycinki skóry.....	90
6.2.1.4	Grupa osób zdrowych – wycinki skóry.....	90
6.2.2	LoSSI.....	91
6.2.3	ANA.....	92
6.2.4	Długość trwania choroby.....	93
6.2.5	Aktywność choroby.....	93
6.3	Analiza statystyczna.....	94
6.3.1	Ocena różnic pomiędzy podgrupami.....	94
6.3.1.1	Analiza różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy grupą osób chorych a grupą osób zdrowych w PBMC.....	94
6.3.1.2	Analiza różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy grupą osób chorych a grupą osób zdrowych w wycinkach skóry.....	96
6.3.1.3	Analiza różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy płciami w grupie osób chorych.....	98
6.3.1.4	Analiza różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy płciami w grupie osób zdrowych.....	99

6.3.1.5 Analiza różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy grupami z formą aktywną a nieaktywną choroby.....	100
6.3.2 Analiza korelacji.....	102
6.3.2.1 Analiza korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a mianem ANA.....	102
6.3.2.2 Analiza korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a wskaźnikiem LoSSI.....	103
6.3.2.3 Analiza korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a długością trwania choroby.....	104
6.3.2.4 Analiza korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a wiekiem osób chorych.....	105
6.3.2.5 Analiza korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a wiekiem osób zdrowych.....	106
7. Dyskusja.....	107
7.1 Ocena procedur przygotowania materiału.....	107
7.2 Ocena różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy grupą osób chorych a grupą osób zdrowych.....	108
7.2.1 HERV-E pol.....	108
7.2.2 HERV-H (env 62).....	109
7.2.3 HERV-K env.....	110
7.2.4 HERV-K10 gag.....	111
7.2.5 HERV-R (ERV-3) pol-env.....	112
7.2.6 HERV-W env.....	113
7.3 Ocena różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy płciami.....	115
7.4 Ocena różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy grupami z aktywną a nieaktywną formą choroby.....	116
7.5 Ocena korelacji.....	118
7.5.1 Ocena korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a mianem ANA.....	118
7.5.2 Ocena korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a wskaźnikiem LoSSI.....	119
7.5.3 Ocena korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a długością trwania choroby.....	120
7.5.4 Ocena korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a wiekiem.....	121
7.6 Ocena doboru genu referencyjnego.....	122
7.7 Podsumowanie uzyskanych wyników.....	124
8. Wnioski.....	127
9. Piśmiennictwo.....	128
10. Streszczenie w języku polskim.....	140
11. Streszczenie w języku angielskim.....	143

1. Wykaz tabel i ilustracji

1.1 Wykaz tabel

Lp.	Numer	Opis
1	Tabela 5.1	Startery użyte w badaniu
2	Tabela 5.2	Właściwości amplifikowanych sekwencji
3	Tabela 5.3	Skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencji HERV-E pol
4	Tabela 5.4	Parametry programu termocyklera dla sekwencji HERV-E pol
5	Tabela 5.5	Skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencji HERV-H (env 62)
6	Tabela 5.6	Parametry programu termocyklera dla sekwencji HERV-H (env 62)
7	Tabela 5.7	Skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencji HERV-K env
8	Tabela 5.8	Parametry programu termocyklera dla sekwencji HERV-K env
9	Tabela 5.9	Skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencji HERV-K10 gag
10	Tabela 5.10	Parametry programu termocyklera dla sekwencji HERV-K10 gag
11	Tabela 5.11	Skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencji HERV-R pol-env
12	Tabela 5.12	Parametry programu termocyklera dla sekwencji HERV-R pol-env
13	Tabela 5.13	Skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencji HERV-W env

14	Tabela 5.14	Parametry programu termocyklera dla sekwencji HERV-W env
15	Tabela 5.15	Skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencji GAPDH
16	Tabela 5.16	Parametry programu termocyklera dla sekwencji GAPDH
17	Tabela 6.1	Zestawienie wyizolowanych mas RNA
18	Tabela 6.2	Ilościowe wyniki real-time PCR w grupie osób chorych dla PBMC
19	Tabela 6.3	Ilościowe wyniki real-time PCR w grupie osób zdrowych dla PBMC
20	Tabela 6.4	Ilościowe wyniki real-time PCR w grupie osób chorych dla wycinków skóry
21	Tabela 6.5	Ilościowe wyniki real-time PCR w grupie osób zdrowych dla wycinków skóry
22	Tabela 6.6	Wyniki obliczeń wskaźnika LoSSI w grupie chorych
23	Tabela 6.7	Wyniki oznaczeń poziomu przeciwciał przeciwjądrowych w grupie chorych
24	Tabela 6.8	Analiza długości trwania choroby
25	Tabela 6.9	Ocena różnic pomiędzy grupą osób chorych a grupą osób zdrowych w PBMC
26	Tabela 6.10	Ocena różnic pomiędzy grupą osób chorych a grupą osób zdrowych w wycinkach skóry
27	Tabela 6.11	Analiza różnic pomiędzy płciami w grupie osób chorych w PBMC
28	Tabela 6.12	Analiza różnic pomiędzy płciami w grupie osób chorych w wycinkach skóry
29	Tabela 6.13	Analiza różnic pomiędzy płciami w grupie osób zdrowych w PBMC
30	Tabela 6.14	Analiza różnic pomiędzy płciami w grupie osób zdrowych w wycinkach skóry

31	Tabela 6.15	Analiza różnic pomiędzy grupami z formą aktywną a nieaktywną choroby w PBMC
32	Tabela 6.16	Analiza różnic pomiędzy grupami z formą aktywną a nieaktywną choroby w wycinkach skóry
33	Tabela 6.17	Analiza różnicy w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV-W env pomiędzy grupami z formą aktywną a nieaktywną choroby w PBMC
34	Tabela 6.18	Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a mianem ANA w PBMC
35	Tabela 6.19	Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a mianem ANA w wycinkach skóry
36	Tabela 6.20	Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a wskaźnikiem LoSSI w PBMC
37	Tabela 6.21	Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a wskaźnikiem LoSSI w wycinkach skóry
38	Tabela 6.22	Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a długością trwania choroby w PBMC
39	Tabela 6.23	Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a długością trwania choroby w wycinkach skóry
40	Tabela 6.24	Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a wiekiem osób chorych w PBMC
41	Tabela 6.25	Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a wiekiem osób chorych w wycinkach skóry

- 42 Tabela 6.26 Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a wiekiem osób zdrowych w PBMC
- 43 Tabela 6.27 Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a wiekiem osób zdrowych w wycinkach skóry

1.2 Wykaz ilustracji

Lp.	Numer	Opis
1	Ilustracja 5.1	Termocykler LightCycler 2.0
2	Ilustracja 5.2	Kapilara 20 μ l systemu LightCycler 2.0
3	Ilustracja 5.3	Blok chłodzący wraz z adapterami do wirowania
4	Ilustracja 5.4	Amplifikacja serii rozcieńczeń ampliconu GAPDH
5	Ilustracja 5.5	Krzywa standardowa dla sekwencji GAPDH
6	Ilustracja 5.6	Krzywa standardowa dla sekwencji HERV-E pol
7	Ilustracja 5.7	Krzywa standardowa dla sekwencji HERV-H (env 62)
8	Ilustracja 5.8	Krzywa standardowa dla sekwencji HERV-K env
9	Ilustracja 5.9	Krzywa standardowa dla sekwencji HERV-K10 gag
10	Ilustracja 5.10	Krzywa standardowa dla sekwencji HERV-R pol-env
11	Ilustracja 5.11	Krzywa standardowa dla sekwencji HERV-W env
12	Ilustracja 5.12	Profil analizy topnienia sekwencji GAPDH - wykres zależności wartości fluorescencji od temperatury
13	Ilustracja 5.13	Profil analizy topnienia sekwencji GAPDH - wykres zależności ujemnej pierwszej pochodnej wartości fluorescencji od temperatury
14	Ilustracja 6.1	Rozdział elektroforetyczny użytych sekwencji HERV
15	Ilustracja 6.2	Rozdział elektroforetyczny GAPDH
16	Ilustracja 6.3	Legenda markera pUC19 DNA/MspI
17	Ilustracja 6.4	Ekspresja sekwencji HERV w PBMC
18	Ilustracja 6.5	Ekspresja sekwencji HERV w wycinkach skóry
19	Ilustracja 6.6	Analiza różnicy w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV-W env pomiędzy chorymi z aktywnym a nieaktywnym procesem chorobowym w PBMC

2. Wykaz skrótów i akronimów

6-FAM		6-karboksyfluoresceina, rodzaj fluoroforu
A (nukleotyd)	<i>ang. adenine</i>	adenina
ACA	<i>ang. anti-cardiolipin antibodies</i>	przeciwciała antykardiolipinowe
ACTB	<i>ang. beta-actin</i>	beta-aktyna
ANA	<i>ang. anti-nuclear antibodies</i>	przeciwciała przeciwjądrowe
B2M	<i>ang. β2 microglobulin</i>	beta-2-mikroglobulina
BLAST	<i>ang. Basic Local Alignment Search Tool</i>	algorytm służący ocenie dopasowania sekwencji oligonukleotydowych
C (nukleotyd)	<i>ang. cytosine</i>	cytozyna
cDNA	<i>ang. complementary DNA</i>	komplementarny DNA, uzyskany poprzez odwrotną transkrypcję mRNA
Cp	<i>ang. crossing point</i>	punkt przecięcia
Ct	<i>ang. cycle threshold</i>	próg cyklu
CTGF	<i>ang. connective tissue growth factor</i>	czynnik wzrostu tkanki łącznej
DEPC	<i>ang. diethylpyrocarbonate</i>	dietylopirowęglan
DM	<i>ang. deep morphea</i>	postać głęboka morfeji
DNA	<i>ang. deoxyribonucleic acid</i>	kwasy deoksyrybonukleinowe
DNAza	<i>ang. DNase</i>	enzym degradujący DNA
dUTPaza	<i>ang. dUTPase</i>	enzym hydrolizujący trifosforan deoksyurydyny do monofosforanu deoksyurydyny
E (aminokwas)		kwasy glutaminowe
EDTA	<i>ang. ethylenediamine-tetraacetic acid</i>	kwasy (etylenodinitrylo)tetraoctowe, wersenowe, edetynowe

ELISA	<i>ang. enzyme-linked immunosorbent assay</i>	technika immunoabsorpcji enzymatycznej
<i>env</i>	<i>ang. envelope</i>	retrowirusowy gen kodujący białka otoczki
F (starter)	<i>ang. forward</i>	jeden ze starterów w PCR, nazywany wiodącym, przednim, bądź lewym
FE	<i>łac. fascitis eosinophilica</i>	eozynofilowe zapalenie powięzi
FGF	<i>ang. fibroblast growth factor</i>	czynnik wzrostu fibroblastów
FRET	<i>ang. Förster/fluorescence resonance energy transfer</i>	försterowskie/fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii
G (nukleotyd)	<i>ang. guanine</i>	guanina
G6PD	<i>ang. glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>	dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa
<i>gag</i>	<i>ang. group-specific antigen</i>	retrowirusowy gen kodujący białka strukturalne
GAPDH	<i>ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
GM	<i>ang. generalized morphea</i>	postać klasyczna uogólnionej morfeji
GUSB	<i>ang. beta-glucuronidase</i>	beta-glukuronidaza
H (aminokwas)		histydyna
hCG	<i>ang. human chorionic gonadotropin</i>	ludzka gonadotropina kosmówkowa
HEp-2	<i>ang. human epithelial type 2</i>	linia hodowlanych ludzkich komórek raka krtani
HERV	<i>ang. human endogenous retroviruses</i>	ludzkie endogenne retrowirusy
HIV	<i>ang. human immunodeficiency virus</i>	ludzki wirus niedoboru odporności
HML	<i>ang. human MMTV-like</i>	ludzkie MMTV-podobne

<i>HpaII</i>	<i>łac. Haemophilus parainfluenzae II</i>	enzym restrykcyjny o aktywności 5' C CGG 3'
HPRT	<i>ang. hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>	fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa
K (aminokwas)		lizyna
kDa		kilodalton, kD
LM	<i>ang. linear morphea</i>	postać linijna morfeii
LoSSI	<i>ang. Localized Scleroderma Severity Index</i>	wskaźnik rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w morfeii
LS	<i>ang. localized scleroderma</i>	twardzina ograniczona
LTR	<i>ang. long terminal repeats</i>	długie powtórzenia końcowe
MCDS	<i>fr. morphea en coup de sabre</i>	postać morfeii typu cięcia szablą
MEP	<i>fr. morphea en plaques</i>	odmiana plackowata morfeii
MHC	<i>ang. major histocompatibility complex</i>	główny układ zgodności tkankowej
MMTV	<i>ang. mouse mammary tumor virus</i>	mysi wirus guza sutka
mRNA	<i>ang. messenger RNA</i>	matrycowy RNA
<i>MspI</i>	<i>łac. Moraxella species I</i>	enzym restrykcyjny o aktywności <i>HpaII</i>
MSRV	<i>ang. multiple sclerosis-associated virus</i>	wirus związany ze stwardnieniem rozsianym
no-RT PCR	<i>ang. no reverse transcription/transcriptase PCR</i>	reakcja PCR na matrycy RNA, bez przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji
ORF	<i>ang. open reading frames</i>	otwarte ramki odczytu
PBGD	<i>ang. porphobilinogen deaminase</i>	deaminaza porfobilinogenu
PBMC	<i>ang. peripheral blood mononuclear cells</i>	jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
PBS	<i>ang. phosphate buffered saline</i>	sól fizjologiczna buforowana fosforanami

PCR	<i>ang. polymerase chain reaction</i>	łańcuchowa reakcja polimerazy
PDGF	<i>ang. plateled-derived growth factor</i>	płytkopochodny czynnik wzrostu
PFH	<i>ang. progressive facial hemiatrophy</i>	postępujący zanik połowiczy twarzy
PGK1	<i>ang. phosphoglycerate kinase 1</i>	kinaza fosfoglicerynianowa 1
<i>pol</i>	<i>ang. polymerase</i>	retowirusowy gen kodujący odwrotną transkryptazę
poli(dT)	<i>ang. poly(dT)</i>	fragment DNA, lub oligonukleotyd, charakteryzujący się obecnością wyłącznie tyminy, komplementarny do fragmentów syntetyzowanych w trakcie poliadenylacji
<i>PSORS1</i>	<i>ang. psoriasis susceptibility 1</i>	locus podatności na łuszczycę 1
pUC19	<i>ang. plasmid - University of California 19</i>	rodzaj plazmidowego wektora genetycznego
qPCR	<i>ang. quantitative PCR</i>	ilościowa PCR
R (aminokwas)		arginina
R (starter)	<i>ang. reverse</i>	jeden ze starterów w PCR, nazywany wstecznym, odwrotnym, bądź prawym
RNA	<i>ang. ribonucleic acid</i>	kwas rybonukleinowy
RNAza	<i>ang. RNAase</i>	enzym degradujący RNA
rpm	<i>ang. revolutions per minute</i>	obroty na minutę
r_s		współczynnik korelacji rang Spearmana
RT-PCR	<i>ang. reverse transcriptase PCR</i>	PCR z użyciem odwrotnej transkryptazy
Scl-70	<i>ang. scleroderma - 70 kDa</i>	antygen o masie 70 kDa, związany z twardziną

SNP wymowa: snip	ang. <i>single nucleotide polymorphism,</i>	polimorfizm pojedynczego nukleotydu
T (nukleotydz)	ang. <i>thymine</i>	tymina
Taq	łac. <i>Thermus aquaticus</i>	gatunek bakterii termostabilnych
TBP	ang. <i>TATA-binding protein</i>	białko wiążące się z TATA
TGF-β	ang. <i>transforming growth factor beta</i>	transformujący czynnik wzrostu beta
Th	ang. <i>T-helper</i>	T-pomocniczy
TIMP	ang. <i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>	tkankowe inhibitory metaloproteinaz
tRNA	ang. <i>transfer RNA</i>	transportujący (transferowy) RNA
U (nukleotydz)	ang. <i>uracil</i>	uracyl
UNG	ang. <i>uracil N-glycosylase</i>	uracylo-N-glikozylaza
VEGF	ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>	czynnik wzrostu śródbłonna naczyń
W (aminokwas)		tryptofan
wsp.		współpracownicy

Uwagi:

W niniejszej pracy nazwy genów pisane są kursywą, natomiast odpowiadające im nazwy białek bądź powielanych sekwencji oligonukleotydowych tekstem niepochyłym. Nazwy ludzkich genów, białek i sekwencji oligonukleotydowych pisane są z dużej litery, natomiast pochodzenia retrowirusowego z małej. Nazwy własne produktów komercyjnych nie są ujęte w powyższym wykazie.

3. Wprowadzenie

3.1 Morfea – twardzina ograniczona

3.1.1 Charakterystyka choroby

Morfea, zwana także twardziną ograniczoną (localized scleroderma – LS), jest rzadko występującą chorobą, której głównym objawem jest nadmierne włóknienie skóry, prowadzące do jej stwardnienia. Choroba zaliczana jest do grupy chorób tkanki łącznej. Jej zasięg ograniczony jest w zasadzie tylko do skóry i struktur przylegających, w odróżnieniu od twardziny układowej, która charakteryzuje się zajęciem organów wewnętrznych, obecnością objawu Raynauda i zdecydowanie gorszym rokowaniem [Gupta RA, Fiorentino D 2007]. Etiologia morfeji jest nieznana, chociaż postuluje się jej autoimmunizacyjny charakter [Kreuter A i wsp. 2009]. Pomimo że zarówno morfea jak i twardzina układowa charakteryzują się nadmiernym włóknieniem, w ostatnim czasie sugeruje się, iż wywołane są one innymi mechanizmami molekularnymi [Takehara K, Sato S. 2005][Gupta RA, Fiorentino D 2007].

Chociaż w łagodniejszych, lecz zdecydowanie częstszych postaciach choroby obserwuje się zazwyczaj tylko zaburzenia natury estetycznej, w cięższych odmianach włóknienie skóry może powodować poważniejsze konsekwencje, takie jak na przykład ograniczoną ruchomość stawów, czy też skrócenie długości kończyny [Schanz S i wsp. 2011]. Pomimo generalnie niewielkich obciążeń, pacjenci często skarżą się na pogorszenie jakości życia [Kroft EB i wsp. 2009].

Intensywność badań nad etiopatogenezą morfeji, głównie z powodu dobrego rokowania, nie wydaje się duża. Prowadzone są jednak pewne badania mające na celu wyjaśnienie problematyki włóknienia. [Denton CP, Abraham DJ 2004][Tomimura S i wsp. 2008][Zulian F 2008].

3.1.2 Terminologia

Terminy „morfea” oraz „twardzina ograniczona” stosować można zamiennie. Ze względu na obiektywne różnice pomiędzy morfeą a twardziną układową, sugeruje się stosowanie terminu „morfea” zamiast „twardzina ograniczona” [Christen-Zaech S 2008]. Sugestia ta wynika również ze sposobu, w jaki osoby zainteresowane wyszukują informacji o chorobie w Internecie. „Twardzina”, będąca tutaj słowem kluczowym, kieruje użytkowników na niekoniecznie użyteczne, lecz budzące zdecydowanie większy niepokój, informacje dotyczące twardziny układowej. Ponieważ zastosowanie terminu „morfea” ma mieć z założenia nie tylko charakter *stricte* medyczny, lecz również potoczny, w niniejszej pracy wyraz ten celowo odmieniany jest przez przypadki. Identyczną terminologię spotyka się również w polskim piśmiennictwie [Dańczak-Pazdrowska A 2011].

3.1.3 Podział

Morfea, pomimo niewielkiej chorobowości, nie jest jednostką jednorodną i wyróżnić można kilka istotnych postaci. Obecnie najczęściej stosowany jest podział z 1995 roku autorstwa Petersona i wsp. wraz z poprawkami zaproponowanymi przez Kreutera i wsp. [Peterson LS i wsp. 1995][Kreuter A i wsp. 2009]. Klasyfikacja ta obejmuje następujące podjednostki:

- postać ograniczoną, w skład której wchodzi:
 - odmiana plackowata – MEP (*fr. morphea en plaques*)
 - odmiana drobnogrudkowa
 - odmiana pierwotnie zanikowa

- postać uogólnioną, w skład której wchodzi
 - postać klasyczna uogólnionej morfeji – GM
(*ang. generalized morphea*)
 - *disabling pansclerotic morphea*
 - eozynofilowe zapalenie powięzi – FE (*łac. fascitis eosinophila*)

- postać liniową – LM (*ang. linear morphea*), w skład której wchodzi:
 - postać liniowa kończyn
 - postać typu cięcia szabłą – MCDS
(*fr. morphea en coup de sabre*)
 - postępujący zanik połowiczny twarzy – PFH
(*ang. progressive facial hemiatrophy*)

- postać głęboką – DM (*ang. deep morphea*)

Różnice pomiędzy wspomnianymi schematami klasyfikacyjnymi są niewielkie; np. Peterson i wsp. sugerują wyróżnienie odrębnej postaci pęcherzowej. Różnice te generalnie dotyczą sytuacji wyjątkowych, gdyż zdecydowana większość przypadków morfeji to MEP, GM i LM, w przypadku których wspomniani autorzy są zgodni. Istotną kwestią jest natomiast problem z ewentualnym zaliczeniem do morfeji liszaja twardzinowego [Kim DH i wsp. 2009][Nishioka S 1997]. W niniejszej rozprawie nie prowadzono badań nad chorymi z wykwitami liszaja twardzinowego bez standardowych objawów twardziny ograniczonej.

3.1.4 Epidemiologia

Liczbę nowych zachorowań Peterson i wsp. oszacowali na 2,7 na 100.000 osób na rok. Badanie populacyjne obejmowało 33 lata, w których zanotowano średni wzrost zachorowalności o około 3,6% rocznie. Analiza ta zwierzała ponad tysiąc przypadków, jednakże jej charakter był lokalny i ograniczony tylko do jednego hrabstwa na terenie Stanów Zjednoczonych [Peterson LS i wsp. 1997].

Do zachorowania na morfeę najczęściej dochodzi pomiędzy 20. a 40. rokiem życia, z wyjątkiem postaci LM, która dominuje u dzieci. Postacie powierzchowne choroby dotyczą przed wszystkim osób starszych [Gupta RA, Fiorentino D 2007][Dańczak-Pazdrowska A 2011].

Na morfeę zdecydowanie częściej chorują kobiety, chociaż różnice w ryzyku zachorowania, opisywane przez różnych autorów nigdy nie przekraczają jednego rzędu wielkości, a najczęściej opisywana skala tych różnic znajduje się w przedziale od 2:1 do 3:1 [Christen-Zaech S i wsp. 2008][Toledano C i wsp. 2009].

3.1.5 Etiologia

Twardzina ograniczona zdaje się wywodzić z zawiłych, lecz póki co niewyjaśnionych, zależności pomiędzy czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. Przeważają badania obejmujące twardzinę układową, a próby wyjaśnienia etiologii morfeji nie są szeroko zakrojone [Gupta RA, Fiorentino D 2007].

Wszystkie postaci morfeji charakteryzują się przewlekłym włóknieniem tkanki łącznej. Początkowo obserwuje się obecność gęstego zapalnego nacieku w powierzchniowych naczyniach krwionośnych, złożonego głównie z limfocytów. Cechą szczególną morfeji, odróżniającą ją

od twardziny układowej, jest obecność eozynofili w naciekach [Vierra E, Cunningham B 1999][Dańczak-Pazdrowska A 2011][Kreuter A 2012].

Komórki nacieku zapalnego wydzielają cytokiny, prowadzące do aktywacji komórek mezenchymalnych. Wśród głównych cytokin wymienia się między innymi transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β), czynnik wzrostu tkanki łącznej (CTGF), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), czynnik wzrostu śródbłónka naczyń (VEGF), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF) [Jimenez SA i wsp. 1996][Kreuter A i wsp. 2009].

W późniejszych stadiach choroby liczebność komórek zapalnych spada, dochodzi natomiast do zgrubienia struktur tkanki łącznej, głównie poprzez zmiany w strukturach włókien kolagenowych [Brinckmann J i wsp. 2001].

Większość prób wyjaśnienia mechanizmów molekularnych choroby skupia się na kilku kluczowych zagadnieniach.

Początkowym etapem morfeji jest uszkodzenie komórek śródbłónka i to właśnie one jako pierwsze ulegają apoptozie i wyzwalają kaskadę immunologiczną. Mechanizm prowadzący do uszkodzenia śródbłónka nie jest jasny, ale sugeruje się między innymi autoagresję poprzez przeciwciała na przykład antykardiolipinowe (ACA), zaburzenia w aktywności składowych dopełniacza na komórkach śródbłónka, zmniejszoną produkcję tlenku azotu czy udział wolnych rodników [Helmbold P i wsp. 2004][Nagai M i wsp. 2004][Dańczak-Pazdrowska A 2011].

Odpowiedź immunologiczna w morfeji ma wyraźną charakterystykę Th₂. Interleukina 4, będąca ważną cytokiną w odpowiedzi Th₂ indukuje produkcję kolagenu w fibroblastach, a także może być odpowiedzialna za obecność eozynofili w naciekach zapalnych [Kreuter A i wsp. 2009].

Badania koncentrują się również nad włóknieniem, będącym efektem końcowym wyżej wymienionych procesów. Aktywacja fibroblastów oraz zwiększona produkcja kolagenu wydają się zależeć w

dużej mierze od ekspresji TGF- β oraz jej receptorów [Jimenez SA i wsp. 1996][Man XY i wsp. 2012]. Obserwuje się zarówno podwyższoną produkcję składowych macierzy zewnątrzkomórkowej jak i aberracje w procesach odpowiedzialnych za jej niszczenie, takich jak zmniejszoną aktywność niektórych metaloproteaz macierzy [Asano Y i wsp. 2006] [Tomimura S i wsp. 2008], czy też zwiększoną ekspresję tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP) [Kirk TZ i wsp. 1995][Mattila L i wsp. 1998].

Chociaż wiedza na temat fazy zapalnej w morfeii oraz mechanizmów kierującymi włóknieniem nie jest pełna, to jednak największą zagadką pozostaje kwestia możliwych czynników wzbudzających chorobę. Gama potencjalnych podejrzanych jest bardzo szeroka, a czynniki te często nie wykluczają się wzajemnie. Mogą być to różnego rodzaju rozpuszczalniki organiczne [Peterson LS i wsp. 1997], radioterapia [Colver GB i wsp. 1989][Herrmann T i wsp. 2009], urazy wywołane iniekcją szczepionek, różnego rodzaju leki oraz wiele substancji chemicznych takich jak krzemionka, pestycydy czy nawet alkohol [Bakst R i wsp. 2009][Dańczak-Pazdrowska A 2011]. Wiele z nich może przyczyniać się do zwiększonej i długotrwałej produkcji wolnych rodników tlenowych, prowadząc do przewlekłej deregulacji procesów zapalnych śródbłonna naczyń [Murrell DF 1993].

Przez długi czas uważano, że kluczową rolę mogą odgrywać czynniki infekcyjne, przynajmniej w niektórych postaciach morfeii. Zasugerowano, że krętki *Borrelia burgdorferi* mogą być odpowiedzialne za indukcję choroby [Kreuter A 2012]. Mechanizm działania takiej indukcji pozostaje niejasny, a wstępne wyniki wydają się jednak nie mieć potwierdzenia, chociażby z powodu występowania istotnych różnic w zależności od regionu geograficznego [Wienecke R i wsp. 1995][Colomé-Grimmer MI i wsp. 1997][Kreuter A i wsp. 2009].

3.1.6 Diagnostyka morfeii

Diagnostyka morfeii opiera się głównie na badaniu przedmiotowym, przede wszystkim na obecności charakterystycznych stwardniałych ognisk, otoczonych obwódką o rumieniowo-fioletowym kolorze w fazie aktywnej, przy jednoczesnym braku zmian narządowych i objawu Raynauda. Wspomniana obwódka pojawia się we wczesnej fazie zapalnej, natomiast sklerotyczną fazę późną charakteryzuje zanik gruczołów łojowych i mieszków włosowych [Jabłońska S, Majewski S 2010] [Dańczak-Pazdrowska A 2011].

Dodatkowo zaleca się oznaczenie poziomu przeciwciał przeciwjądrowych oraz, w sytuacjach wymagających potwierdzenia rozpoznania klinicznego, pobranie wycinka skóry chorobowo zmienionej i wykonanie badania histologicznego [Kreuter A i wsp. 2009]. Pomimo że obraz histologiczny zarówno w morfeii jak i w twardzinie układowej jest zbliżony, to jednak w tej drugiej nacieki zapalne są nieco mniej obfite oraz, jak już wspomniano, nie obserwuje się w nich eozynofili [Lever WF, Schaumburg-Lever G 1990][Dańczak-Pazdrowska A 2011].

Z uwagi na narządowo swoisty charakter procesu chorobowego to właśnie badania nad zmienioną skórą mają większą wartość poznawczą. Z drugiej strony problemy związane z pobieraniem wycinków skóry skłaniają do badań nad łatwiejszym do uzyskania materiałem, takim jak krew. Jeżeli wyniki badań krwi lub osocza stanowiłyby obiektywne odzwierciedlenie sytuacji patologicznej w skórze, można by ograniczyć pobieranie wycinków.

3.1.7 Przeciwciała przeciwjądrowe a morfea

Biorąc pod uwagę dobro pacjenta, powinno się w miarę możliwości ograniczać diagnostykę do metod możliwie nieinwazyjnych. Z tego właśnie powodu rozwój diagnostyki opartej na badaniach krwi jest niezwykle istotny. Z ogromnej gamy możliwych do oznaczania czynników to właśnie przeciwciała przeciwjądrowe stanowią kluczowy element diagnostyki autoimmunizacyjnych chorób tkanki łącznej.

Niestety w przypadku morfeii udział przeciwciał w diagnostyce nie jest do końca jasny. Pomimo sugestii, by oznaczać przeciwciała przeciwjądrowe (ANA) w twardzinie ograniczonej [Kreuter A i wsp. 2009], wynik takiego oznaczenia w zasadzie niewiele mówi o rokowaniu [Dańczak-Pazdrowska A 2011].

Dokładniejsze badania, w których oznacza się przeciwciała o konkretnej swoistości rzeczywiście mogą być wartościowe. W morfeii, w odróżnieniu od twardziny układowej, w zasadzie nie wykrywa się przeciwciał anty Scl-70 (przeciwno topoisomerazie I) czy antycentromerowych, wykrywalne są natomiast charakterystyczne dla morfeii przeciwciała skierowane przeciwko topoisomerazie II, nukleosomom/histonom, czy też dysmutazie ponadtlenkowej miedziowo-cynkowej [Hayakawa I i wsp. 2004][Nagai M i wsp. 2004]. Z reguły jednak nie wykonuje się tak swoistych badań, przez co użyteczność oznaczeń przeciwciał jest niewielka.

3.2 Ludzkie endogenne retrowirusy

3.2.1 Elementy ruchome i HERV

Analiza genomu ludzkiego wykazała, że około 45% jego objętości stanowią różnego rodzaju elementy ruchome [Paces J i wsp. 2002]. Dzielą się one zasadniczo na dwie rodziny: retrotranspozony DNA oraz retroelementy. Te ostatnie można z kolei podzielić na sekwencje zawierające, bądź niezawierające tzw. długich powtórzeń końcowych – LTR. Grupa LTR zawiera około 450,000 elementów [IHGSC 2001].

Ludzkie endogenne retrowirusy (Human Endogenous Retroviruses – HERV), są podgrupą elementów LTR. W skład grupy elementów LTR wchodzi również retrotranspozony i solo-LTR. HERV zajmują według różnych źródeł od 1-8% objętości ludzkiego genomu [Zwolińska K 2006]. Dość często pojawiającą się tutaj wielkością jest 8%. Wartość ta jest najprawdopodobniej zawyżona, będąc czasem błędnie kopiowana przez kolejnych badaczy [Wang-Johanning F i wsp. 2003][Portis JL 2002]. Chociaż w niezwykle istotnej z punktu widzenia genomiki człowieka pracy z 2001, opisującej wstępne wyniki sekwencjonowania genomu ludzkiego, rzeczywiście pojawiła się wartość „8%”, dotyczyła ona nie tyle samych sekwencji HERV, co całej grupy retroelementów LTR [McCarthy EM, McDonald JF 2004][IHGSC 2001]. W komputerowej bazie danych HERVd sekwencje HERV stanowią około 1% objętości genomu, lecz z kolei ta wartość jest być może zaniżona, jako że całość sekwencji LTR w tej bazie stanowi niecałe 3% objętości genomu [Paces J i wsp. 2002]. Niezależnie od dokładnej wartości, objętość HERV jest prawdopodobnie większa od objętości wszystkich ludzkich egzonów, stanowiących około 1,2% całkowitej objętości genomu [IHGSC 2004]. Całkowitą liczbę sekwencji HERV szacuje się na około 98.000, co jest wartością ponad czterokrotnie przewyższającą liczbę wszystkich ludzkich genów kodujących białka

[Belshaw R i wsp. 2004].

HERV są pozostałościami po dawnych retrowirusowych infekcjach komórek linii rozrodczych, przekazywanych w kolejnych pokoleniach i wielokrotnie powielanych. Z powodu nagromadzonych mutacji, nie mają potencjału wytwarzania zakaźnych wirionów, jednak zachowały swój oryginalny układ genów [Löwer R i wsp. 1996][Nelson PN i wsp. 2004].

3.2.2 Nomenklatura i klasyfikacja sekwencji HERV

Sekwencje HERV dzielą się na trzy klasy, w zależności od podobieństwa do odpowiadającym im grup retrowirusów egzogennych:

- klasa I, wykazująca homologię do gammaretrowirusów,
- klasa II, wykazująca homologię do betaretrowirusów,
- klasa III, wykazująca homologię do spumaretowirusów.

Zdecydowanie częściej spotykanym schematem taksonomicznym, chociaż nie jedynym, jest podział na rodziny, oznaczanymi literami, odpowiadającymi obowiązującym skrótom dla aminokwasów. Terminologia ta bazuje na sekwencji antykodonów tRNA, odpowiedzialnych za inicjację odwróconej transkrypcji genomu wirusowego. Rodzina HERV-H zawiera sekwencję inicjacji odwrotnej transkrypcji komplementarną do tRNA właściwego histydynie, HERV-R – tRNA swoistego dla argininy, natomiast HERV-K, podobnie jak wirus HIV, – tRNA swoistego dla lizyny [Urnovitz HB, Murphy WH 1996]. Podział ten bazuje jednak tylko na jednej cesze i nie zawsze idealnie oddaje pokrewieństwo HERV. Nomenklatura i taksonomia HERV niestety daleka jest od ideału, warto jednak zauważyć, iż klasę II tworzą wyłącznie przedstawiciele rodziny HERV-K, natomiast wszystkie pozostałe rodziny tworzą klasę I, poza HERV-L, stanowiącą klasę III [Nelson PN i wsp. 2003].

3.2.3 Budowa HERV

Za wyjątkiem rodziny HERV-L, ludzkie endogenne retrowirusy zawierają, w kolejności od 5' do 3', trzy główne geny:

- *gag* (*ang. group-specific antigen*) – kodujący białka strukturalne
- *pol* (*ang. polymerase*) – kodujący odwrotną transkryptazę
- *env* (*ang. envelope*) – kodujący białka otoczki

W większości przypadków wspomniane geny są uszkodzone, niemniej jednak bezsprzecznie wykazują homologię z odpowiednimi sekwencjami egzogennymi. Spotyka się również otwarte ramki odczytu oraz produkty białkowe [Zwolińska K 2006]. Rodzina HERV-L, podobnie jak retrotranspozony, nie posiada genu *env* [Belshaw R i wsp. 2004], jednakże niniejsze badania nie obejmują tej rodziny.

Budowa genomów HERV zasadniczo odpowiada budowie genomów wirusów egzogennych. Trzy wspomniane geny oflankowane są obustronnie przez sekwencje LTR. Sekwencje te w wirusach egzogennych odpowiedzialne są między innymi za wyzwalanie transkrypcji czy też integrację genomu wirusowego z genomem gospodarza. Dzięki charakterystycznym właściwościom promotorowym są w stanie wiązać właściwe im białka komórkowe, regulując ekspresję i zapewniając jej specyficzność zarówno tkankową, jak i pod względem właściwego momentu inicjacji transkrypcji [Urnovitz HB, Murphy WH 1996][Namysł J 2006]. Sekwencje LTR mogą utracić geny ulokowane pomiędzy nimi, stając się solo-LTR, jednocześnie zachowując zdolność transpozycji. Zdecydowana dominacja liczebna solo-LTR i retrotranspozonów nad HERV może sugerować istnienie presji selekcyjnej, usuwającej geny retrowirusowe z genomu, zwłaszcza geny otoczki. Dysproporcja ta może być również spowodowana późniejszą amplifikacją solo-LTR i retrotranspozonów [Zwolińska K 2006].

3.2.4 Potencjalne mechanizmy działania HERV

HERV mogą wpływać na organizm poprzez wiele różnych mechanizmów, lista których z pewnością będzie się wydłużać wraz z wynikami kolejnych badań naukowych. Do najważniejszych znanych obecnie mechanizmów zaliczyć można:

- bezpośrednie działanie białek pochodzących od HERV na komórki (patrz podrozdział 3.3.5),
- modulację układu immunologicznego poprzez podobieństwo białek HERV do antygenów egzogennych (mimikra molekularna) [Namysł J 2006],
- lokalizację HERV wewnątrz innych genów [Adelman MK, Marchalonis JJ 2002],
- wykorzystanie fragmentów sekwencji promotorowych z HERV do zarządzania ekspresją białek gospodarza [Löwer R i wsp. 1996],
- szeroko pojęte interakcje na poziomie mRNA [Zwolińska K 2006].

Sekwencje HERV mogą mieć zarówno negatywny jak i pozytywny wpływ na organizm. Negatywny wpływ wywołują zazwyczaj te sekwencje, które uległy integracji lub translokacji stosunkowo niedawno. Innymi słowy takie, które albo nie zostały jeszcze z genomu usunięte poprzez selekcję naturalną, bądź też takie, których funkcji komórki nie zdążyły jeszcze przejąć i zaadaptować do własnych potrzeb.

Ważnym przykładem negatywnego wpływu HERV na zdrowie człowieka, jest wzbudzenie aktywności transkrypcyjnych endogennych retrowirusów, prowadzące do ekspresji wcześniej nieznanych układowi immunologicznemu białek, skutkującym autoimmunizacją [Namysł J 2006]. Powody takiego wzbudzenia ekspresji mogą być różne, często jednak wymienia się inicjację na skutek infekcji wirusami egzogennymi, takimi jak HSV [Christensen T 2005]. HERV mogą również negatywnie

wpływać na organizm z powodu najczęściej losowych miejsc ich integracji w genomie, co skutkuje deregulacją ekspresji pobliskich genów. Przykładowe mechanizmy z tej grupy to między innymi: stymulacja transkrypcji, dostarczanie nowych miejsc inicjacji transkrypcji, kodonów stop, sygnałów splicingowych czy poliadenylacji [Villesen P i wsp. 2004] [Zwolińska K 2006].

Z drugiej jednak strony, znaleźć można wiele przykładów pozytywnego wpływu HERV. Dotyczy to zwłaszcza sekwencji starszych, utrzymywanych w genomie przez miliony lat. Zdarzają się nawet ewidentne przypadki przejęcia genów pochodzenia retrowirusowego przez genom gospodarza.

W tym miejscu warto wspomnieć o telomerazie – szeroko badanym białku, odpowiedzialnym za wydłużanie telomerów i uniemożliwiającym skracanie się chromosomów. W 2009 roku przyznano Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny za odkrycie, w jaki sposób chromosomy chronione są przez telomery, syntetyzowane przez telomerazy. Białka te zawierają fragment RNA, przy pomocy którego syntetyzują DNA – mają zatem aktywność odwrotnej transkryptazy. Chociaż ewentualna transdukcja retrowirusowa jest tutaj niezwykle trudna do udowodnienia, z uwagi na bardzo odległy czas, w którym mogłoby to nastąpić, telomerazy wykazują pewne cechy strukturalne wirusowych odwrotnych transkryptaz [Gillis AJ i wsp. 2008].

Dotychczas znaleziono liczne przykłady pozytywnego wpływu HERV. Wiele z nich, opisanych w podrozdziale 3.3, dotyczy rozwoju embrionów i łożyska. Ważną funkcją jest również immunomodulacja. W obrębie genów MHC klasy I znajduje się kilkanaście HERV, z kolei obecność klonu sekwencji HERV-K w genie kodującym białko C4A dopełniacza ma właściwości ochronne przed toczniem układowym [Adelman MK, Marchalonis JJ 2002].

3.2.5 HERV a morfea

Większość badań dotyczących problematyki HERV skupiona jest tylko na detekcji ludzkich endogennych retrowirusów różnymi metodami takimi jak western blot, ELISA, hybrydyzacja tkanek ze znakowanymi sondami, czy PCR. Tylko w nielicznych przypadkach autorzy mają możliwość próby rozwikłania zawiłych mechanizmów związanych z HERV. Większość takich prac dotyczy embriologii czy też onkogenezy, chociaż ostatnio zauważyć można poszerzenie tematyki, obejmującej również choroby o podłożu autoimmunizacyjnym, w tym i dermatozy.

Wpływ HERV na choroby o podłożu autoimmunizacyjnym stanowi przedmiot wielu badań naukowych, jednak do tej pory nie przeprowadzono żadnych szerzej zakrojonych badań mogących ocenić potencjalną skalę takich zależności w twardzinie ograniczonej. Istnieją natomiast doniesienia na temat zależności i ich ewentualnych przyczyn pomiędzy HERV a innymi schorzeniami tkanki łącznej, takimi jak łuszczyca, czy twardzina układowa [Grant SF i wsp. 2000][Prokop J, Jagodzinski PP 2004][Namysł J i wsp. 2005][Namysł J 2006]. Poprzez analogię do twardziny układowej można spodziewać się różnego rodzaju zależności pomiędzy aktywnością HERV a przebiegiem morfeii. Idea ta była głównym powodem przeprowadzenia opisywanych tu badań.

Niniejsza praca jest pierwszą próbą oceny aktywności transkrypcyjnej ludzkich endogennych sekwencji retrowirusowych w morfeii. Niemniej z uwagi na ogromny wybór potencjalnych sekwencji, należało ich liczbę zawęzić, kierując się ostrymi kryteriami wyboru, jednocześnie próbując przebadąć możliwe szerokie spektrum rodzin HERV, jak i wszystkie trzy geny przynajmniej raz. Przesłanki, którymi podyktowany był wybór badanych sekwencji, opisano w podrozdziale 3.3, natomiast dokładne dane referencyjne umieszczono w podrozdziale 5.9.4.

3.3 Wybór badanych sekwencji HERV

Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę rodzin HERV, objętych niniejszym badaniem, wraz z aktualnym stanem wiedzy odnośnie ich potencjalnych funkcji. Wybrane sekwencje stanowią obraz najczęściej obecnie badanych grup HERV.

3.3.1 Rodzina HERV-E

Rodzina HERV-E opisana została już w 1984 roku [Steele PE i wsp. 1984], a rok później opublikowano sekwencję klonu HERV-E 4.1 [Repaske R i wsp. 1985]. Klon ten zapisany jest w bazie GenBank jako M10976. Do tej pory zidentyfikowano kilkadziesiąt kopii HERV-E M10976 w ludzkim genomie [Tristem M 2000][Taruscio D i wsp 2002][Yi JM i wsp. 2007].

Przeprowadzono szeroko zakrojone badania nad wspomnianym klonem. Warta wspomnienia jest praca opisująca jego ekspresję w wielu tkankach zdrowych i nowotworowych, m.in. w raku przewodowym sutka, zdrowych jelitowych komórkach neuroendokrynych, czy też w komórkach migdałków podniebiennych [Turbeville MA i wsp. 1996].

HERV-E wydaje się mieć zastanawiający udział w chorobach o podłożu autoimmunologicznym. Stwierdzono podwyższoną produkcję białka env pochodzącego z HERV-E 4.1 w łuszczycy [Bessis D i wsp. 2004]. Z kolei w toczeniu układowym stwierdzono lekko podwyższone poziomy mRNA kodującego białko gag [Ogasawara H i wsp. 2001].

Chociaż w badaniach, będących przedmiotem niniejszej rozprawy, celem był gen *pol*, znajdujący się na chromosomie X, to jednak wysoka homologia z innymi klonami sprawia, że dane prawdopodobnie zostały zebrane z wielu loci jednocześnie. Opisywana sekwencja powiązana jest z przewlekłą białaczką szpikową [Xu RZ, Zheng S. 2002] i charakteryzuje

się homologią na poziomie aż 97% z analogicznym fragmentem oryginalnego klonu M10976 (wyniki analizy porównawczej BLAST).

3.3.2 Rodzina HERV-H

HERV-H jest rodziną endogennych retrowirusów o stosunkowo dużej liczbie powtórzeń i wielkim zróżnicowaniu [Löwer R i wsp. 1996] [Urnovitz HB, Murphy WH 1996]. Odkryto ją w zasadzie przez przypadek podczas próby klonowania locus β -globiny [Mager DL i wsp. 1984]. Większość z prowirusów jest uszkodzona delecjami, przesunięciami ramki odczytu, czy też przedwczesnymi kodonami stop. Z grupy zaledwie 100 przedstawicieli tej rodziny, zawierających gen *env*, znaleziono tylko trzy otwarte ramki odczytu. [Lindeskog M i wsp. 1999][de Parseval N i wsp. 2001]. Najdłuższą z nich jest sekwencja HERV-H (*env* 62).

Jest to jeden z najbardziej prominentnych przedstawicieli rodziny HERV-H, gdyż mamy tutaj do czynienia z genem kodującym wykrywalny produkt białkowy. Chociaż w tkankach można również znaleźć białka wielu innych genów HERV, na przykład wspomnianego już klonu HERV-E 4.1, to jednak liczba możliwych do uzyskania białek w przypadku rodziny HERV-H jest bardzo ograniczona. Wykazano, że białko o masie 62 kDa, kodowane przez wspomnianą sekwencję HERV-H (*env* 62) jest potencjalnie immunosupresyjne *in vivo*. Wspomaga ono ucieczkę komórek nowotworowych przed odrzutem immunologicznym w transgenicznym myszach, chociaż mechanizm jego działania jest nieznan [Mangenev M i wsp. 2001]. W niniejszych badaniach amplifikacji poddano fragment genu otoczki kodującego właśnie wspomniane białko.

3.3.3 Rodzina HERV-K

Rodzina HERV-K jest blisko spokrewniona z egzogennym mysim wirusem guza sutka (MMTV), opisanym już w 1936 roku [Bittner JJ 1936]. Rodzina ta zawiera dziesięć podgrup (HML-1-10). Z tychże grup, HML-2 wydaje się być najmłodsza ze wszystkich rodzin HERV. Jej przedstawiciele często posiadają nietknięte otwarte ramki odczytu, a pochodzące od nich produkty białkowe wykrywane są w wielu tkankach [Subramanian RP i wsp. 2011].

Rodzina HERV-K jest szczególnie interesująca z perspektywy etiopatogenezy autoimmunizacyjnych chorób zapalnych. dUTPaza kodowana w wielu genomach HERV-K ma właściwości stymulacyjne czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i powoduje wydzielanie się prozapalnych cytokin właściwym limfocytom T_H1 i T_H17 . Zwłaszcza klon w obrębie locus *PSORS1*, zdaje się zawierać dUTPazę, której sekwencja, w zależności od wariantu, pozwala na różnicowanie ryzyka zachorowania na łuszczycę [Mayer J i wsp. 2003][Foerster J i wsp. 2005][Ariza ME i wsp. 2011][Lai OY i wsp. 2012].

Niemniej jednak to właśnie ingerencja w mechanizm T_H17 wydaje się być dość istotna ze względu na możliwe powiązanie z rozwojem morfeii. Dowiedziono, że interleukina 17A, produkowana głównie przez limfocyty T_H17 , ma swój udział w patomechanizmie twardziny ograniczonej. Stwierdzono wzrost ekspresji genu *IL-17A* w PBMC, przy jednoczesnym spadku tejże ekspresji w skórze. Badania sugerują, że w morfeii interleukina 17 ma raczej działanie lokalne i ochronne [Dańczak-Pazdrowska A 2011][Dańczak-Pazdrowska A i wsp. 2012].

Najnowsze doniesienia wykazują obecność około 90 prowirusów z grupy HML-2 w genomie ludzkim [Subramanian RP i wsp. 2011]. W niniejszej pracy analizie poddano dwie sekwencje z tej grupy. Pierwsza z nich – HERV-K10 gag, pochodząca z rodziny, opisaną już w 1986 roku i

znajdująca się na chromosomie 5q33.3, została wcześniej szeroko przebadana między innymi w rozwoju raka piersi [Ono M i wsp. 1986], ale także w łuszczycy i twardzinie układowej [Namysł J i wsp. 2005] [Namysł J 2006]. Jest to jedyna sekwencja gag objęta niniejszym badaniem. Druga natomiast – HERV-K env pochodzi z klonu HERV-K115 ulokowanym na chromosomie 8p23.1. Sekwencja ta również była badana u chorych z rakiem piersi [Wang-Johanning F i wsp. 2003][Burmeister T i wsp. 2004], a nawet u osób ze schizofrenią [Otowa T i wsp. 2006]. Obydwie sekwencje pochodzą z prowirusów blisko ze sobą spokrewnionych [Subramanian RP i wsp. 2011].

Pomimo że to właśnie przytoczonych sekwencji użyto do zaprojektowania starterów, to pozwalają one jednak na amplifikację wysoce homologicznych fragmentów pochodzących z wielu innych loci. Sekwencje powielanych fragmentów wyróżniają się wieloma stuprocentowymi wynikami w analizie porównawczej BLAST, a kopie te rozsięte są po całym genomie.

3.3.4 Rodzina HERV-R (ERV-3)

Rodzina HERV-R, znana także pod starszą nazwą ERV-3, jest intensywnie badaną grupą głównie w kontekście rozwoju trofoblastu i łożyska. Sugeruje się jej udział w produkcji hormonów między innymi dzięki inicjacji produkcji podjednostki beta hCG przez białko env [Rote NS i wsp. 2004]. Rodzina ta utrzymuje się w genomach ssaków od bardzo dawna. Sugeruje się możliwą integrację około 30-40 milionów lat temu, co ewidentnie świadczy o silnej presji selekcyjnej, utrzymującej ją w genomie [Kato N i wsp. 1987]. Pomimo niewątpliwie pozytywnej funkcji, HERV-R nie wydaje się być kluczowa w reprodukcji naczelnych, gdyż właśnie ten gen *env* został u goryli utracony [Hervé CA i wsp. 2004].

Rodzina HERV-R w chorobach o podłożu autoimmunologicznym badana jest z mniejszą intensywnością, jednak istnieją pewne doniesienia, dotyczące tego zagadnienia. Przeciwciała anty-ERV-3 zaobserwowano u pacjentów z toczniem układowym i zespołem Sjögrena, a transfer przeciwciał przez łożysko wydaje się korelować z występowaniem zapalenia mięśnia sercowego i zaburzeniami rytmu serca u płodów [Portis JL 2002][Li JM i wsp. 1996]. Chociaż ERV-3 nie wydaje się być związany z reumatoidalnym zapaleniem stawów, to jednak może stanowić marker choroby zwyrodnieniowej stawów [Nelson P i wsp. 2010].

Omawiana w niniejszej pracy sekwencja, ulokowana na chromosomie 7q11.2, jest często badanym przedstawicielem rodziny ERV-3, głównie z powodu obecności długiej otwartej ramki odczytu oraz odpowiadającym jej RNA i białek w łożysku [Kim H i wsp. 2000] [Andersson AC i wsp. 2005][Namysł J 2006].

3.3.5 Rodzina HERV-W

HERV-W jest stosunkowo niedawno odkrytą rodziną ludzkich endogennych retrowirusów. Opisana została w 1999 roku, jako wyskokopijna rodzina, której transkrypcja ograniczona była w zasadzie tylko do łożyska [Blond JL i wsp. 1999]. Kolejne badania wykazały obecność właściwego HERV-W *env* RNA i białka w łożysku. Białko to okazało się wykazywać silne właściwości fuzyjne [Blond JL i wsp. 2000] [Mi S i wsp. 2000]. Bardziej szczegółowa ilościowa analiza PCR potwierdziła występowanie wspomnianego RNA w łożysku, jednocześnie wykrywając niższe poziomy transkrypcji w wielu zdrowych tkankach [de Parseval N i wsp. 2003]. Białko kodowane przez gen *env*, znajdujący się na chromosomie 7q21.2, nazwano "syntycyną" z powodu

potwierzonego udziału w tworzeniu syncytiotrofoblastów [Muir A i wsp. 2004].

Rodzina HERV-W została odkryta dzięki badaniom, których celem było poszukiwanie w genomie sekwencji podobnych do genomu endogennego wirusa MSR, którego aktywność ma wpływ na rozwój stwardnienia rozsianego [Perron H i wsp. 1997][Dolei A i wsp. 2002]. Stwardnienie rozsiane pozostaje zatem głównym polem badawczym w przypadku rodziny HERV-W [Clausen J 2003][Portis JL 2002][Serra C i wsp. 2003]. Z kolei zdolność do wspomaganiania procesu fuzji komórek spowodowała, iż zaczęto badać tę rodzinę w kontekście problematyki nowotworzenia. Potwierdzono udział HERV-W w raku piersi [Bjerregaard B i wsp. 2006], raku trzonu macicy [Strick R I i wsp. 2007], raku jelita grubego [Larsen JM I i wsp. 2009] oraz raku jąder [Gimenez J i wsp. 2010].

HERV-W badano również w chorobach o podłożu autoimmunologicznym, bliższych tematyce niniejszej rozprawy. Potwierdzono obecność transkryptów HERV-W u chorych z łuszczycą [Molès JP i wsp. 2005] oraz z twardziną układową [Namysł J i wsp. 2006]. Stwierdzono RNA pochodzące od HERV-W w mazi stawowej u 22% osób z reumatoidalnym zapaleniem stawów i u jednej osoby z grupy kontrolnej. Należy jednak nadmienić, iż badanie to obejmowało łącznie tylko 19 osób [Gaudin P i wsp. 2000].

W niniejszym badaniu amplifikowano sekwencję fragmentu wspomnianego genu *env*, kodującego syntycynę, chociaż specyficzność użytych starterów pozwoliła na amplifikację fragmentów HERV-W *env* pochodzących z innych loci.

3.4 Real-time PCR

3.4.1 Wprowadzenie

W 1993 roku Kary Mullis otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii za wynalezienie łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. polymerase chain reaction) – PCR. Człowiek ten, o nie do końca kryształowej reputacji, publicznie przyznający się do stosowania narkotyków, dokonał jednego z najważniejszych przełomów w biologii molekularnej [Schoch R 1994].

Od końca lat 80. XX wieku badacze mają możliwość amplifikacji dowolnej sekwencji DNA z teoretycznie pojedynczej kopii do ilości pozwalającej na dalszą, makroskopową analizę. Połączenie dwóch znanych wcześniej elementów, tj. syntetycznych oligonukleotydów DNA (zwanymi starterami) oraz DNA zależnej polimerazy DNA, zrewolucjonizowało nauki biologiczne, medyczne i diagnostykę chorób [Mullis K i wsp. 1986][Mackay IM i wsp. 2002].

W polskim piśmiennictwie wymiennie stosuje się terminologię „primer” (wym. praimer, prajmer) i „starter”. W niniejszej rozprawie, z uwagi na zasady polskiej pisowni, stosuje się ten drugi.

Metoda PCR opiera się na trzech krokach, tworzących jeden cykl [Mullis K i wsp. 1986][Bustin SA 2000]:

- denaturalizacji, w której wysoka temperatura powoduje rozdzielenie się amplifikowanej, dwuniciowej cząsteczki DNA, zwanej matrycą,
- przyłączania starterów, w którym te dwa oligonukleotydy łączą się komplementarnie z jednoniciowymi cząsteczkami matrycy,
- elongacji, w którym DNA zależna polimeraza DNA syntetyzuje wydłużanie się starterów, w konsekwencji generując dwie komplementarne nici potomne, znów tworzące dwuniciowe DNA.

Każdy cykl skutkuje teoretycznie podwojoną liczbą produktów, stąd powtórzenie cykli kilkadziesiąt razy generuje ogromną liczbę kopii oryginalnej matrycy. Reakcja ustaje, gdy wyczerpują się składniki - najczęściej trifosforany deoksyrybonukleozydów. Ilość produktów przestaje przyrastać a reakcja osiąga fazę plateau [Stryer L 2000][Kainz P 2000][Bustin SA 2000].

Główną wadą tradycyjnej PCR jest niemożność ustalenia wejściowej ilości badanego materiału, ponieważ niezależnie od początkowej liczby matryc, reakcja osiąga plateau mniej więcej na tym samym poziomie, a ilość produktu można ocenić dopiero po reakcji (ang. end-point analysis). W przeszłości próbowano szacować ekspresję na podstawie wielkości i intensywności prążków w żelach agarozowych, będących wynikiem elektroforezy po reakcji PCR, jednakże metoda ta była ilościowo niewiarygodna i obecnie w zasadzie nie jest już stosowana [Pfaffl MW 2004].

W reakcjach real-time PCR, poza standardowym wykonaniem amplifikacji, mierzy się również przyrost ilości produktów reakcji metodami fluorescencyjnymi. Ponieważ pomiar dokonywany jest w trakcie trwania reakcji, każdorazowo podczas kolejnych cykli, zastosowanie ma termin „pomiar w czasie rzeczywistym”, w odróżnieniu od pomiaru po zakończeniu reakcji – analizy „end-point”. Wykreślenie krzywej przyrostu produktu pozwala na analizę kinetyki reakcji i określenie początkowej liczby matryc [Bustin SA 2000].

W celu obliczenia początkowej liczby matryc wyznacza się moment (tzw. punkt przecięcia, ang. crossing point – Cp), w którym fluorescencja przekroczy pewien ustalony poziom (tzw. próg cyklu Ct, ang. cycle threshold). Progiem tym najczęściej jest moment wejścia reakcji w logarytmiczną fazę wzrostu [Pfaffl MW 2001].

Połączenie termocyklera i spektrofluorymetru pozwoliło nie tylko na analizę kinetyki reakcji, ale także na ocenę powstałych produktów dzięki

zastosowaniu analizy temperatury topnienia amplikonu.

W piśmiennictwie często stosuje się następujące skróty, odnoszące się do różnych reakcji PCR:

- qPCR – ang. quantitative PCR – ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy. Skrót ten często stosowany jest wymiennie z terminem „real-time PCR”, chociaż może dotyczyć nie tylko metod z pomiarem w czasie rzeczywistym [VanGuilder HD i wsp. 2008].
- real-time PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy z pomiarem w czasie rzeczywistym, często błędnie skracana do RT-PCR. Sugeruje się, by terminu „real-time” nie skracać [VanGuilder HD i wsp. 2008].
- RT-PCR – ang. Reverse Transcriptase PCR - łańcuchowa reakcja polimerazy, w której w początkowej fazie reakcji stosuje się odwrotną transkryptazę w celu uzyskania matryc cDNA z mRNA. Skrót ten jest często mylony z real-time PCR [Bustin SA 2000].

3.4.2 Systemy detekcji

Obecnie stosowanych jest wiele systemów detekcji w reakcjach real-time PCR. Ze względu na zastosowany w niniejszych badaniach termocykler, warte uwagi są trzy z nich. Są to: detekcja niespecyficzna przy użyciu barwnika SYBR Green I, detekcja specyficzna przy użyciu sond hydrolizujących z rodziny TaqMan oraz detekcja specyficzna przy użyciu sond HybProbes.

3.4.2.1 SYBR Green I

Detekcja przy użyciu barwnika SYBR Green I, lub pojętych szerzej barwników fluorescencyjnych specyficznych dla dwuniciowego DNA, jest podstawową i najtańszą techniką stosowaną w real-time PCR. Dodawany do reakcji barwnik SYBR Green I posiada dwie kluczowe właściwości. Po pierwsze, wykazuje wysokie powinowactwo do dwuniciowego DNA, dzięki czemu łączy się z nim w trakcie elongacji, a ilość przyłączonych cząsteczek barwnika jest wprost proporcjonalna do sumy długości wszystkich dwuniciowych ampliconów w reakcji. Po drugie, barwnik ten wykazuje właściwości fluorescencyjne w zasadzie tylko, gdy znajduje się w kompleksie z dwuniciowym DNA, dzięki czemu emitowane światło fluorescencji pochodzi tylko od cząsteczek związanych, a nie od rozproszonych w mieszaninie reakcyjnej. Wraz z nagromadzeniem się produktów reakcji, całkowita fluorescencja reakcji rośnie i jest oznaczana każdorazowo w kolejnych cyklach, najczęściej zaraz po etapie elongacji. Metoda ta pozwala również na przeprowadzenie analizy temperatury topnienia ampliconu [Morrison TB i wsp. 1998][Bustin SA 2000].

Użycie niespecyficznych barwników niestety niesie za sobą istotną niedoskonałość. Sygnał fluorescencyjny będzie pochodził z każdego powielanego w reakcji fragmentu dwuniciowego DNA. W trakcie reakcji mogą pojawić się niespecyficzne produkty, pochodzące na przykład od pseudogenów, lub będące wynikiem niespecyficznego wiązania starterów, czy nawet ich dimeryzacji. Jeżeli w trakcie optymalizacji reakcji nie uda się ustalić wystarczającej specyficzności bez użycia dodatkowych sond, reakcja może skutkować niespecyficznym sygnałem. W konsekwencji prowadzi to do wyników fałszywie dodatnich, które jednak zazwyczaj można wyeliminować przeprowadzając analizę topnienia. Niespecyficzne barwniki nie sprawdzają się również w badaniach polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP), czy też w zwielokrotnionych reakcjach

typu multiplex real-time PCR, co prowadzi do konieczności oznaczania genów badanych i referencyjnych osobno [Ririe KM i wsp. 1997][Bustin SA 2000].

3.4.2.2 Rodzina sond TaqMan

Sondy z rodziny TaqMan są krótkimi oligonukleotydami, wyznakowanymi dwoma barwnikami fluorescencyjnymi. Na końcu 5' sondy znajduje się tzw. reporter, będący standardowym barwnikiem fluorescencyjnym, na przykład pochodną fluoresceiny - 6-FAM. Koniec 3' sondy wyznakowany jest natomiast tzw. wygaszaczem (ang. quencher). Wygaszacz, dopóki znajduje się w bliskiej odległości na tej samej cząsteczce co reporter, skutecznie blokuje emisję światła fluorescencyjnego [Heid CA i wsp. 1996][Bustin SA 2000].

W trakcie etapu przyłączania starterów, również sonda ulega przyłączeniu do jednoniciowej cząsteczki DNA. W trakcie elongacji, aktywność 5'→3' egzonukleazowa polimerazy *Taq*, powoduje odłączenie cząsteczki reportera od wygaszacza, co umożliwia pojawienie się sygnału emisyjnego z cząsteczki reportera. Całkowita fluorescencja jest wprost proporcjonalna do ilości uwolnionych cząsteczek reportera, która to z kolei rośnie wraz z nagromadzeniem się w reakcji sekwencji komplementarnych do sekwencji sondy. Warto zauważyć, iż sonda ze względu na modyfikację końca 3', nie ulega elongacji, nie stanowi zatem niepotrzebnego startera [Holland PM i wsp. 1991][Heid CA i wsp. 1996][Bustin SA 2000].

Nazwa TaqMan jest nawiązaniem do znanej gry komputerowej PacMan, jako że mechanizm aktywności 5'→3' egzonukleazowej polimerazy *Taq* przypomina jedzenie ustawionych po sobie kulek, będącego elementem tej gry [Leutenegger CM 2001].

Niewątpliwą przewagą systemu TaqMan nad niespecyficznymi barwnikami jest możliwość uzyskania bardzo wysokiej specyficzności reakcji oraz uniknięcia niepożądanych sygnałów czy wyników fałszywie dodatnich. System ten pozwala na użycie więcej niż jednej sondy w reakcji, z której każda może być wyznakowana barwnikiem o innym maksimum emisji. Pozwala to na amplifikację więcej niż jednego genu jednocześnie oraz wspólną analizę ilościową każdego z nich [Heid CA i wsp. 1996][Lee LG I wsp. 1999][Bustin SA 2000].

Do wad tego systemu zaliczyć można wyższą cenę w porównaniu z barwnikiem SYBR Green I, trudniejszą optymalizację reakcji, wynikającą z obecności minimum trzech oligonukleotydów w mieszaninie reakcyjnej oraz brak możliwości wykonania analizy temperatury topnienia.

3.4.2.3 sondy HybProbes

Mechanizm działania sond HybProbes opiera się na mechanizmie FRET (ang. Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer), polegającym na przekazywaniu energii z jednego fluoroforu na drugi [Förster T 1948].

W reakcji real-time PCR stosuje się dwie sondy, hybrydujące w bliskiej odległości od siebie. Sonda donorowa, zawiera na swoim końcu 3' barwnik fluorescencyjny, którego emitowane światło jest w stanie wzbudzić fluorescencję drugiego barwnika, znajdującego się końcu 5' sąsiadującej sondy, zwanej sondą akceptorową. Barwnik na sondzie akceptorowej emituje światło o dłuższej fali, niż to emitowane przez sondę donorową. Obecność światła o długości fali odpowiadającej światłu emitowanemu przez sondę akceptorową świadczy o hybrydyzacji obydwu sond do jednoniciowego, amplifikowanego fragmentu DNA [Bustin SA 2000][Mackay IM 2007].

Do zalet tego systemu zaliczyć można najwyższą, spośród wszystkich opisywanych systemów specyficzność, możliwość amplifikacji więcej niż jednego genu jednocześnie oraz możliwość wykonania analizy temperatury topnienia. System ten zatem łączy podstawowe zalety systemu SYBR Green i sond TaqMan [Mackay IM 2007].

Wadą sond HybProbes jest bardzo wysoka cena oraz jeszcze większe, w porównaniu z systemem TaqMan, problemy optymalizacyjne.

3.4.3 Normalizacja wyników

Ilościowe reakcje PCR w czasie rzeczywistym pozwalają na ocenę pierwotnej ilości matryc, ale tylko w przeliczeniu na objętość wejściowej mieszaniny reakcyjnej, tzn. w przeliczeniu na reakcję. Przełożenie takiego wyniku na poziom ekspresji w tkance bądź w komórkach wymaga odpowiedniego punktu odniesienia [Bustin SA 2000]. Stosuje się tutaj dwie grupy metod normalizacyjnych.

Pierwszą z nich jest przeliczanie uzyskanego wyniku na ilość komórek, z których RNA wyizolowano, bądź też na wejściową masę tkanki, użytą do izolacji [Bustin SA 2000]. Niestety, nie zawsze możliwe jest określenie dokładnej wejściowej ilości komórek, a z kolei przeliczanie wyniku na masę niekoniecznie musi odwzorowywać badane procesy.

Drugą metodą, w dużym uproszczeniu, jest podzielenie uzyskanego wyniku przez wartość ekspresji tzw. genu referencyjnego, chociaż istnieje tutaj kilka różnych procedur matematycznych [Pfaffl MW 2001]. Z założenia, aktywność transkrypcyjna takiego genu powinna pozostawać niezmienna w warunkach przeprowadzanego eksperymentu. Pozwala to wyeliminować wpływ różnicy ilości materiału wejściowego pomiędzy próbkami, a także wpływ wszystkich etapów izolacji i przygotowania materiału do analizy, wliczając w to wielokrotne błędy pipetowania

[Bustin SA 2000]. Geny referencyjne należą najczęściej do grupy genów podstawowego metabolizmu komórkowego (ang. housekeeping genes). Dobór genu referencyjnego jest kluczowym problemem, a niewłaściwa decyzja może poważnie wpłynąć na końcowe wnioskowanie. Do najczęściej stosowanych w reakcjach real-time PCR ludzkich genów referencyjnych należą:

- dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego - *GAPDH*
- dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa - *G6PD*
- białko wiążące się z TATA - *TBP*
- beta-2-mikroglobulina - *B2M*
- beta-glukuronidaza - *GUSB*
- deaminaza porfobilinogenu - *PBGD*
- fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa - *HPRT*
- beta-aktyna - *ACTB*
- kinaza fosfoglicerynianowa 1 - *PGK1*

[Eisenberg E i wsp. 2003][Bonnet-Duquennoy M i wsp. 2006][Zainuddin A i wsp. 2008][Chantawibul S i wsp. 2012][Riemer AB i wsp. 2012][Santin AP i wsp. 2012].

4. Cele pracy

Głównym celem pracy było ilościowe określenie aktywności transkrypcyjnej wybranych ludzkich endogennych sekwencji retrowirusowych, tj. HERV-E pol, HERV-H (env 62), HERV-K env, HERV-K10 gag, HERV-R pol-env oraz HERV-W env, w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej a także w skórze chorych na morfeę i porównanie jej z osobami zdrowymi.

Drugim celem była ocena korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną wybranych ludzkich endogennych sekwencji retrowirusowych, tj. HERV-E pol, HERV-H (env 62), HERV-K env, HERV-K10 gag, HERV-R pol-env oraz HERV-W env, w grupie chorych na morfeę a wiekiem badanych, długością trwania choroby, wskaźnikiem LoSSI oraz mianem przeciwciał przeciwjądrowych, a także różnic w tej aktywności pomiędzy płciami oraz pomiędzy grupami z aktywną i nieaktywną formą choroby.

Trzecim celem było opracowanie skutecznego protokołu oczyszczania RNA z wycinków ludzkiej skóry. Osiągnięcie tego celu, niezależnie od jakości pozostałych wyników, pozwoliłoby na przeprowadzanie innych badań na tym niezwykle wymagającym materiale.

5. Materiały i metody

5.1 Grupy badawcze

Do badania jednojądrzastych komórek krwi obwodowej włączono 41 osób ze zdiagnozowaną morfeą. W skład tej grupy weszły 22 kobiety, 19 mężczyzn, w wieku od 9 do 81 lat, ze średnią arytmetyczną wieku 44,1 lat. Odchylenie standardowe w tej grupie wyniosło 17,5 lat.

Grupę kontrolną stanowiło 47 zdrowych ochotników, w tym 35 kobiet oraz 12 mężczyzn, w wieku od 20 do 57 lat, ze średnią arytmetyczną 33,0 lat. Odchylenie standardowe wyniosło 8,6 lat.

Wycinki skóry z okolic chorobowo zmienionych zostały pobrane od 36 pacjentów chorych na morfeę. W grupie tej znalazło się 17 kobiet, 19 mężczyzn, w wieku od 9 do 81 lat, ze średnią arytmetyczną 45,1 lat. Odchylenie standardowe w tej grupie wyniosło 15,9 lat.

Grupę kontrolną stanowiło 13 klinicznie zdrowych fragmentów skóry, pobranych od osób zdrowych oraz przy okazji zabiegów chirurgicznych. Grupę tę stanowiło 5 wycinków, pobranych od osób zdrowych, a także fragmenty pobrane ze zdrowych marginesów, pozyskanych po zabiegach mastektomii (4 wycinki), guza ślinianki (2 wycinki), guza migdałka (1 wycinek) oraz raka kolczystokomórkowego skóry (1 wycinek). W grupie tej znalazły się tkanki pobrane od 6 kobiet, 7 mężczyzn, w wieku od 30 do 85 lat, ze średnią arytmetyczną wieku 52,0 lat. Odchylenie standardowe w tej grupie wyniosło 17,4 lat.

Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwały nr 461/09 z dnia 06.05.2009 oraz nr 22/11 z dnia 13.01.2011). Wszystkie osoby objęte badaniem wyraziły zgodę pisemną.

5.2 Uzyskiwanie osocza oraz komórek

Krew żylną pobierano jałowo w warunkach ambulatoryjnych w ilości 5-9 ml. Probówka-strzykawki (system Monovette, Sarstedt, Niemcy) zawierały EDTA, co zapobiegało krzepnięciu krwi i umożliwiało uzyskanie komórek. Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC) oraz osocze uzyskiwano poprzez wirowanie krwi w gradiencie fikolu o gęstości 1,077 g/cm³ (Histopaque Sigma Diagnostics, USA).

Początkowo świeżą krew mieszano i doprowadzano do temperatury pokojowej na rotatorze przez 15 minut. Następnie delikatnie nakładano ją na fokol, doprowadzony wcześniej do temperatury pokojowej, w 15 ml probówce typu „falkon” i wirowano przez 50 minut przy 800 g w temperaturze 23°C. Osocze przechowywano w temperaturze -30°C do momentu wykonania badań. PBMC zbierano z otrzymanej warstwy pomiędzy fikolem a osoczem, następnie przemywano w 1x stężonym roztworze PBS i wirowano ponownie przez 10 minut przy 450 g w temperaturze pokojowej. Supernatant złożony z PBS, a także resztek fikolu i osocza odrzucano.

5.3 Pobieranie wycinków skóry

Wycinki skóry, za wyjątkiem kilku z grupy kontrolnej, pobierano skalpelem przy znieczuleniu miejscowym. Następnie natychmiast umieszczano je w probówkach, które w całości zamrażano w ciekłym azocie. Do czasu wykonania izolacji RNA, wycinki przechowywano w temperaturze -80°C.

5.4 Wstępna izolacja RNA z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej

Całkowite RNA izolowano przy użyciu zmodyfikowanego protokołu opisanego przez Chomczyńskiego i Sacchi [Chomczyński P i wsp. 1987].

Odwirowane PBMC zalewano 1,0 ml odczynnika TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science, Niemcy), po czym zamrażano w temperaturze -30°C . Jest to czerwony, jednofazowy roztwór fenolu i tiocyjanianu guanidyny. Pozwala on na izolację RNA na zasadzie ekstrakcji fenolem i chloroformem, przy zastosowaniu metody opracowanego przez Chomczyńskiego i Sacchi z późniejszymi udoskonaleniami [Chomczyński P i wsp. 1987][Chomczyński P 1993].

W trakcie rozmrażania do temperatury pokojowej, próby poddawano umiarkowanemu wytrząsaniu przez 5 minut. Następnie dodawano 200 μl chloroformu i worteksowano, po czym wytrząsano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. W celu separacji fazy wodnej od organicznej, próby wirowano przez 12 minut przy 12.000 g w temperaturze 2°C . Do dalszych etapów pobierano 400 μl górnej, przezroczystej fazy wodnej, natomiast resztę odrzucano.

Fazę wodną przemywano w 500 μl izopropanolu, po czym całość zamrażano w temperaturze -80°C przez minimum jeden dzień, celem zwiększenia efektywności izolacji [Namysł J 2006]. Po rozmrożeniu na lodzie próby wirowano przez 12 minut przy 12.000 g w temperaturze 2°C , po czym supernatant odrzucano, a osad zalewano 1 ml 75% roztworu etanolu, rozcieńczonego w wysokiej czystości wodzie (DEPC) pozbawionej RNAz. Po zworteksowaniu, próby wirowano przez 12 minut przy 20.000 g w temperaturze 2°C .

Supernatant odciągano i odrzucano, natomiast osad suszono przez 10 minut w temperaturze 38°C na bloku grzewczym przy otwartych probówkach. Delikatnie podsuszony osad rozpuszczano w 20 μl wysokiej

czystości wodzie (DEPC) przez 15 minut w temperaturze 38°C na bloku grzewczym przy zamkniętych probówkach.

Wszystkie opisane w powyższym podrozdziale procedury, wymagające otwierania probówek, wykonywane były pod wysterylizowanym wyciągiem. Do oczyszczenia i sterylizacji wyciągu używano światła UV, środka dezynfekcyjnego na bazie propanolu Incidin (Ecolab Europe GmbH, Niemcy), środka do usuwania kwasów nukleinowych DNA-ExitusPlus (AppliChem, Niemcy) oraz szmatek do usuwania RNAz - RNaseZap Wipes (Applied Biosystems, USA).

5.5 Wstępna izolacja RNA z wycinków skóry

Wycinki skóry, przechowywane w -80°C, umieszczano bezpośrednio w 1,0 ml schłodzonego do temperatury 4°C odczynnika TriPure Isolation Reagent, umieszczonego w 2,0 ml probówce typu „eppendorf”. Duże wycinki były najpierw cięte skalpelem na mniejsze fragmenty, nie dopuszczając do ich rozmrożenia. Masa poddawanego dalszej obróbce wycinka nie przekraczała 10 mg.

W celu rozbicia wycinków skóry, użyto homogenizatora mechanicznego typu „rotor-stator” PRO200 (PRO Scientific Inc., USA) z generatorem o średnicy 5 mm. Homogenizacja następowała w trzech cyklach, każdy trwający 30 sekund, przy prędkości obrotowej rotora 9.000-11.000 rpm. Cykle te były przedzielane chłodzeniem probówki na lodzie. W celu uniknięcia potencjalnie niezwykle niebezpiecznych rozprysków odczynnikiem TriPure Isolation Reagent, zastosowano specjalnie do tego celu skonstruowaną komorę, w której umieszczano probówkę i końcówkę generatora. Homogenizator w całości umieszczano pod wyciągiem. Zastosowano również odpowiednią odzież ochronną.

Po procesie homogenizacji próby zamrażano w temperaturze -30°C.

Przed podjęciem homogenizacji kolejnej próbki, generator każdorazowo rozbierano, a jego elementy czyszczono płynem Incidin, szmatkami RNaseZap Wipes oraz wysokiej czystości wodą (DEPC). Po homogenizacji serii 24 tkanek, generator był dodatkowo autoklawowany.

W trakcie rozmrażania, próby poddawano lekkiemu wytrząsaniu. Po rozmrożeniu próbki, zawierające zhomogenizowaną tkankę zawieszoną w odczynniku TriPure Isolation Reagent, wirowano przez 12 minut przy 20.000 g w temperaturze 2°C, celem usunięcia pozostałości nierozpuszczonej tkanki. 950 µl górnej warstwy supernatantu przenoszono do nowej próbki zawierającej 200 µl chloroformu, a osad odrzucano.

Kolejne etapy izolacji, do momentu wirowania prób, znajdujących się w roztworze izopropanolu, były identyczne jak w przypadku izolacji RNA z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej, opisanej powyżej. Ze względu na istotną ilość zanieczyszczeń, skutecznie uniemożliwiających uzyskanie dobrej jakości matrycy cDNA z wycinków skóry, konieczne było zastosowanie drugiej ekstrakcji fenolem i chloroformem.

Po pierwszym wirowaniu prób w roztworze izopropanolu, supernatant odrzucano, natomiast osad zalewano 500 µl odczynnika TriPure Isolation Reagent, worteksowano i poddano umiarkowanemu wytrząsaniu w temperaturze pokojowej przez 5 min. Następnie dodawano 100 µl chloroformu, worteksowano, po czym wytrząsano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. W celu separacji fazy wodnej od organicznej, próby wirowano przez 12 minut przy 12.000 g w temperaturze 2°C. Do dalszych etapów pobierano 200 µl górnej, przezroczystej fazy wodnej, natomiast resztę odrzucano.

Kolejne etapy izolacji, aż do rozpuszczenia wstępnie oczyszczonego RNA w 20 µl wysokiej czystości wody (DEPC), były identyczne jak w przypadku procedury izolacji RNA z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej.

5.6 Ocena ilości izolowanego RNA

Wyizolowane RNA oceniano przy użyciu fluorymetru Qubit (Invitrogen, USA) oraz zestawu Quant-iT RNA Broad Range BR Assay Kit, dedykowanego do tego urządzenia. Zestaw ten zawiera barwnik fluorescencyjny, umożliwiający pomiar stężenia, dzięki preferencyjnemu łączeniu się do cząsteczek RNA. Do pomiaru użyto 1 μ l rozpuszczonego RNA, zgodnie z zaleceniami producenta. Ocenie poddano wszystkie próby wyizolowanego RNA, pochodzące zarówno z PBMC jak i z wycinków skóry.

Po pomiarze stężenia, a co za tym idzie i całkowitej ilości izolowanego RNA, usuwano zanieczyszczenia DNA pochodzenia genomowego. W przypadku niniejszych badań zanieczyszczenia takie są wysoce niepożądane, gdyż otwarte ramki odczytu (ORF), będące celem amplifikacji w reakcjach real-time PCR, z racji swego retrowirusowego pochodzenia, nie zawierają intronów. Oznacza to, że poza szczególnymi wyjątkami, sekwencja mRNA jest tutaj dokładnym odpowiednikiem sekwencji genomowej, ponieważ nie dochodzi do wycięcia intronów (tzw. splicingu). Nie da się zatem wyeliminować amplifikacji matrycy pochodzenia genomowego poprzez skrócenie czasu elongacji. Nie jest również możliwe odróżnienie prawidłowych produktów, których matrycą było cDNA, od niepożądanych produktów, powstałych z matrycy genomowego DNA, metodami takim jak: zastosowanie swoistych sond, analiza temperatury topnienia amplikonu, rozdział w żelu agarozowym czy sekwencjonowanie, ponieważ produkty te będą identyczne.

5.7 Usuwanie genomowego DNA

DNA genomowe usuwano zestawem DNA-free (Ambion, USA). Zestaw ten zawiera rekombinowaną formę bydlęcej deoksyrybonukleazy I (DNAza I). DNAza I jest endonukleazą, hydrolizującą wiązania fosfodiesterowe, tworząc oligonukleotydy posiadające grupę 5'-fosforanową i 3'-hydroksylową [Kunitz M 1950]. Enzym ten działa na jedno- i dwuniciowe DNA, chromatynę i hybrydy RNA:DNA, chociaż najwyższą aktywność prezentuje w stosunku do dwuniciowego DNA. Do osiągnięcia maksimum aktywności niezbędna jest obecność kationów Mg^{2+} i Ca^{2+} [Clark P i wsp. 1974][Junowicz E i wsp. 1973][Price PA 1975]. Wybór tego konkretnego zestawu podyktowany został dwoma kryteriami.

Po pierwsze, zestaw ten zawiera rekombinowaną DNAzę I, w odróżnieniu od zestawów innych producentów, w których DNAza I jest pochodzenia zwierzęcego. Stosowanie rekombinowanych enzymów w zasadzie całkowicie eliminuje możliwość wystąpienia zanieczyszczeń RNAzami, które w procesie izolacji RNA są czynnikiem uważanym za najbardziej niepożądany i niebezpieczny, gdyż często doprowadzają do degradacji izolowanego RNA [Blackburn P 1979].

Po drugie, niezwykle istotnym problemem jest sposób dezaktywacji DNAzy I już po usunięciu DNA. Jeżeli enzym ten nie zostanie inaktywowany, będzie niszczył matryce cDNA, tworzone na etapie odwrotnej transkrypcji, co skutecznie uniemożliwi poprawną analizę ekspresji, czy też uzyskanie jakiegokolwiek pozytywnego wyniku w ogóle. Do tej pory stosowano dwie metody inaktywacji DNAzy I. Pierwszą stanowiła ponowna ekstrakcja fenolem i chloroformem. Zaletą tej metody jest niewątpliwie otrzymywanie RNA wyższej czystości, lecz niestety procedura ta posiada wiele wad. Jest czasochłonna, kosztowna, a co najważniejsze wieloetapowa, co skutecznie ogranicza ilość izolowanego RNA. Ocena skuteczności tej metody, przeprowadzona w trakcie

przygotowań do niniejszych badań, wykazała, że całkowita ilość izolowanego RNA spada mniej więcej o połowę po drugiej ekstrakcji. Drugą metodą jest inaktywacja cieplna. Metoda ta jest nieporównanie szybsza i tańsza. Jest również jednoetapowa, co przekłada się bezpośrednio na ilość uzyskanego materiału. Niestety jest to metoda dość niebezpieczna dla izolowanego RNA, gdyż w wysokiej temperaturze ulega ono szybkiej degradacji w obecności jonów metali dwuwartościowych, przede wszystkim Mg^{2+} . W procedurze inaktywacji cieplnej stosuje się zatem związki chelatujące takie jony, przede wszystkim EDTA [Wiame I i wsp. 2000]. Nie daje to jednak całkowitej gwarancji ochrony RNA, a dodanie EDTA może negatywnie wpłynąć na reakcję odwrotnej transkrypcji i PCR, gdyż związek ten chelatuje kationy magnezu, które są niezbędne w tych etapach. Często wymagana jest dodatkowa procedura optymalizacji stężenia kationów magnezu w reakcjach następujących po inaktywacji cieplnej DNAzy I.

Zestaw DNA-free skutecznie eliminuje negatywne aspekty obu tych metod. Po reakcji z DNAzą I, dodaje się specjalny nierozpuszczalny odczynnik, inaktywujący ten enzym w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu, supernatant zawiera oczyszczone RNA, gotowe do reakcji odwrotnej transkrypcji. Jest to najszybszy sposób eliminacji DNAzy I, droższy od metody inaktywacji cieplnej, lecz zdecydowanie tańszy i bardziej wydajny niż stosowanie podwójnej ekstrakcji.

Do reakcji usuwania DNA genomowego, pobierano 1 μg wyizolowanego wcześniej RNA, chyba że nie udało się uzyskać takiej ilości, co miało czasem miejsce, zwłaszcza w przypadku izolacji z wycinków skóry. 1 μg jest ilością optymalną dla zestawu odwrotnej transkrypcji opisanej w dalszym podrozdziale. Do 1 μg RNA dodawano wody do objętości 17 μl , następnie dodawano 2 μl buforu do DNAzowania i 1 μl DNAzy. Reakcję inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut, po czym dodawano 2 μl odczynnika inaktywującego DNAzę, a następnie

inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, lekko wytrząsając. Zawiesinę wirowano przy 10.000 g przez 3 minuty, po czym pobierano 11 μ l supernatantu do reakcji odwrotnej transkrypcji. Pozostałość zachowywano do reakcji no-RT PCR.

5.8 Odwrotna transkrypcja

Do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto zestawu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Niemcy). Zawiera on rekombinowaną, termostabilną odwrotną transkryptazę, dzięki czemu reakcję można prowadzić w wyższej temperaturze, co zmniejsza ryzyko niewłaściwego przepisywania sekwencji bogatych w pary G \equiv C, w obrębie których często występują struktury drugorzędowe. Zastosowana odwrotna transkryptaza posiada również aktywność RNAzy H, dzięki czemu degradacji ulega RNA, obecne w nowopowstałych hybrydach RNA:cDNA, pozostawiając pojedyncze nici cDNA. Obecność hybryd RNA:cDNA mogłaby negatywnie wpływać na reakcję real-time PCR [Roche Applied Science 2003].

Ze względu na bardzo wysokie koszty, reakcji odwrotnej transkrypcji nie przeprowadzano w sposób jednoetapowy, jednocześnie z reakcją real-time PCR (RT-qPCR), ponieważ wymaga to wykonania reakcji ze specyficznym starterem, osobno dla każdej oznaczanej sekwencji. Zdecydowano się zatem na dwuetapową procedurę z użyciem losowych starterów heksamerowych. Zastosowanie takich starterów jest mniej specyficzne niż starterów poli(dT), jednakże bywa konieczne, gdy nie ma się pewności, czy dany transkrypt ulega w komórkach poliadenylacji, co miało miejsce w tym przypadku.

Do 11 μ l roztworu zawierającego oczyszczone RNA dodawano zalecaną w instrukcji ilość starterów heksamerowych, po czym

mieszaninę poddawano wstępnej denaturacji w temperaturze 65°C przez 10 minut. W kolejnym etapie dodawano na lodzie bufor reakcyjny, termostabilną, odwrotną transkryptazę, inhibitor RNAz, a także mieszaninę trifosforanów deoksyrybonukleozydów. Mieszanina ta nie zawierała trifosforanu deoksyurydyny, co było istotne na późniejszym etapie reakcji real-time PCR. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono poprzez inkubację mieszaniny reakcyjnej w temperaturze pokojowej przez 10 minut, a następnie, w temperaturze 55°C przez 30 minut na bloku grzewczym. Reakcję zatrzymywano, poprzez inaktywację odwrotnej transkryptazy w procesie inkubacji w temperaturze 85°C przez 5 minut, a następnie przeniesieniu reakcji na lód. Ponieważ matryc cDNA nie powinno się rozmrażać więcej niż raz, gdyż może to zaniżyć ich ilość w reakcji real-time PCR, mieszaninę rozdzielano na alikwoty i zamrożono w temperaturze -80°C w fabrycznie sterylnych 0,6 ml probówkach typu „eppendorf”.

5.9 Real-time PCR

5.9.1 Termocykler

Do badań wykorzystano termocykler LightCycler 2.0 firmy Roche Applied Science. Jest to model nowej generacji termocyklierów, wykorzystywanych w real-time PCR. Wykorzystuje on strumień powietrza do ogrzewania mieszaniny reakcyjnej, zamiast tradycyjnego metalowego bloku. Gorące powietrze włączane jest do komory, w której znajdują się szklane kapilary z oznaczanym materiałem. Kapilary mają bardzo korzystny stosunek powierzchni do objętości. Użycie takiego rozwiązania pozwala na szybkie uzyskanie docelowej wartości temperatury amplifikowanej próby a także na regulację tempa zmiany temperatury pomiędzy poszczególnymi fazami cyklu.

Kapilary mają objętość 20 μl , przy czym możliwe jest zmniejszenie objętości oznaczanej próby do 10 μl bez straty jakości oznaczenia. W niniejszych badaniach objętość oznaczanych prób wynosiła 10 μl , co pozwoliło na wykonanie większej ilości oznaczeń. Kapilary składają się z trzech elementów:



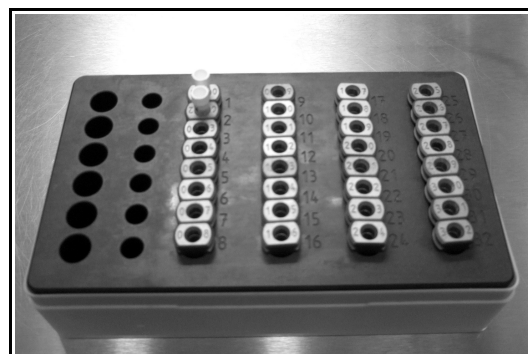
Ilustracja 5.1: Termocykler LightCycler 2.0
Fot. Materiały własne.



Ilustracja 5.2: Kapilara 20 μl systemu
LightCycler 2.0
Fot. Materiały własne.

- kapilary właściwej, wykonanej z bezbarwnego szkła, w której po zwirowaniu znajduje się oznaczana próba,
- plastikowej nasadki, w której użytkownik umieszcza oznaczoną próbę,
- plastikowego stopera, który nabija się specjalnym narzędziem na nasadkę po nałożeniu próby, co zapobiega wyparowaniu próby i zanieczyszczeniu innych kapilar.

W celu złożenia reakcji kapilary umieszcza się w metalowych adapterach do wirowania, a następnie w metalowym schłodzonym bloku. Blok umożliwia umieszczenie 32 kapilar i niezbędnych odczynników blisko siebie oraz utrzymanie ich w niskiej temperaturze na czas składania reakcji.



*Ilustracja 5.3: Blok chłodzący wraz z adapterami do wirowania
Fot. Materiały własne.*

Po złożeniu reakcji i zwirowaniu, kapilary umieszcza się w rotorze, który następnie nakłada się na komorę termocyklera. Pod komorą znajduje się układ optyczny, składający się z układu wzбудzającego, generującego światło o długości fali 470 nm oraz światłowodów, przesyłających sygnał fluorescencyjny z poszczególnych kapilar do sześciu detektorów, absorbujących światło o długości fali 530, 560, 610, 640, 670 i 710 nm. Układ optyczny jest w stanie wzbudzać i absorbować światło każdorazowo tylko z jednej kapilary, dlatego rolą rotora jest umieszczanie poszczególnych kapilar nad układem optycznym przed każdym pomiarem.

5.9.2 Wybór systemu detekcji

Termocykler Light Cycler 2.0 może być stosowany przy użyciu różnych systemów detekcji. Zasadniczą kwestią był wybór najlepszego systemu dla opisywanych badań. Wybór ten oparty był na trzech parametrach: specyficzności, możliwości wykonania analizy topnienia oraz cenie. Rozpatrywano trzy możliwości, opisane w podrozdziale 3.4.2: barwnik SYBR Green I, sondy hydrolizujące TaqMan oraz sondy HybProbe.

Wysoka specyficzność reakcji PCR jest jednym z najważniejszych parametrów, branych pod uwagę przy ich projektowaniu. Specyficzność tę uzyskuje się przede wszystkim prawidłową sekwencją starterów i odpowiednimi warunkami ich przyłączenia, ale można ją dodatkowo zwiększyć stosując sondę lub sondy fluorescencyjne, przyłączające się pomiędzy starterami.

Ponieważ geny pochodzenia retrowirusowego mutują szybciej niż inne, nie mogą podlegać dużej presji selekcyjnej. Wynikiem tych mutacji jest wysoka zmienność osobnicza zarówno pod względem sekwencji poszczególnych kopii jak i ich liczby [Zwolińska K 2006]. Wybór zbyt wysoce specyficznego systemu, opierającego się na sondach hydrolizujących lub HybProbe, mógłby przełożyć się na wyniki fałszywie ujemne w przypadku nieistotnych mutacji punktowych w regionie komplementarnym dla sond. Warto zwrócić uwagę na fakt, że wiedza dotycząca polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (tzw. SNP-ów) w obrębie sekwencji niegenowych genomu ludzkiego jest na dzień dzisiejszy bardzo ograniczona.

Ze względu na możliwą dużą zmienność osobniczą, wynik każdej reakcji należało poddać kontroli jakości. Przy tak wielkiej liczbie reakcji sekwencjonowanie byłoby nieopłacalne, natomiast elektroforeza w żelach agarozowych bardzo czasochłonna. Zdecydowano się zatem na kontrolę

w postaci analiz temperatury topnienia. Tylko dwa systemy detekcji umożliwiają taką analizę: barwnik SYBR Green I oraz sondy HybProbe.

Najtańszym systemem detekcji jest SYBR Green I, natomiast ceny sond hydrolizujących nie wykluczały użycia ich w tym projekcie. Ceny sond HybProbe wykraczały poza możliwości finansowe tego projektu.

Biorąc pod uwagę wszystkie czynniki, w niniejszym projekcie zdecydowano się na użycie barwnika SYBR Green I jako systemu detekcji, mając na uwadze fakt, iż system ten nie pozwala na jednoczesną estymację genu oznaczanego z referencyjnym w jednej kapilarze.

W niniejszych badaniach użyto komercyjnego zestawu LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science, Niemcy). Jest to zestaw dedykowany do użytego termocyklera, zawiera barwnik SYBR Green I, bufor reakcyjny, chlorek magnezu, mieszaninę deoksyrybonukleotydów (w tym trifosforan deoksyurydyny zamiast trifosforanu deoksytymidyny), wodę, a także termostabilną, chemicznie modyfikowaną, rekombinowaną DNA zależną polimerazę DNA typu *Taq*. Polimeraza ta nie wykazuje aktywności przed inkubacją w wysokiej temperaturze, dzięki czemu można ją dodać już przed etapem denaturacji wstępnej, co z kolei zapobiega konieczności otwierania kapilar i dodawania polimerazy w trakcie trwania programu termocyklera.

5.9.3 Gen referencyjny

Wybór metody standaryzacji ekspresji genu oznaczanego jest jednym z najważniejszych w całym procesie projektowania reakcji. Najczęściej poziom ekspresji genu oznaczanego odnosi się do poziomu ekspresji tzw. genu referencyjnego. Jest to gen, którego poziom ekspresji jest możliwie niezmienny w oznaczanej tkance, a także w obliczu

zmiennej niezależnej danego eksperymentu (w tym przypadku obecności lub braku morfei). Wybór niewłaściwego genu może skutkować zawyżonymi, lub zaniżonymi wynikami.

W niniejszej pracy uzyskane wyniki wyrażono w liczbie kopii transkryptu genu oznaczanego w przeliczeniu na milion kopii transkryptu referencyjnego genu dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanowej (*GAPDH*), należącego do grupy genów podstawowego metabolizmu komórkowego (tzw. housekeeping genes) [Eisenberg E i wsp. 2003] [Namysł J 2006].

Jest to jeden z najczęściej stosowanych genów referencyjnych. Charakteryzuje się wysoką i względnie stabilną ekspresją w większości tkanek, niezależną od płci [Barber RD 2005].

W badaniach nad PBMC udowodniono, że poziomy ekspresji kilku sekwencji HERV oraz cytokin w przeliczeniu na milion kopii transkryptu genu *GAPDH* oraz w przeliczeniu na milion komórek korelują ze sobą znacząco w łuszczycy, twardzinie układowej oraz u osób zdrowych [Namysł J 2006]. Badania te potwierdzają zasadność zastosowania metody standaryzacji ekspresji w odniesieniu do poziomu ekspresji genu *GADPH* w chorobach tkanki łącznej w PBMC.

Gen ten opisywany był również w literaturze jako adekwatny w badaniach biopsji skóry [Zainuddin A i wsp. 2008][Bonnet-Duquennoy M i wsp. 2006].

5.9.4 Startery

Startery do reakcji real-time PCR projektowano kierując się kilkoma istotnymi założeniami.

Po pierwsze, optymalna długość amplikonu przy wykorzystaniu tej technologii powinna być o wiele mniejsza niż w tradycyjnych reakcjach PCR. Długość około stu par zasad pozwala na skrócenie czasu reakcji, co z kolei umożliwia eliminację powstawania długich, niespecyficzných amplikonów, zwłaszcza pochodzenia DNA genomowego. Krótki amplikon pozwala także na bardziej efektywne wykorzystanie trifosforanów nukleozydów. Kolejnym powodem stosowania krótkich amplikonów jest fakt, że ewentualne mutacje mają większą szansę wpłynąć na profil topnienia tego amplikonu, innymi słowy poprawia to specyficzność analizy topnienia.

Po drugie, temperatura topnienia starterów powinna być jak najbardziej zbliżona do siebie. Jest to strategia stosowana przy projektowaniu większości reakcji PCR. Pozwala ona na dokładną optymalizację wartości temperatury przyłączania się starterów, ustawioną w programie termocyklera, względem ich temperatur topnienia. Ustawienie zbyt wysokiej wartości będzie skutkowało brakiem przyłączania, zbyt niskiej natomiast przyłączaniem niespecyficznym. Jeśli startery, użyte w tej samej reakcji, będą przyłączać się w różnych temperaturach, użytkownik będzie zmuszony obniżyć wartość temperatury przyłączania w programie termocyklera do poziomu startera o niższej temperaturze przyłączania, co spowoduje zmniejszenie specyficzności przyłączania się drugiego startera.

W trakcie projektowania starterów posłużono się sekwencjami z internetowej bazy danych zawierającej sekwencje HERV – Retrosearch.dk [Villesen P i wsp. 2004], a także z bazy danych GenBank i Ensembl. Dane dotyczące użytych starterów umieszczono w tabeli 5.1.

<i>Nazwa</i>	<i>Sekwencja starterów (5'-3')</i>	<i>Dane referencyjne</i>	<i>Źródło sekwencji starterów</i>
HERV-E pol F HERV-E pol R	GTC ATT TGT ATT CTA CCG GAG AAT ACT GCA AAG TTT GGG AC	Retrosearch: Orf ID: 8435 HERV ID: 1109 Chr. Xq21.32 GenBank: AY208746.1 AL023280.1	Projekt własny
HERV-H (env62) F HERV-H (env62) R	TAT GTC ATC CTC TAC CTC TCC C CCA GCA GTT GTT CAC TAA GGA	Retrosearch: Orf ID: 82113 HERV ID: 10816 Chr. 2Q24.3 GenBank: AJ289709.1	Projekt własny
HERV-K env F HERV-K env R	CAC TTG GGT TAA GAC CAT TGG A GGA GCT GTT GAG TAC ACC TG	Retrosearch: Orf ID: 204173 HERV ID: 29013 Chr. 8p23.1	Projekt własny
HERV-K10 gag F HERV-K10 gag R	GTA ATG GCT CAG TCA ACG CA GCC CCA TTA ATT CTG GAC CT	GenBank: M14123 5q33.3 [Ono M 1986]	[Namysł J. 2006]
HERV-R pol-env F HERV-R pol-env R	GGG CCA ATT ATG CTT ACC AA ATG GGC TGA TCT GGC TCT AA	GenBank: M12140 Chr. 7q11.2	[Namysł J. 2006]
HERV-W env F HERV-W env R	TCA TAT CTA AGC CCC GCA AC GAG GTT GTG ATA CCG CCA AT	GenBank: AF072506.2 7q21.2	[Namysł J. 2006]
GAPDH F GAPDH R	CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG TTC TGG GTG GCA GTG ATG	Ensembl: ENST00000229239 Chr. 12p13.31	[Namysł J. 2006]

Tabela 5.1: Startery użyte w badaniu

5.9.5 Amplikony

Do obliczenia liczby kopii amplitonu dodawanej do każdej reakcji niezbędna jest jego masa cząsteczkowa. Masę cząsteczkową sekwencji DNA można obliczyć na podstawie jej sekwencji. Częstą strategią jest przyjęcie średniej masy cząsteczkowej dowolnej pary zasad równej 660

daltonom i przemnożenie tej wartości przez liczbę par zasad amplikonu [Sambrook J, Russell DW 2006][Stephenson FH 2010]. Jest to podejście obarczone pewnym błędem, jako że wartość ta jest zawyżona, a co więcej takie uśrednianie może wprowadzić błąd, w przypadku gdy stosunek ilości par A=T do G≡C w amplikonie znacząco odbiega od 1:1. Problem ten nie jest jednak tak poważny, jak mogłoby się początkowo wydawać, gdyż końcowy wynik poziomu ekspresji wyrażamy jako stosunek liczby transkryptów genu oznaczanego do liczby transkryptów genu referencyjnego, co wymaga *de facto* matematycznego skrócenia jednostek mas cząsteczkowych, wyrażonych w daltonach. Jeżeli długości amplikonów genu oznaczanego i referencyjnego oraz ich stosunki ilości par A=T do G≡C są zbliżone, to stosunek masy cząsteczkowej genu oznaczanego do masy cząsteczkowej genu referencyjnego będzie bliski 1:1, niezależnie od metody obliczania. Istotnym jest zatem, by stosować tę samą metodę do obliczania obydwu mas.

W tym przypadku masę cząsteczkową obliczono możliwie dokładnie, używając wzoru:

$$\text{Masa amplikonu [Da]} = (\sum \text{par A=U} \times 603,38) + (\sum \text{par G}\equiv\text{C} \times 618,39) - 123,92$$

Wartości mas cząsteczkowych dla poszczególnych nukleotydów zaczerpnięto z programu komputerowego OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator v. 3.26. Powyższy wzór zawiera poprawkę na obecność grup deoksyrybouracylowych zamiast deoksyrybotymidynowych w syntetyzowanych w reakcji PCR fragmentach DNA. Nie zawiera natomiast poprawki na brak tejże modyfikacji w sekwencjach starterów, które syntetyzowane były przy użyciu deoksyrybonukleotydów tymidynowych.

Startery do reakcji PCR, podobnie jak inne oligonukleotydy,

syntetyzuje się w kierunku 3'→5', czyli odwrotnym do naturalnie występującego w przyrodzie. Po zakończeniu syntezy koniec 5' nie posiada grupy fosforanowej, jedynie zaś grupę hydroksylową [Brown DM 1993][Sallamand C i wsp. 2012], stąd też poprawka w wysokości -123,92 Da, odzwierciedlająca zamianę grupy fosforanowej na hydroksylową na obydwu niciach amplikonu. Teoretyczne masy cząsteczkowe amplikonów umieszczono w poniższej tabeli.

<i>Nazwa sekwencji</i>	<i>Długość amplikonu [pz]</i>	<i>Masa amplikonu [Da]</i>
HERV-E pol	101	61552,95
HERV-H (env62)	101	61567,96
HERV-K env	104	63243,01
HERV-K10 gag	103	62594,60
HERV-R pol-env	98	59577,70
HERV-W env	103	62774,72
GAPDH	105	64086,55

Tabela 5.2: Właściwości amplifikowanych sekwencji

5.9.6 Optymalizacja reakcji real-time PCR

Optymalizację reakcji real-time PCR wykonywano na wybranej matrycy cDNA i obejmowała ona zasadniczo trzy parametry.

Pierwszym parametrem była temperatura przyłączania starterów. Ze względu na brak możliwości ustawienia gradientu tego parametru w użytym termocyklerze, wykonywano osobne reakcje dla każdej zadanej temperatury przyłączania starterów. Wartości testowanych wartości dla wszystkich sekwencji znajdowały się w przedziale 54-60°C.

Drugim parametrem było stężenie jonów Mg²⁺. W przypadku polimerazy *Taq*, jony te podaje się z postaci roztworu chlorku magnezu. W użytym zestawie, w przypadku niedodania roztworu chlorku magnezu,

stężenie dwuwartościowych jonów magnezu w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 1 mM. Dodanie 1,6 μ l 25mM roztworu skutkowało końcowym stężeniem 5 mM, przy objętości reakcji wynoszącej 10 μ l.

Kończym parametrem, który podlegał optymalizacji, był czas elongacji. Zgodnie z instrukcją, szybkość syntezy nowej nici dla użytej w zestawie polimerazy *Taq* wynosi 25 par zasad na sekundę. Ponieważ oprogramowanie termocyklera pozwala na zmianę czasu elongacji co jedną sekundę, zmiana tego parametru o minimalny czas stanowi aż ok. 25% całkowitego czasu elongacji w przypadku powielanych amplikonów. Okazało się, że pięciosekundowy czas elongacji jest optymalny dla wszystkich amplifikowanych w tych badaniach sekwencji.

Odpowiednie wartości powyższych parametrów dobierano na podstawie wyniku analizy temperatury topnienia amplikonu oraz elektroforezy amplifikowanych fragmentów. Dokładne wartości parametrów reakcji podane są w podrozdziale 5.9.8.

W przypadku opisywanych reakcji nie zaistniała konieczność optymalizacji innych parametrów takich jak:

- stężenie starterów
- czas denaturacji wstępnej
- czas przyłączania starterów
- temperatura elongacji
- czas i temperatura denaturacji

5.9.7 Minimalizacja zanieczyszczeń przenoszonych z poprzednich reakcji

Zmagania z wynikami fałszywie dodatnimi są jednym z najistotniejszych problemów w laboratoriach PCR. Jednym ze źródeł tego typu zanieczyszczeń są amplikony, pochodzące z poprzednich reakcji PCR tego samego typu. Problem ten uwidacznia się najczęściej w sytuacjach, kiedy w danym laboratorium przeprowadza się wiele reakcji na tych samych starterach, a także gdy reakcje składa się w tym samym pomieszczeniu, w którym znajduje się termocykler i w którym pracuje się na już zsyntetyzowanych produktach reakcji PCR, co potęguje prawdopodobieństwo przeniesienia starego amplikonu do nowej reakcji. W przypadku opisywanych badań warunki te były niestety spełnione.

Enzym uracylo-N-glikozylaza (UNG) hydrolizuje wiązania N-glikozydowe pomiędzy grupą uracylową a deoksyrybozą w DNA, nienaturalnie zawierającym uracyl zamiast tyminy, lub ich mieszaninę [Lindahl T i wsp. 1977]. Aktywność ta bezpowrotnie niszczy informacje zapisane w DNA oraz uniemożliwia amplifikację takiego materiału. Dzięki zastosowaniu tego enzymu, możliwa jest minimalizacja fałszywie dodatnich wyników, pochodzących z wcześniej przeprowadzonych reakcji PCR [Longo MC 1990].

Ponieważ zastosowany zestaw LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I zawiera trifosforan deoksyurydyny zamiast trifosforanu deoksytymidyny, w syntetyzowanym przy jego użyciu amplikonie nie występuje tymina, lecz uracyl (pomijając odcinki starterowe).

Z drugiej strony matryca cDNA, użyta do reakcji real-time PCR, syntetyzowana jest z zastosowaniem tradycyjnej mieszanki trifosforanów nukleozydów, dlatego końcowy produkt nie zawiera grup uracylowych.

Wszystkie reakcje real-time PCR w opisywanych badaniach, do których użyto matryc cDNA, zostały poprzedzone inkubacją z uracylo-N-

glikozylazą w temperaturze 50°C przez 4 minuty. Inkubację tę przeprowadzano w termocyklerze, przed etapem denaturacji wstępnej, która dla opisywanego enzymu stanowiła etap inaktywacji. Do każdej próby na etapie składania reakcji real-time PCR dodawano 0,1 jednostki uracylo-N-glikozylazy, izolowanej z komórek bakterii *Escherichia coli* (Fermentas, USA).

5.9.8 Warunki reakcji real-time PCR

W poniższych podrozdziałach przedstawiono dokładne warunki reakcji real-time PCR, zarówno pod względem składu mieszaniny reakcyjnej jak i programu termocyklera.

5.9.8.1 HERV-E pol

<i>Komponent</i>	<i>Dodana ilość</i>	<i>Stężenie końcowe</i>
H ₂ O	4,4 µl	nd.
MgCl ₂	1,5 µl	4,75 mM
Fast-Start Reaction Mix	1,0 µl	nd.
Starter F	1,0 µl	0,5 µM
Starter R	1,0 µl	0,5 µM
uracyno-N-glikozylaza	0,1 µl	0,1 jedn./10 µl
Matryca cDNA	1,0 µl	nd.
Suma:	10,0 µl	

Tabela 5.3: Skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencji HERV-E pol

<i>Etap główny</i>	<i>Liczba cykli</i>	<i>Segment</i>	<i>Temperatura docelowa</i>	<i>Czas</i>	<i>Pomiar fluorescencji</i>
Inkubacja UNG	1	-	50°C	4 min.	brak
Denaturacja wstępna	1	-	95°C	10 min.	brak
Amplifikacja	45	Denaturacja	95°C	10 s	brak
		Przyłączenie starterów	57°C	8 s	brak
		Elongacja	72°C	5 s	pojedynczy
Analiza topnienia	1	Denaturacja	95°C	0 s	brak
		Przyłączenie amplikonów	72°C	15 s	brak
		Topnienie	95°C (0,1°C/s)	0 s	ciągły
Chłodzenie	1	-	50°C	30 s	brak

Tabela 5.4: Parametry programu termocyklera dla sekwencji HERV-E pol

5.9.8.2 HERV-H (env 62)

<i>Komponent</i>	<i>Dodana ilość</i>	<i>Stężenie końcowe</i>
H ₂ O	5,1 µl	nd.
MgCl ₂	0,8 µl	3,00 mM
Fast-Start Reaction Mix	1,0 µl	nd.
Starter F	1,0 µl	0,5 µM
Starter R	1,0 µl	0,5 µM
uracylo-N-glikozylaza	0,1 µl	0,1 jedn./10 µl
Matryca cDNA	1,0 µl	nd.
Suma:	10,0 µl	

Tabela 5.5: Skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencji HERV-H (env 62)

<i>Etap główny</i>	<i>Liczba cykli</i>	<i>Segment</i>	<i>Temperatura docelowa</i>	<i>Czas</i>	<i>Pomiar fluorescencji</i>
Inkubacja UNG	1	-	50°C	4 min.	brak
Denaturacja wstępna	1	-	95°C	10 min.	brak
Amplifikacja	45	Denaturacja	95°C	10 s	brak
		Przyłączanie starterów	54°C	8 s	brak
		Elongacja	72°C	5 s	pojedynczy
Analiza topnienia	1	Denaturacja	95°C	0 s	brak
		Przyłączanie amplikonów	72°C	15 s	brak
		Topnienie	95°C (0,1°C/s)	0 s	ciągły
Chłodzenie	1	-	50°C	30 s	brak

Tabela 5.6: Parametry programu termocyklera dla sekwencji HERV-H (env 62)

5.9.8.3 HERV-K env

<i>Komponent</i>	<i>Dodana ilość</i>	<i>Stężenie końcowe</i>
H ₂ O	5,5 µl	nd.
MgCl ₂	0,4 µl	2,00 mM
Fast-Start Reaction Mix	1,0 µl	nd.
Starter F	1,0 µl	0,5 µM
Starter R	1,0 µl	0,5 µM
uracylo-N-glikozylaza	0,1 µl	0,1 jedn./10 µl
Matryca cDNA	1,0 µl	nd.
Suma:	10,0 µl	

Tabela 5.7: Skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencji HERV-K env

<i>Etap główny</i>	<i>Liczba cykli</i>	<i>Segment</i>	<i>Temperatura docelowa</i>	<i>Czas</i>	<i>Pomiar fluorescencji</i>
Inkubacja UNG	1	-	50°C	4 min.	brak
Denaturacja wstępna	1	-	95°C	10 min.	brak
Amplifikacja	45	Denaturacja	95°C	10 s	brak
		Przyłączenie starterów	59°C	8 s	brak
		Elongacja	72°C	5 s	pojedynczy
Analiza topnienia	1	Denaturacja	95°C	0 s	brak
		Przyłączenie amplikonów	72°C	15 s	brak
		Topnienie	95°C (0,1°C/s)	0 s	ciągły
Chłodzenie	1	-	50°C	30 s	brak

Tabela 5.8: Parametry programu termocyklera dla sekwencji HERV-K env

5.9.8.4 HERV-K10 gag

<i>Komponent</i>	<i>Dodana ilość</i>	<i>Stężenie końcowe</i>
H ₂ O	5,1 µl	nd.
MgCl ₂	0,8 µl	3,00 mM
Fast-Start Reaction Mix	1,0 µl	nd.
Starter F	1,0 µl	0,5 µM
Starter R	1,0 µl	0,5 µM
uracylo-N-glikozylaza	0,1 µl	0,1 jedn./10 µl
Matryca cDNA	1,0 µl	nd.
Suma:	10,0 µl	

Tabela 5.9: Skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencji HERV-K10 gag

<i>Etap główny</i>	<i>Liczba cykli</i>	<i>Segment</i>	<i>Temperatura docelowa</i>	<i>Czas</i>	<i>Pomiar fluorescencji</i>
Inkubacja UNG	1	-	50°C	4 min.	brak
Denaturacja wstępna	1	-	95°C	10 min.	brak
Amplifikacja	45	Denaturacja	95°C	10 s	brak
		Przyłączenie starterów	59°C	8 s	brak
		Elongacja	72°C	5 s	pojedynczy
Analiza topnienia	1	Denaturacja	95°C	0 s	brak
		Przyłączenie amplikonów	72°C	15 s	brak
		Topnienie	95°C (0,1°C/s)	0 s	ciągły
Chłodzenie	1	-	50°C	30 s	brak

Tabela 5.10: Parametry programu termocyklera dla sekwencji HERV-K10 gag

5.9.8.5 HERV-R pol-env

<i>Komponent</i>	<i>Dodana ilość</i>	<i>Stężenie końcowe</i>
H ₂ O	5,1 µl	nd.
MgCl ₂	0,8 µl	3,00 mM
Fast-Start Reaction Mix	1,0 µl	nd.
Starter F	1,0 µl	0,5 µM
Starter R	1,0 µl	0,5 µM
uracylo-N-glikozylaza	0,1 µl	0,1 jedn./10 µl
Matryca cDNA	1,0 µl	nd.
Suma:	10,0 µl	

Tabela 5.11: Skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencji HERV-R pol-env

<i>Etap główny</i>	<i>Liczba cykli</i>	<i>Segment</i>	<i>Temperatura docelowa</i>	<i>Czas</i>	<i>Pomiar fluorescencji</i>
Inkubacja UNG	1	-	50°C	4 min.	brak
Denaturacja wstępna	1	-	95°C	10 min.	brak
Amplifikacja	45	Denaturacja	95°C	10 s	brak
		Przyłączenie starterów	54°C	8 s	brak
		Elongacja	72°C	5 s	pojedynczy
Analiza topnienia	1	Denaturacja	95°C	0 s	brak
		Przyłączenie amplikonów	72°C	15 s	brak
		Topnienie	95°C (0,1°C/s)	0 s	ciągły
Chłodzenie	1	-	50°C	30 s	brak

Tabela 5.12: Parametry programu termocyklera dla sekwencji HERV-R pol-env

5.9.8.6 HERV-W env

<i>Komponent</i>	<i>Dodana ilość</i>	<i>Stężenie końcowe</i>
H ₂ O	4,4 µl	nd.
MgCl ₂	1,5 µl	4,75 mM
Fast-Start Reaction Mix	1,0 µl	nd.
Starter F	1,0 µl	0,5 µM
Starter R	1,0 µl	0,5 µM
uracylo-N-glikozylaza	0,1 µl	0,1 jedn./10 µl
Matryca cDNA	1,0 µl	nd.
Suma:	10,0 µl	

Tabela 5.13: Skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencji HERV-W env

<i>Etap główny</i>	<i>Liczba cykli</i>	<i>Segment</i>	<i>Temperatura docelowa</i>	<i>Czas</i>	<i>Pomiar fluorescencji</i>
Inkubacja UNG	1	-	50°C	4 min.	brak
Denaturacja wstępna	1	-	95°C	10 min.	brak
Amplifikacja	45	Denaturacja	95°C	10 s	brak
		Przyłączenie starterów	54°C	8 s	brak
		Elongacja	72°C	5 s	pojedynczy
Analiza topnienia	1	Denaturacja	95°C	0 s	brak
		Przyłączenie amplikonów	72°C	15 s	brak
		Topnienie	95°C (0,1°C/s)	0 s	ciągły
Chłodzenie	1	-	50°C	30 s	brak

Tabela 5.14: Parametry programu termocyklera dla sekwencji HERV-W env

5.9.8.7 GAPDH

<i>Komponent</i>	<i>Dodana ilość</i>	<i>Stężenie końcowe</i>
H ₂ O	4,4 µl	nd.
MgCl ₂	1,5 µl	4,75 mM
Fast-Start Reaction Mix	1,0 µl	nd.
Starter F	1,0 µl	0,5 µM
Starter R	1,0 µl	0,5 µM
uracylo-N-glikozylaza	0,1 µl	0,1 jedn./10 µl
Matryca cDNA	1,0 µl	nd.
Suma:	10,0 µl	

Tabela 5.15: Skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencji GAPDH

<i>Etap główny</i>	<i>Liczba cykli</i>	<i>Segment</i>	<i>Temperatura docelowa</i>	<i>Czas</i>	<i>Pomiar fluorescencji</i>
Inkubacja UNG	1	-	50°C	4 min.	brak
Denaturacja wstępna	1	-	95°C	10 min.	brak
Amplifikacja	45	Denaturacja	95°C	10 s	brak
		Przyłączanie starterów	59°C	8 s	brak
		Elongacja	72°C	5 s	pojedynczy
Analiza topnienia	1	Denaturacja	95°C	0 s	brak
		Przyłączanie amplikonów	72°C	15 s	brak
		Topnienie	95°C (0,1°C/s)	0 s	ciągły
Chłodzenie	1	-	50°C	30 s	brak

Tabela 5.16: Parametry programu termocyklera dla sekwencji GAPDH

Jak już wspomniano, nie dodawano uracylo-N-glikozylazy do reakcji namnażania matryc, mających służyć do wykreślenia krzywych standardowych i jako standardy. W tym przypadku brakującą objętość zastąpiono wodą, natomiast program termocyklera pozostał niezmienny.

5.9.9 Końcowa ocena czystości RNA – reakcje no-RT

Czystość izolowanego RNA, a co za tym idzie również syntetyzowanych w reakcji odwrotnej transkrypcji matryc cDNA, oceniano poddając RNA reakcji no-RT PCR (ang. no reverse transcription/transcriptase). Polegała ona na użyciu 1 µl oczyszczonego RNA do reakcji real-time PCR ze starterami i warunkami reakcji, stosowanymi do analizy genu *GAPDH*. Ocenie poddano wszystkie oczyszczone próby RNA.

Czyste RNA nie powinno zawierać pozostałości genomowego DNA, dlatego wynikiem oczekiwanym był brak amplifikacji. W przypadku zaistnienia amplifikacji, jej punkt C_p przyrównywano do krzywej standardowej dla genu *GAPDH*, a także porównywano profil analizy temperatury topnienia amplikonu. Próbę uznawano za czystą, jeśli otrzymany wynik był mniejszy niż 1 kopia na reakcję lub otrzymany profil analizy temperatury topnienia amplikonu znacząco odbiegał od standardowo otrzymywanego. W innych przypadkach RNA poddawano doczyszczaniu.

5.9.10 Estymacja ilości transkryptów w badanym materiale

W niniejszym badaniu poziom ekspresji wyrażano jako bezwzględną wartość ilości transkryptów genu oznaczanego, podzieloną przez ilość transkryptów genu referencyjnego. W celu wykonania takiego oznaczenia, niezbędne są krzywe standardowe, osobne dla każdego oznaczanego genu oraz dla genu referencyjnego. Wykonano je przy użyciu matryc, będących dziesięciokrotnymi rozcieńczeniami roztworów, zawierających znaną liczbę kopii amplikonu.

Celem uzyskania takiego roztworu, dany amplikon namnażano w

reakcji real-time PCR, a następnie mieszaninę reakcyjną oczyszczano przy użyciu komercyjnego zestawu innuPREP PCRpure Kit (Analytik Jena, Niemcy), zgodnie z zaleceniami producenta. Zestaw ten pozwala oczyścić mieszaninę reakcyjną z resztek starterów, barwników fluorescencyjnych, soli i trifosforanów nukleozydów, pozostawiając wysokiej czystości amplikony.

Następnie wykonywano oznaczenie stężenia DNA w roztworze przy użyciu wspomnianego wyżej fluorymetru Qubit (Invitrogen, USA) oraz zestawu Quant-iT dsDNA Broad Range BR Assay Kit, dedykowanego do tego urządzenia. Zestaw ten zawiera barwnik fluorescencyjny, umożliwiający pomiar stężenia, dzięki preferencyjnemu łączeniu się do cząsteczek DNA. Do pomiaru użyto 1 μ l oczyszczonego roztworu amplikonu, zgodnie z zaleceniami producenta.

Znając stężenie DNA w roztworze oraz masę cząsteczkową amplikonu, obliczano bezwzględną liczbę kopii amplikonu w 1 μ l oczyszczonego roztworu, przy użyciu wzoru zawierającego stałą Avogadra:

$$L.T.[l.c./\mu l] = \frac{\text{Stężenie DNA}[g/\mu l] * 6,0221367 \times 10^{23}[l.c./mol]}{\text{masa cząsteczkowa}[g/mol]}$$

gdzie:

L.T. - całkowita liczba transkryptów

l.c. - liczba cząsteczek

Następnie z oczyszczonych roztworów amplikonu przygotowywano serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń, poprzez dodanie do 10 μ l mniejszego rozcieńczenia 90 μ l wody. Rozcieńczenie zawierające rząd wielkości liczby kopii amplikonu, odzwierciedlający spodziewaną ilość liczby kopii transkryptów w oznaczanych później próbach, dodatkowo

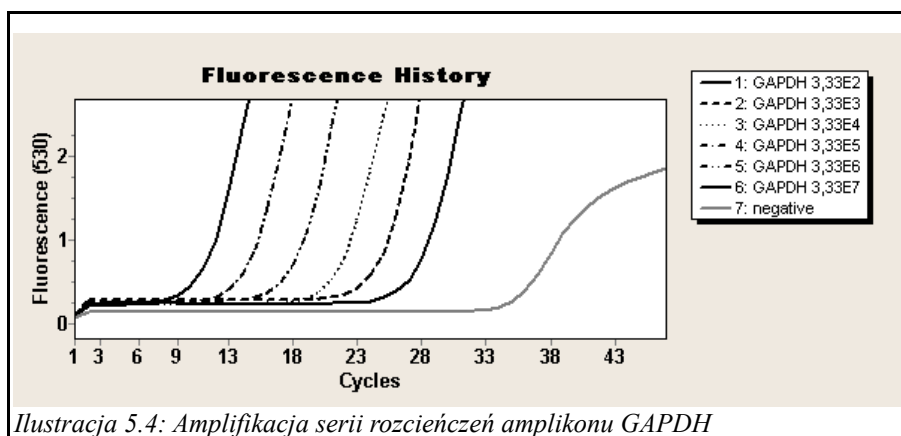
rozpipetowywano w równych objętościach po kilkanaście sztuk, celem późniejszego ich użycia w roli standardów.

Serie rozcieńczeń oraz standardy zamrażano, co w założeniu odpowiadać miało jednokrotnemu zamrożeniu matryc cDNA przed ich użyciem. Po rozmrożeniu przeprowadzano reakcję real-time PCR, używając serii rozcieńczeń jako matryc, z warunkami reakcji identycznymi jak w przypadku namnażania prób z cDNA, z wyjątkiem obecności uracylo-N-glikozylazy w mieszaninie reakcyjnej, która zniszczyłaby matrycę pochodzącą z wcześniejszej reakcji PCR.

Oprogramowanie wyznaczało krzywą standardową, przyrównując punkty przecięcia C_p do wprowadzonych wartości ilości kopii amplikonu na reakcję. Ze względu na dużą rozpiętość skali, wartości ilości kopii amplikonu są zwyczajowo logarytmowane. Uzyskane krzywe standardowe zamieszone zostały w podrozdziale 6.1.3.

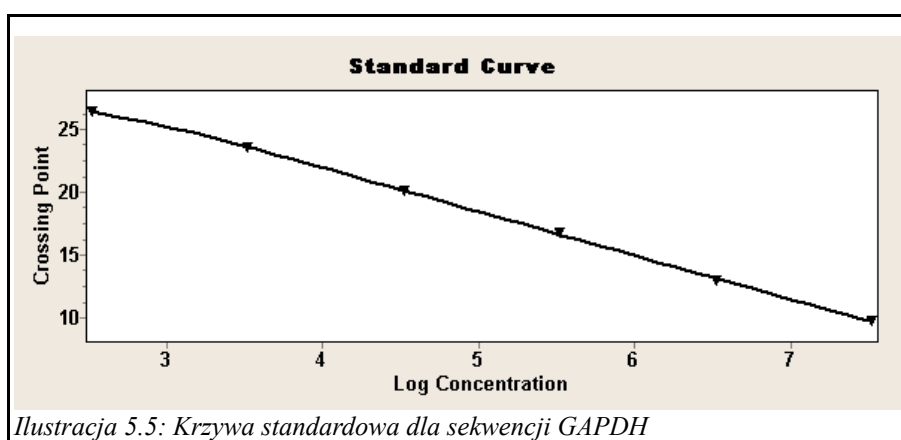
5.9.11 Krzywe standardowe

Krzywe standardowe otrzymywano na podstawie procedury opisanej w podrozdziale 5.9.10. Poniżej przedstawiono wynik amplifikacji serii rozcieńczeń, przeprowadzonej celem uzyskania krzywej standardowej dla sekwencji GAPDH. Legenda zawiera dane dotyczące liczby kopii amplikonu na reakcję. Wartości C_t nie są pokazane. Dokładność przygotowań oraz jakość uzyskanych wyników były tutaj niezwykle istotne, ponieważ jako gen referencyjny, stanowi on odniesienie dla wszystkich innych oznaczeń.



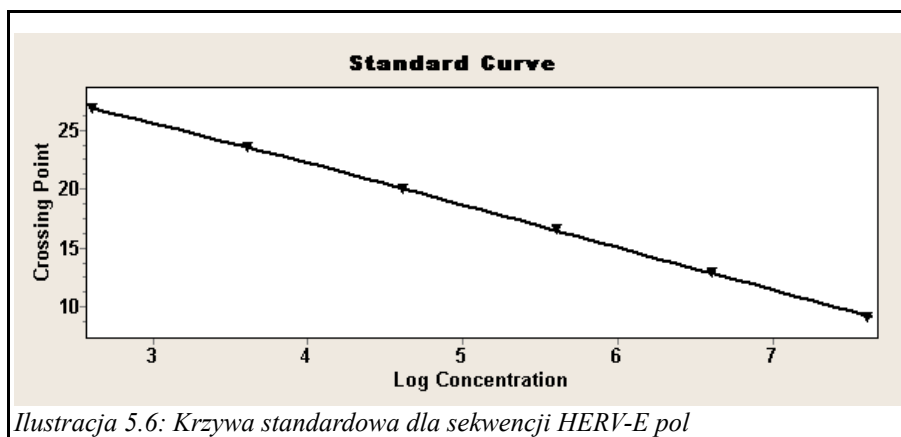
Ilustracja 5.4: Amplifikacja serii rozcieńczeń ampikonu GAPDH

Na podstawie powyższych wyników oprogramowanie termocyklera wykreśliło zamieszczoną poniżej krzywą standardową zależności wartości C_p od zlogarytmowanego stężenia transkryptów na reakcję.

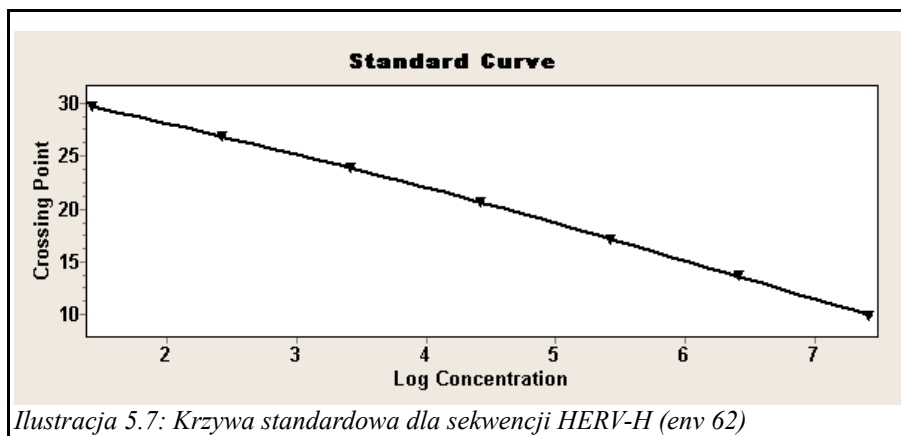


Ilustracja 5.5: Krzywa standardowa dla sekwencji GAPDH

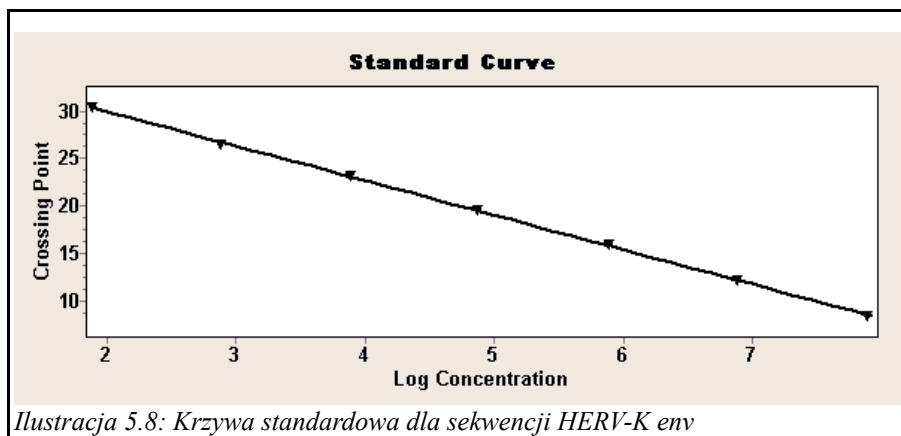
Krzywe standardowe dla wszystkich opisywanych sekwencji HERV wykonano w sposób analogiczny. Odpowiadające im krzywe standardowe zamieszczono poniżej.



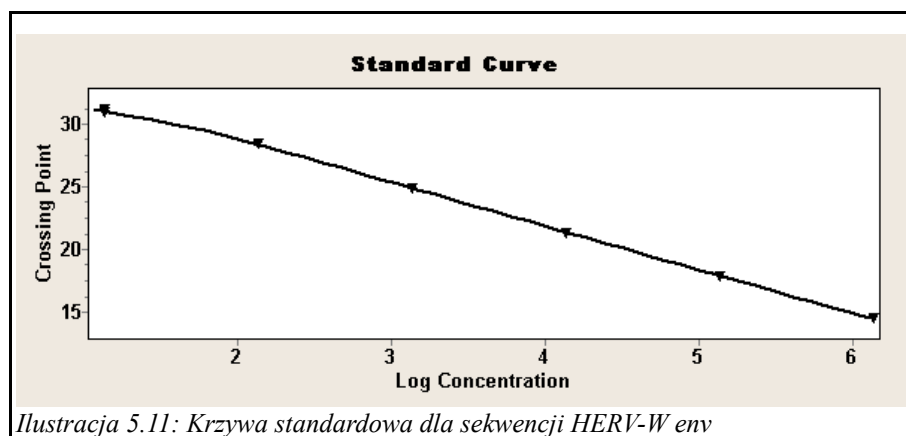
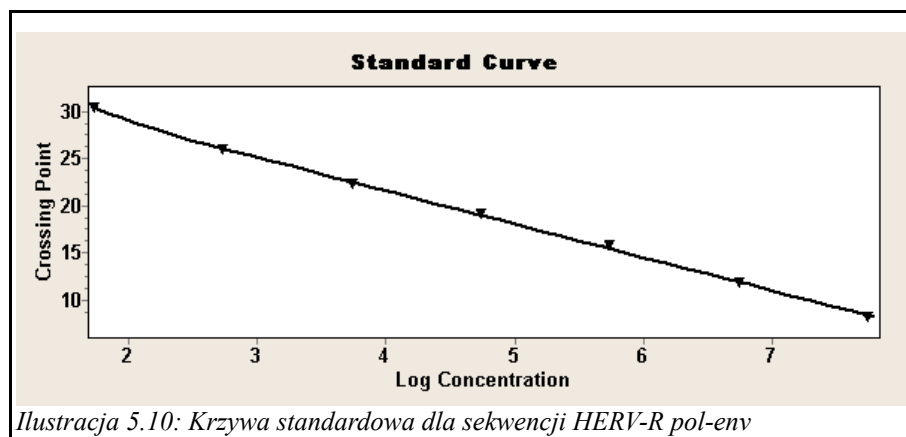
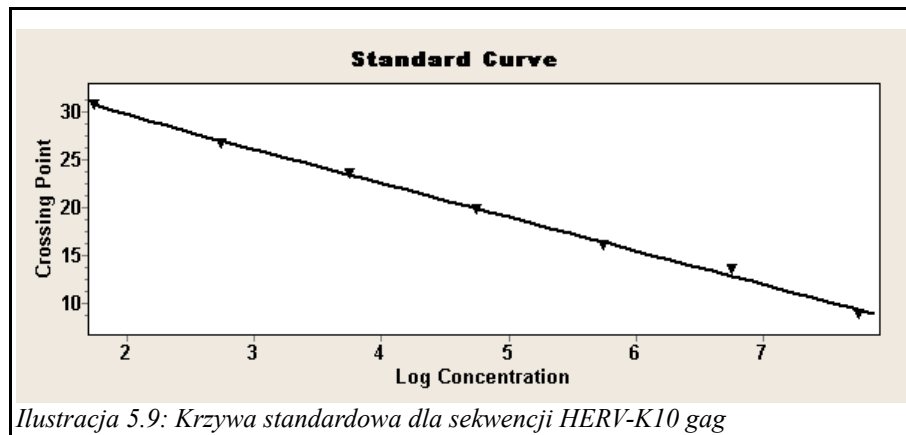
Ilustracja 5.6: Krzywa standardowa dla sekwencji HERV-E pol



Ilustracja 5.7: Krzywa standardowa dla sekwencji HERV-H (env 62)



Ilustracja 5.8: Krzywa standardowa dla sekwencji HERV-K env



5.9.12 Analiza temperatury topnienia amplikonu

Ponieważ barwnik fluorescencyjny SYBR Green I, jak już wspomniano w podrozdziale 3.4.2.1, charakteryzuje się silną wartością emisji tylko będąc w kompleksie z dwuniciowym DNA, można użyć go do określenia temperatury topnienia dowolnego fragmentu dwuniciowego DNA, poprzez analizę spadku poziomu fluorescencji w trakcie podnoszenia temperatury mieszaniny reakcyjnej. Temperatura topnienia zależy od wielu czynników, takich jak długość fragmentu, jego sekwencja, stosunek par A=T do G≡C, stężenie soli itd., jest ona jednak stabilna dla konkretnych amplikonów i stałych parametrów reakcji [Ririe KM i wsp. 1997]. Aberracje w profilu temperatury topnienia sugerują niespecyficzną amplifikację.

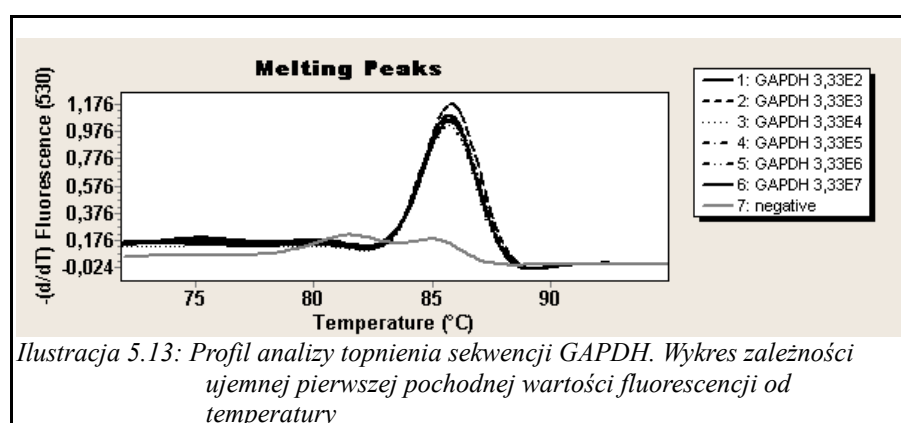
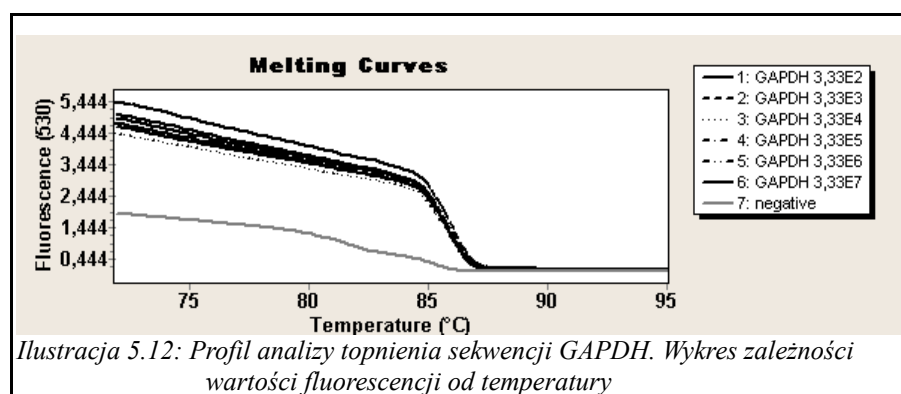
Analizę temperatury topnienia wykonywano bezpośrednio po każdej amplifikacji matryc cDNA, reakcjach optymalizacyjnych i no-RT, a także po reakcjach, w których amplifikowano standardy i serie rozcieńczeń do krzywych standardowych.

Mieszanina reakcyjna była powoli podgrzewana od temperatury 72°C do 95°C, przy jednoczesnym, stałym pomiarze fluorescencji przy długości fali 530 nm. Szybkość zmiany temperatury wynosiła 0,1°C na sekundę. Wartość początkowa temperatury odpowiadała temperaturze elongacji, po której w reakcji real-time PCR następował pomiar fluorescencji. Dzięki temu początkowy poziom fluorescencji w analizie temperatury topnienia odpowiadał dokładnie końcowemu pomiarowi fluorescencji w reakcji real-time PCR. Oprogramowanie termocyklera wykreślało w czasie rzeczywistym wykres fluorescencji w zależności od aktualnej temperatury oraz wykres ujemnej pierwszej pochodnej w zależności od aktualnej temperatury.

Po zakończeniu reakcji, profil topnienia porównywano z wzorcem uzyskanym podczas reakcji optymalizacji. Analiza ta służyła jako kontrola

jakościowa powstałych amplikonów, dzięki czemu nie było konieczności przeprowadzania elektroforezy w żelu agarozowym dla wszystkich produktów powstałych z matryc cDNA. Przykładowe uzyskane analizy ujęto w podrozdziale 6.1.3.

Na ilustracji 5.4 widoczny jest fałszywie dodatni wynik kontroli negatywnej (szara linia). Rezultat ten nie jest jednak brany pod uwagę ze względu na wynik analizy topnienia. Na załączonych poniżej ilustracjach 5.12 i 5.13 widoczny jest wyraźnie odbiegający profil topnienia dla reakcji kontroli negatywnej. Jest to najprawdopodobniej wynik niespecyficznego amplifikacji.



5.10 Elektroforeza w żelach agarozowych

Elektroforezę wykonywano w żelach agarozowych o stężeniu 1,25%, barwionych barwnikiem SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA), przy stałym napięciu nieprzekraczającym 5 V/cm. Zastosowano tabletkowaną agarozę oraz roztwór TAE (stężony 1-krotnie lub 0,5-krotnie, w zależności od stosowanego aparatu). Próby oraz marker wielkości nakładano na żel przy użyciu buforu ładującego 6X Orange DNA Loading Dye (Fermentas, USA), zawierającego dwa barwniki: oranż G oraz ksylen cyanol FF. Bufor ładujący został dobrany tak, by rozdzielane elektroforetycznie fragmenty DNA znajdowały się pomiędzy wspomnianymi barwnikami. Jako marker wielkości zastosowano plazmid pUC19, trawiony enzymem MspI - pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker (Fermentas, USA).

W celu wizualizacji, żele naświetlano niebieskim monochromatycznym światłem o długości fali 470 nm, wzbudzając w ten sposób fluorescencję barwnika SYBR Safe DNA gel stain. Zdjęcia wykonywano standardowym aparatem cyfrowym w trybie makro, przy użyciu dodatkowego pomarańczowego filtra fotograficznego, celem usunięcia niebieskiego tła. Wykonane zdjęcia poddawano obróbce w programie komputerowym Gimp 2.6.11.

5.11 Oznaczanie miana przeciwciał przeciwjądrowych - ANA

Miana przeciwciał przeciwjądrowych oznaczone zostały przy użyciu komercyjnego zestawu, bazującego na zasadzie immunofluorescencji pośredniej (Euroimmun, Niemcy). Ocenie poddano wszystkich chorych na morfeę, objętych tym badaniem. Badanie przeprowadzono celem wykrycia ewentualnych korelacji, pomiędzy mianem przeciwciał

przeciwwjądrowych a poziomem ekspresji badanych ludzkich endogennych sekwencji retrowirusowych. Badanie zostało wykonane zgodnie z zaleceniami producenta.

Głównym elementem tego testu są specjalnie przygotowane szkiełka podstawowe z kombinacją dwóch substratów: komórek HEp-2 i małych hepatocytów. W pierwszym etapie następuje inkubacja osocza z substratami, w którym przeciwciała przeciwwjądrowe z osocza przyłączają się do odpowiadającym im strukturom jąder komórkowych. Po etapie płukania następuje inkubacja z roztworem, zawierającym drugorzędowe przeciwciała anty-ludzkie, wyznakowane fluoresceiną. Po kolejnym płukaniu oraz zabezpieczeniem pól szkiełka podstawowego odpowiednio przygotowanym szkiełkiem nakrywkowym, przeprowadza się ocenę preparatów pod mikroskopem fluorescencyjnym (źródło światła: lampa rtęciowa, filtr wzbudzający: 488 nm, filtr odcinający: 510 nm, filtr barierowy: 520 nm, obiektyw: 40x).

5.12 Ocena nasilenia i rozległości zmian skórnych

Pacjenci z morfeą oceniani byli według wskaźnika LoSSi (Localized Scleroderma Severity Index) opracowanego przez Arkachaisriego i Pino [Arkachaisri T, Pino S 2008]. Jest to wskaźnik punktowy o skali porządkowej, którego maksymalna punktacja wynosi 168, a minimalna 0. Ocenie podlegały cztery parametry:

- rozległość zmian
- rumień
- grubość skóry
- aktywność wykwitów

Parametry te oceniane były w skali od 0 do 3 punktów, zgodnie z odpowiednimi kryteriami. Powyższe parametry oceniano osobno dla każdego z czternastu obszarów skóry:

- głowa
- szyja
- przednia powierzchnia klatki piersiowej
- brzuch
- górna powierzchnia pleców
- dolna powierzchnia pleców
- prawe ramię
- prawe przedramię i prawa ręka
- lewe ramię
- lewe przedramię i lewa ręka
- prawy pośladek i prawe udo
- prawe podudzie i prawa stopa
- lewy pośladek i lewe udo
- lewe podudzie i lewa stopa

Następnie wartości punktowe uzyskane dla wszystkich czterech parametrów we wszystkich czternastu obszarach sumowano.

5.13 Ocena aktywność choroby

Wzrost istniejących ognisk, pojawienie się nowych lub obecność obwódki o rumieniowo-fioletowym kolorze kwalifikowały osoby objęte badaniem do grupy z aktywnym procesem chorobowym. Osoby, u których w przeciągu ostatnich sześciu miesięcy nie stwierdzono powyższych objawów, kwalifikowani byli do grupy z nieaktywnym procesem chorobowym [Uziel Y i wsp. 2007].

5.14 Analiza statystyczna

Normalność rozkładu wartości zmiennych oceniano testem Shapiro-Wilka, natomiast obecność obserwacji znacząco odstających wykrywano testem Grubbsa, przy wartości $\alpha=0,05$. Ponieważ zdecydowana większość danych nie wykazywała rozkładu normalnego, wykazane różnice w poziomie ekspresji ludzkich endogennych sekwencji retrowirusowych pomiędzy grupami chorych i zdrowych, pomiędzy płciami w grupie chorych oraz pomiędzy grupami z formą aktywną a nieaktywną choroby, oceniono przy użyciu testu U Manna-Whitneya-Wilcoxon dla zmiennych niezależnych. Korelacje pomiędzy poziomem ekspresji ludzkich endogennych sekwencji retrowirusowych a wiekiem chorych, mianem ANA, długością trwania i intensywnością choroby (LoSSI) obliczono przy wykorzystaniu metody korelacji rangowej Spearmana.

Za istotnie statystycznie uznawano wyniki, w przypadku których wartość odpowiadającego prawdopodobieństwa dla testu U bądź obliczonego współczynnika korelacji rang wynosiła mniej niż 5%. Nie pominięto jednakże wyników bliskich temu progowi.

Analiza statystyczna została wykonana przy użyciu programu komputerowego Past 2.03. Wykresy sporządzono przy użyciu programu komputerowego QtiPlot 0.9.8.4.

6. Wyniki

6.1 Izolacja RNA i elektroforeza w żelach agarozowych

6.1.1 Izolacja RNA

Analiza stężeń wyizolowanego RNA, opisana w podrozdziale 5.6, wykazała wystarczającą ilość materiału, niezbędną do wykonania oznaczeń. Chociaż w niektórych przypadkach całkowita ilość wyizolowanego RNA była mniejsza niż zakładany 1 μg , to jednak w każdym przypadku udało wykonać się prawidłowe oznaczenia. Szczegółowe dane zawarto w tabeli 6.1.

	<i>Krew obwodowa</i> [μg / próbe]	<i>Wycinki skóry</i> [μg / próbe]
Minimum	0,62	0,40
Maksimum	24,00	10,00
Średnia	9,11	2,57
Mediana	7,20	1,98
Odchylenie standardowe	6,81	1,82

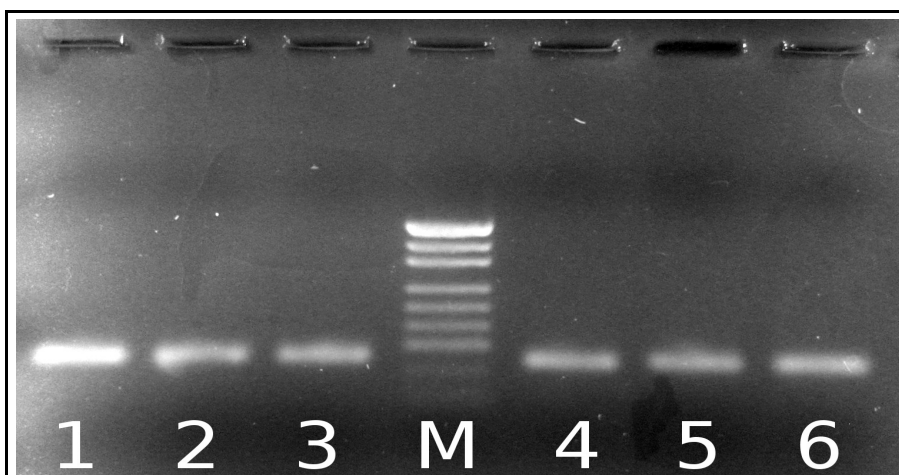
Tabela 6.1: Zestawienie wyizolowanych mas RNA

Zgodnie z przewidywaniami, całkowita ilość izolowanego RNA była wyższa w przypadku izolacji z PBMC niż z wycinków skóry. Było to wynikiem zarówno widocznej większej ilości materiału wejściowego, jak i różnicami strukturalnymi pomiędzy luźno zawieszonymi PBMC a zbitą skórą.

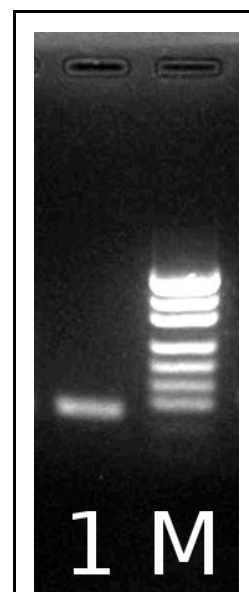
Z drugiej strony, ilość izolowanych po wirowaniu w gradiencie fikolu komórek podlegała znacznym wahaniom, natomiast wielkość wycinków skóry poddawanych homogenizacji była podobna. Znajduje to odzwierciedlenie w prezentowanych wartościach odchyień

6.1.2 Elektroforeza w żelach agarozowych

Poniżej zamieszczono ilustracje, zawierające zdjęcia przykładowych żeli agarozowych, w których przeprowadzono elektroforezę ampliconów uzyskanych w reakcjach real-time PCR, zgodnych z warunkami opisanymi w podrozdziale 5.9.8. Na ilustracji 6.3 zamieszczono legendę zastosowanego markera wielkości.

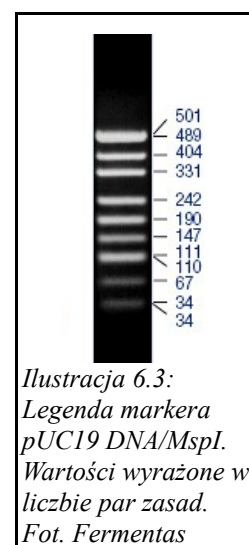


Ilustracja 6.1: Rozdział elektroforetyczny użytych sekwencji HERV: (1)HERV-K env – 104 pz, (2) HERV-E pol – 101 pz, (3) HERV-K10 gag – 103 pz, (M) marker wielkości, (4) HERV-R pol-env – 98 pz, (5) HERV-H (env 62) – 101 pz, (6) HERV-W env – 103 pz



Ilustracja 6.2: Rozdział elektroforetyczny: (1) GAPDH – 105 pz, (M) marker wielkości

Na wszystkich wyżej opisanych ścieżkach żeli agarozowych widoczne są wyraźne, pojedyncze i homogenne prążki. Wszystkie prążki charakteryzują się zamierzoną wielkością względem markera. Rezultat ten stanowi potwierdzenie poprawnie przeprowadzonego procesu projektowania oraz optymalizacji warunków reakcji.



Ilustracja 6.3: Legenda markera pUC19 DNA/MspI. Wartości wyrażone w liczbie par zasad. Fot. Fermentas

6.2 Statystyka opisowa

6.2.1 Wyniki ilościowe real-time PCR

Okolo 16% wszystkich partii reakcji real-time PCR zostało wykonanych podwójnie, w celu kontroli ewentualnego błędu pipetowania. W takich przypadkach do dalszej analizy brano średnią arytmetyczną z dwóch oznaczeń. Nie licząc partii podwojonych, kontroli ujemnych oraz standardów, wykonano łącznie 1096 oznaczeń.

Wyniki dla sekwencji GAPDH podane są w liczbie transkryptów na reakcję (liczbie transkryptów na 10 μ l). Jednostką dla sekwencji HERV jest liczba transkryptów w przeliczeniu na milion transkryptów GAPDH. Wartości średniej arytmetycznej są podane, jeśli test Shapiro-Wilka wykazał znamiona normalności rozkładu zmiennej ($p > 0,01$). Wartości znacząco odstające nie są podane.

6.2.1.1 Grupa chorych – PBMC

	<i>GAPDH</i>	<i>HERV-E</i> <i>pol</i>	<i>HERV-H</i> <i>(env 62)</i>	<i>HERV-K</i> <i>env</i>	<i>HERV-K10</i> <i>gag</i>	<i>HERV-R</i> <i>pol-env</i>	<i>HERV-W</i> <i>env</i>
N	41	41	41	41	41	41	41
Minimum	7230	143	16190	1820	1309	8733	13575
Maksimum	337000	27912	179487	145749	262393	118893	74151
Normalność rozkładu	p=0,18	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p=0,09	p<0,01	p<0,01
Średnia arytmetyczna	162081	-	-	-	87587	-	-
Mediana	153000	586	47315	30000	86058	22529	28103
Dolny kwartył	81100	385	32547	18231	26831	16078	21754
Górny kwartył	243500	3917	67104	37176	132501	27714	35062

Tabela 6.2: Ilościowe wyniki real-time PCR w grupie osób chorych dla PBMC

6.2.1.2 Grupa zdrowa – PBMC

	<i>GAPDH</i>	<i>HERV-E</i> <i>pol</i>	<i>HERV-H</i> <i>(env 62)</i>	<i>HERV-K</i> <i>env</i>	<i>HERV-K10</i> <i>gag</i>	<i>HERV-R</i> <i>pol-env</i>	<i>HERV-W</i> <i>env</i>
N	47	47	47	47	47	47	47
Minimum	1870	308	4435	1365	3236	132	4778
Maksimum	432000	13590	110853	86538	0	39724	33187
Normalność rozkładu	p<0,01	p<0,01	p=0,10	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p=0,03
Średnia arytmetyczna	-	-	45533	-	-	-	16184
Mediana	49600	3219	42727	15459	38220	9388	14214
Dolny kwartył	23400	1075	23188	8420	23424	6280	10402
Górny kwartył	144000	5243	64547	32486	106481	18206	22847

Tabela 6.3: Ilościowe wyniki real-time PCR w grupie osób zdrowych dla PBMC

6.2.1.3 Grupa chorych – wycinki skóry

	<i>GAPDH</i>	<i>HERV-E</i> <i>pol</i>	<i>HERV-H</i> <i>(env 62)</i>	<i>HERV-K</i> <i>env</i>	<i>HERV-K10</i> <i>gag</i>	<i>HERV-R</i> <i>pol-env</i>	<i>HERV-W</i> <i>env</i>
N	36	36	36	36	36	36	36
Minimum	218	269	184	0	324	1050	267
Maksimum	119000	27520	183193	46114	122124	204844	303109
Normalność rozkładu	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p=0,02	p<0,01	p<0,01
Średnia arytmetyczna	-	-	-	-	49282	-	-
Mediana	12400	2996	10406	9064	41336	34455	19271
Dolny kwartył	3503	1417	4840	1685	30668	21956	10143
Górny kwartył	40450	5534	52901	20553	67470	58028	43251

Tabela 6.4: Ilościowe wyniki real-time PCR w grupie osób chorych dla wycinków skóry

6.2.1.4 Grupa osób zdrowych – wycinki skóry

	<i>GAPDH</i>	<i>HERV-E</i> <i>pol</i>	<i>HERV-H</i> <i>(env 62)</i>	<i>HERV-K</i> <i>env</i>	<i>HERV-K10</i> <i>gag</i>	<i>HERV-R</i> <i>pol-env</i>	<i>HERV-W</i> <i>env</i>
N	13	13	13	13	13	13	13
Minimum	335	78	15291	0	28486	19237	704
Maksimum	14000	12500	313793	13619	128593	614799	116092
Normalność rozkładu	p=0,01	p=0,12	p<0,01	p<0,01	p=0,20	p=0,03	p=0,77
Średnia arytmetyczna	6752	4939	-	-	71600	192641	47210
Mediana	4520	4557	63125	1115	62385	119879	47292
Dolny kwartył	2640	875	30696	99	40801	68673	19825
Górny kwartył	12900	9571	109124	5831	104204	311512	64908

Tabela 6.5: Ilościowe wyniki real-time PCR w grupie osób zdrowych dla wycinków skóry

6.2.2 LoSSI

Wskaźnik LoSSI został obliczony u większości chorych objętych badaniem. Obliczenia wykonano dla 43 osób, od których pobrano krew lub/i wycinki skóry. Obliczeń nie wykonano dla czterech chorych objętych badaniem, u których stwierdzono współistnienie wykwitów liszaja twardzinowego. Średnia arytmetyczna nie została obliczona, ponieważ wartości wskaźnika LoSSI podane są w skali porządkowej.

N	43
Minimum	2
Maksimum	65
Mediana	10
Moda	4
Dolny kwartyl	4
Górny kwartyl	15

Tabela 6.6: Wyniki obliczeń wskaźnika LoSSI w grupie chorych

6.2.3 ANA

Miana przeciwciał przeciwwjadrowych zostały oznaczone u wszystkich chorych na morfeę objętych badaniem. Oznaczenie wykonano u 47 osób, od których pobrano krew lub/i wycinki skóry. Średnia arytmetyczna nie została obliczona, ponieważ zgodnie z zaleceniami producenta dane liczbowe uzyskano poprzez konwersję wyników obserwacji mikroskopowych w skali porządkowej. Co więcej, wartości zmiennej nie wykazywały normalności rozkładu ($p < 0,01$).

N	47
Minimum	0
Maksimum	2560
Mediana	80
Moda	80
Dolny kwartył	80
Górny kwartył	320

Tabela 6.7: Wyniki oznaczeń poziomu przeciwciał przeciwwjadrowych w grupie chorych

6.2.4 Długość trwania choroby

Długość trwania choroby została określona u wszystkich chorych na morfeę objętych badaniem. Oznaczenie wykonano u 47 osób, od których pobrano krew lub/i wycinki skóry. Wartości w tabeli zaokrąglone są do pełnego roku w dół, poza wyszczególnioną wartością minimalną. Średnia arytmetyczna nie została obliczona, ponieważ wartości zmiennej nie wykazywały normalności rozkładu ($p < 0,01$).

N	47
Minimum	<1
Maksimum	26
Mediana	2
Moda	1
Dolny kwartył	1
Górny kwartył	6

Tabela 6.8: Analiza długości trwania choroby

6.2.5 Aktywność choroby

Aktywność choroby została określona u wszystkich chorych na morfeę objętych badaniem. Przyporządkowanie do odpowiednich grup wykonano u 47 osób, od których pobrano krew lub/i wycinki skóry. Aktywny proces chorobowy stwierdzono o 30 chorych, pozostałe 17 osób zakwalifikowano do grupy z nieaktywnym procesem chorobowym.

6.3 Analiza statystyczna

6.3.1 Ocena różnic pomiędzy podgrupami

Wyniki przedstawione w podrozdziałach 6.3.1.1 oraz 6.3.1.2 zostały opublikowane również w czasopiśmie Archives of Medical Science [Kowalczyk MJ i wsp. 2012].

6.3.1.1 Analiza różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy grupą osób chorych a grupą osób zdrowych w PBMC

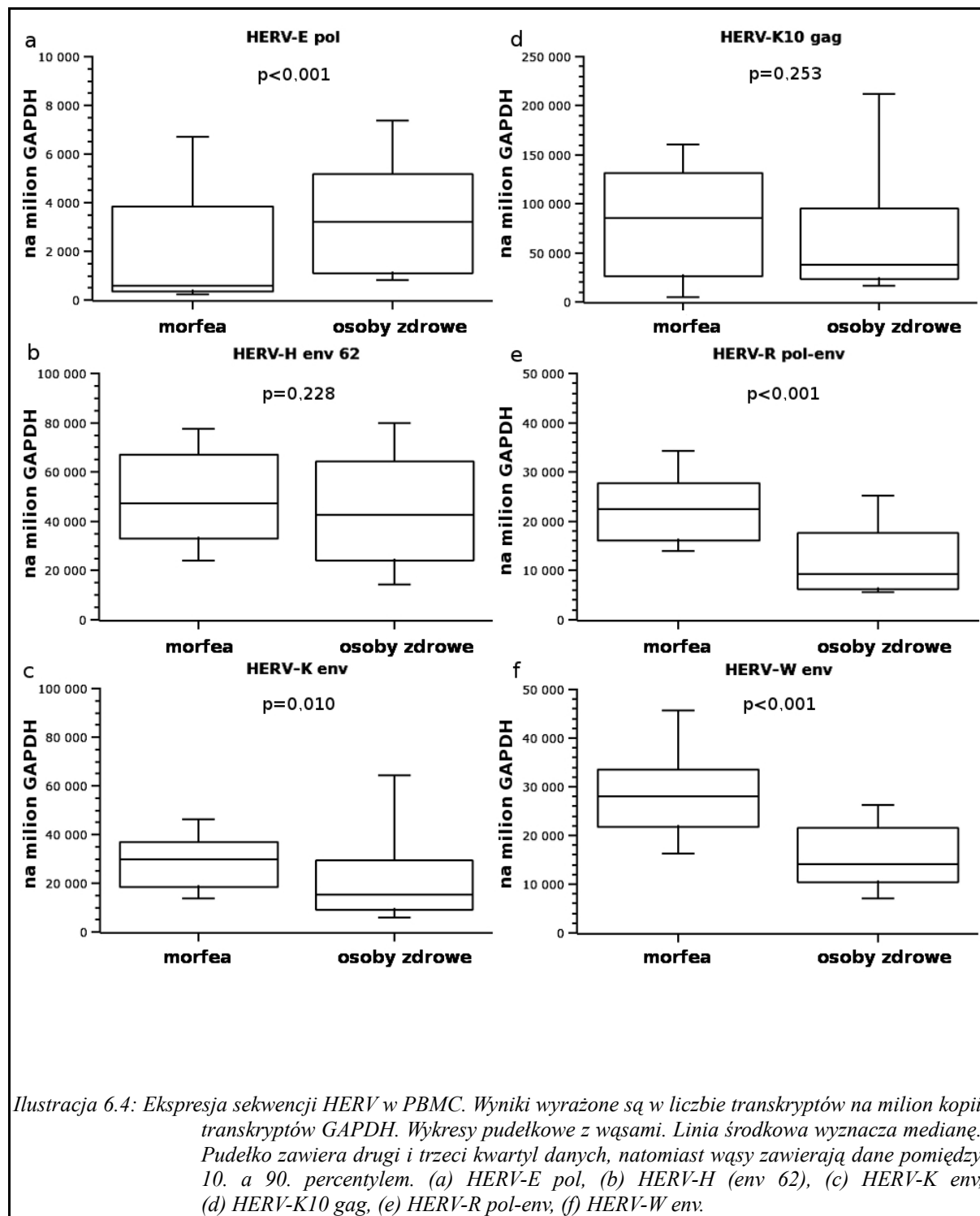
Wyniki analizy statystycznej przedstawiono w poniższej tabeli.

<i>Sekwencja HERV</i>	<i>Osoby chore mediana</i>	<i>Osoby zdrowe mediana</i>	<i>Różnica procentowa</i>	<i>Test U wartość p</i>
HERV-E pol	586	3219	-81,8%	<0,001
HERV-H (env 62)	47315	42727	+10,7%	0,228
HERV-K env	30000	15459	+94,1%	0,010
HERV-K10 gag	86058	38220	+125,2%	0,253
HERV-R pol-env	22529	9388	+140,0%	<0,001
HERV-W env	28103	14214	+97,7%	<0,001

Tabela 6.9: Ocena różnic pomiędzy grupą osób chorych a grupą osób zdrowych w PBMC

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała znaczny, istotnie statystyczny spadek aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV-E pol w PBMC. Aktywność transkrypcyjna pozostałych sekwencji wykazywała tendencje wzrostowe, chociaż istotne statystycznie były różnice tylko dla trzech sekwencji: HERV-K env, HERV-R pol-env i HERV-W. Pomimo różnicy poziomu mediany o 125,2% w przypadku sekwencji HERV-K10 gag, różnica ta nie okazała się być istotna statystycznie.

Powyższe wyniki w formie wykresów pudełkowych z wąsami przedstawiono na ilustracji 6.4.



6.3.1.2 Analiza różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy grupą osób chorych a grupą osób zdrowych w wycinkach skóry

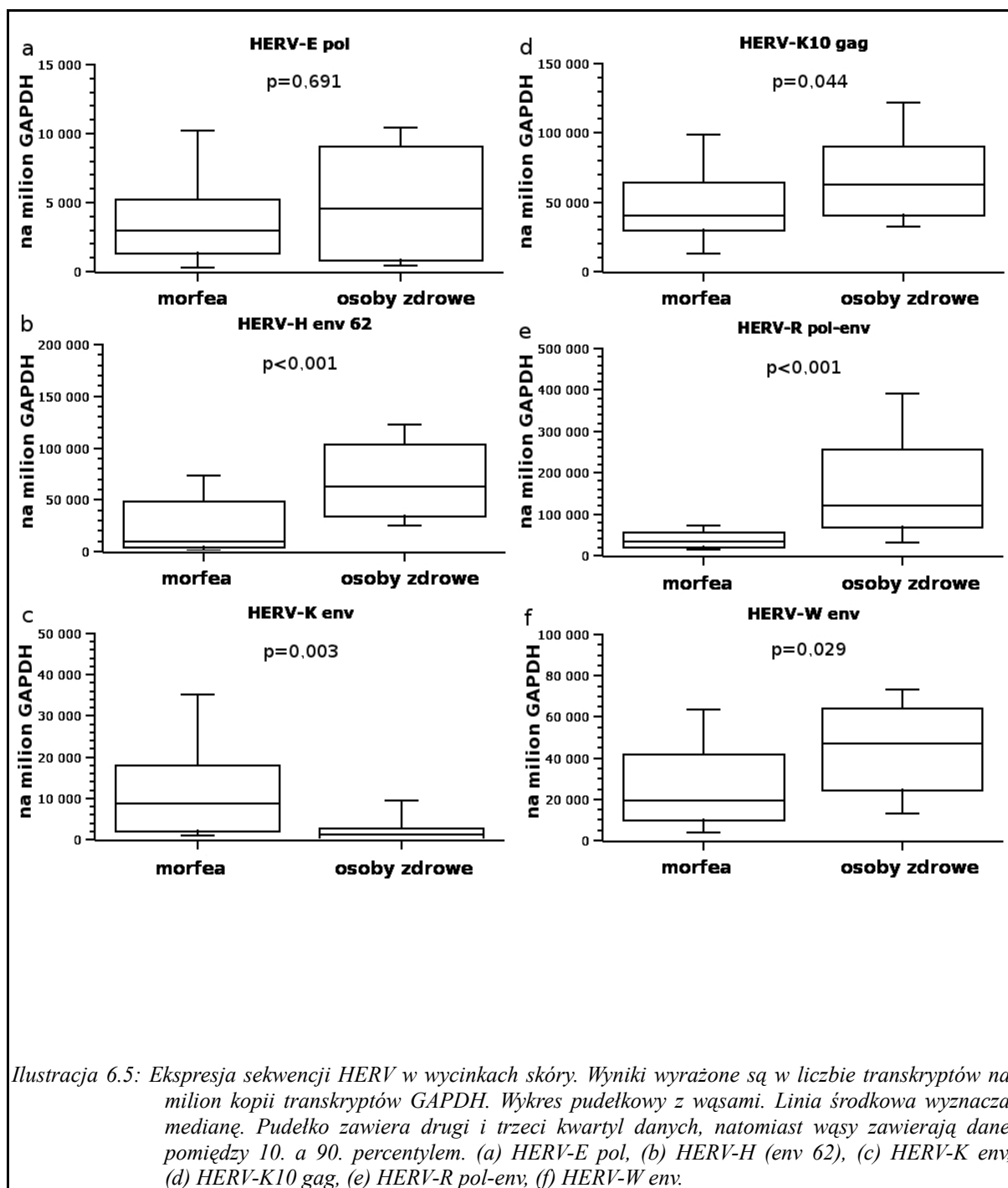
Wyniki analizy statystycznej przedstawiono w poniższej tabeli.

<i>Sekwencja HERV</i>	<i>Osoby chore mediana</i>	<i>Osoby zdrowe mediana</i>	<i>Różnica procentowa</i>	<i>Test U wartość p</i>
HERV-E pol	2996	4557	-34,2%	0,691
HERV-H env 62	10406	63125	-83,5%	<0,001
HERV-K env	9064	1115	+713,0%	0,003
HERV-K10 gag	41336	62385	-33,7%	0,044
HERV-R pol-env	34455	119879	-71,3%	<0,001
HERV-W env	19271	47292	-59,3%	0,029

Tabela 6.10: Ocena różnic pomiędzy grupą osób chorych a grupą osób zdrowych w wycinkach skóry

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała bardzo wyraźny, istotny statystycznie wzrost aktywności transkrypcyjnej w skórze jedynie dla sekwencji HERV-K env. Aktywność transkrypcyjna wszystkich pozostałych sekwencji, tj. HERV-E pol, HERV-H (env 62), HERV-K10 gag, HERV-R pol-env oraz HERV-W env, podlegała spadkom. Jedynie spadek aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV-E pol nie był statystycznie istotny.

Powyższe wyniki w formie wykresów pudełkowych z wąsami przedstawiono na ilustracji 6.5.



Ilustracja 6.5: Ekspresja sekwencji HERV w wycinkach skóry. Wyniki wyrażone są w liczbie transkryptów na milion kopii transkryptów GAPDH. Wykres pudełkowy z wąsami. Linia środkowa wyznacza medianę. Pudełko zawiera drugi i trzeci kwartył danych, natomiast wąsy zawierają dane pomiędzy 10. a 90. percentylem. (a) HERV-E pol, (b) HERV-H (env 62), (c) HERV-K env, (d) HERV-K10 gag, (e) HERV-R pol-env, (f) HERV-W env.

6.3.1.3 Analiza różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy płciami w grupie osób chorych

Wartości p dla testu U Manna-Whitneya-Wilcoxon dla zmiennych niezależnych przedstawiono w poniższych tabelach.

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Test U wartość p	0,314	0,245	0,610	0,396	0,865	0,140

Tabela 6.11: Analiza różnic pomiędzy płciami w grupie osób chorych w PBMC

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Test U wartość p	0,825	0,205	0,499	0,547	0,899	0,267

Tabela 6.12: Analiza różnic pomiędzy płciami w grupie osób chorych w wycinkach skóry

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała statystycznie istotnych różnic w aktywności transkrypcyjnej żadnej z sekwencji HERV ze względu na płeć w grupie osób chorych na morfeę, zarówno w PBMC jak i wycinkach skóry.

6.3.1.4 Analiza różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy płciami w grupie osób zdrowych

Wartości p dla testu U Manna-Whitneya-Wilcoxon dla zmiennych niezależnych przedstawiono w poniższych tabelach.

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Test U wartość p	0,262	0,932	0,534	0,710	0,760	0,932

Tabela 6.13: Analiza różnic pomiędzy płciami w grupie osób zdrowych w PBMC

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Test U wartość p	0,830	0,943	0,353	0,721	0,943	0,721

Tabela 6.14: Analiza różnic pomiędzy płciami w grupie osób zdrowych w wycinkach skóry

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała statystycznie istotnych różnic w aktywności transkrypcyjnej żadnej z sekwencji HERV ze względu na płeć w grupie osób zdrowych, zarówno w PBMC jak i wycinkach skóry.

6.3.1.5 Analiza różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy grupami z formą aktywną a nieaktywną choroby

Wartości p dla testu U Manna-Whitneya-Wilcoxon dla zmiennych niezależnych przedstawiono w poniższych tabelach.

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Test U wartość p	0,134	0,650	0,433	0,794	0,445	0,035

Tabela 6.15: Analiza różnic pomiędzy grupami z formą aktywną a nieaktywną choroby w PBMC

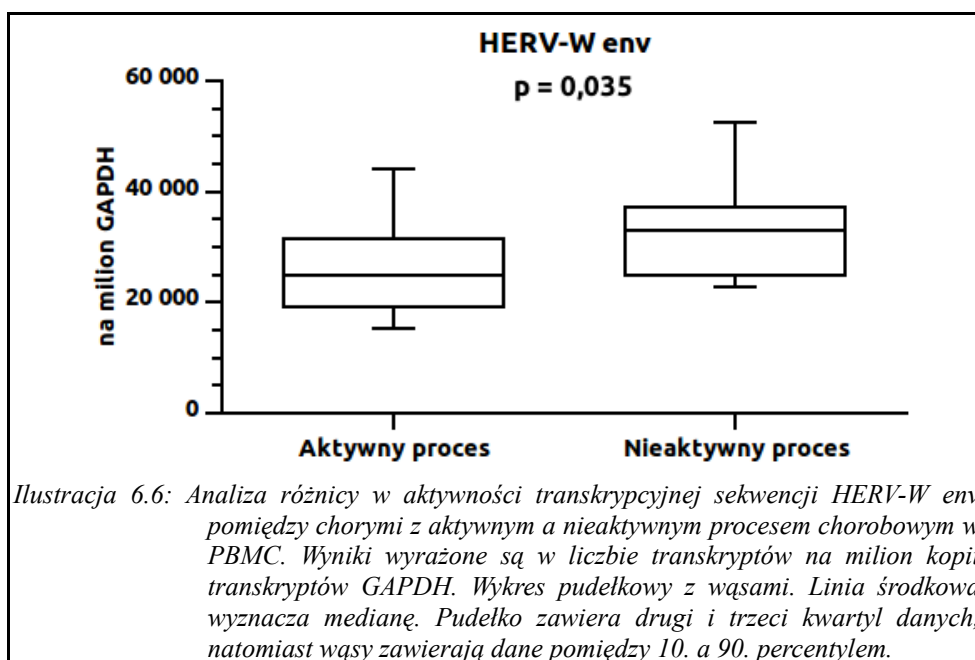
	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Test U wartość p	0,987	0,987	0,289	0,725	0,450	0,374

Tabela 6.16: Analiza różnic pomiędzy grupami z formą aktywną a nieaktywną choroby w wycinkach skóry

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotnie statystyczną różnicę w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV-W env w PBMC. Zanotowano spadek aktywności transkrypcyjnej w grupie chorych z aktywnym procesem chorobowym w porównaniu z grupą chorych z procesem nieaktywnym o 24%. Dokładną analizę tej różnicy zamieszczono w tabeli 6.17 oraz na ilustracji 6.6.

<i>Sekwencja HERV</i>	<i>Forma aktywna mediana</i>	<i>Forma nieaktywna mediana</i>	<i>Różnica procentowa</i>	<i>Test U wartość p</i>
HERV-W env	24896	32935	-24%	0,035

Tabela 6.17: Analiza różnicy w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV-W env pomiędzy grupami z formą aktywną a nieaktywną choroby w PBMC



Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała statystycznie istotnych różnic w aktywności transkrypcyjnej pozostałych sekwencji HERV ze względu na aktywność choroby, zarówno w PBMC jak i wycinkach skóry.

6.3.2 Analiza korelacji

6.3.2.1 Analiza korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a mianem ANA

Wartości współczynników korelacji rang Spearmana – r_s oraz przypisane im poziomy istotności statystycznej podano w poniższych tabelach.

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Współczynnik korelacji – r_s	-0,15	-0,11	0,03	0,04	-0,10	-0,17
Istotność statystyczna – wartość p	0,33	0,50	0,87	0,82	0,52	0,28

Tabela 6.18: Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a mianem ANA w PBMC

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Współczynnik korelacji – r_s	-0,25	-0,03	-0,14	0,08	-0,16	-0,21
Istotność statystyczna – wartość p	0,13	0,87	0,43	0,63	0,35	0,22

Tabela 6.19: Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a mianem ANA w wycinkach skóry

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała statystycznie istotnych korelacji pomiędzy poziomem aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV a mianem przeciwciał przeciwjądrowych – ANA. Najsilniejszy współczynnik korelacji wykazano dla sekwencji HERV-E pol w wycinkach skóry ($r_s = -0,25$), przy prawdopodobieństwie braku korelacji wynoszącym 13%.

6.3.2.2 Analiza korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a wskaźnikiem LoSSI

Wartości współczynników korelacji rang Spearmana – r_s oraz przypisane im poziomy istotności statystycznej podano w poniższych tabelach.

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Współczynnik korelacji – r_s	-0,22	-0,08	0,04	0,15	-0,24	-0,38
Istotność statystyczna – wartość p	0,18	0,61	0,78	0,34	0,13	0,01

Tabela 6.20: Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a wskaźnikiem LoSSI w PBMC

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Współczynnik korelacji – r_s	0,07	-0,01	-0,05	-0,10	-0,08	-0,15
Istotność statystyczna – wartość p	0,70	0,95	0,79	0,60	0,66	0,40

Tabela 6.21: Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a wskaźnikiem LoSSI w wycinkach skóry

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotną statystycznie, ujemną korelację pomiędzy poziomem aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV-W env a wskaźnikiem LoSSI w PBMC ($r_s = -0,38$; $p = 0,01$). W pozostałych przypadkach prawdopodobieństwo braku korelacji było wyższe niż 10%.

6.3.2.3 Analiza korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a długością trwania choroby

Wartości współczynników korelacji rang Spearmana – r_s oraz przypisane im poziomy istotności statystycznej podano w poniższych tabelach.

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Współczynnik korelacji – r_s	-0,18	-0,02	0,00	0,00	-0,04	-0,16
Istotność statystyczna – wartość p	0,26	0,91	0,98	0,98	0,81	0,32

Tabela 6.22: Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a długością trwania choroby w PBMC

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Współczynnik korelacji – r_s	0,10	0,03	0,10	-0,04	0,07	0,20
Istotność statystyczna – wartość p	0,55	0,85	0,57	0,82	0,70	0,23

Tabela 6.23: Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a długością trwania choroby w wycinkach skóry

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała żadnych statystycznie istotnych korelacji pomiędzy poziomem aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV a długością trwania choroby. Najsilniejszy współczynnik korelacji wykazano dla sekwencji HERV-W env w wycinkach skóry, gdzie wartość r_s wyniosła zaledwie -0,20, przy prawdopodobieństwie braku korelacji wynoszącym aż 23%.

6.3.2.4 Analiza korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a wiekiem osób chorych

Wartości współczynników korelacji rang Spearmana – r_s oraz przypisane im poziomy istotności statystycznej podano w poniższych tabelach.

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Współczynnik korelacji – r_s	-0,23	0,26	-0,18	0,07	0,08	0,13
Istotność statystyczna – wartość p	0,15	0,10	0,27	0,66	0,63	0,41

Tabela 6.24: Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a wiekiem osób chorych w PBMC

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Współczynnik korelacji – r_s	0,17	0,31	0,25	0,23	0,11	0,21
Istotność statystyczna – wartość p	0,33	0,06	0,15	0,17	0,52	0,23

Tabela 6.25: Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a wiekiem osób chorych w wycinkach skóry

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała prawdopodobnie istotną statystycznie, dodatnią korelację pomiędzy poziomem aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV-H (env 62) a wiekiem osób chorych w wycinkach skóry ($r_s = 0,31$; $p = 0,06$). Podobną zależność wykazano dla tej samej sekwencji w PBMC, choć wartość p testu U ułożyła była znacząco powyżej przyjętego progu istotności statystycznej ($r_s = 0,26$; $p = 0,10$).

6.3.2.5 Analiza korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a wiekiem osób zdrowych

Wartości współczynników korelacji rang Spearmana – r_s oraz przypisane im poziomy istotności statystycznej podano w poniższych tabelach.

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Współczynnik korelacji – r_s	-0,12	0,00	-0,06	-0,13	-0,16	-0,18
Istotność statystyczna – wartość p	0,41	0,98	0,68	0,40	0,28	0,24

Tabela 6.26: Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a wiekiem osób zdrowych w PBMC

	<i>HERV-E pol</i>	<i>HERV-H (env 62)</i>	<i>HERV-K env</i>	<i>HERV-K10 gag</i>	<i>HERV-R pol-env</i>	<i>HERV-W env</i>
Współczynnik korelacji – r_s	-0,82	0,23	0,44	-0,06	-0,09	-0,48
Istotność statystyczna – wartość p	<0,01	0,46	0,13	0,86	0,76	0,10

Tabela 6.27: Analiza korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a wiekiem osób zdrowych w wycinkach skóry

W odróżnieniu od osób chorych na morfeę, w grupie osób zdrowych nie stwierdzono istnienia korelacji pomiędzy poziomem aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV-H (env 62) a wiekiem zarówno w PBMC jak i w wycinkach skóry. Wykazano natomiast istotną statystycznie, silną ujemną korelację pomiędzy poziomem aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV-E pol a wiekiem osób zdrowych w wycinkach skóry ($r_s = -0,82$; $p < 0,01$). W pozostałych przypadkach wykazane wartości współczynników korelacji były nieistotne statystycznie.

7. Dyskusja

7.1 Ocena procedur przygotowania materiału

Izolacja RNA jest procedurą trudną i wymaga dużego skupienia oraz dbałości o szczegóły. Wszelkie błędy lub zaniedbania kończą się najczęściej utratą materiału. Najmniejsze zanieczyszczenie materiału lub odczynników RNAzami skutkuje koniecznością powtórzenia izolacji. W przypadku materiału zgromadzonego w ramach niniejszego badania taka sytuacja na szczęście nigdy nie miała miejsca. Żadna próba nie została utracona, choć zdarzało się, że materiał należało dodatkowo oczyszczać. Ilość wyizolowanego RNA wystarczyła na przeprowadzenie oznaczeń we wszystkich przypadkach, mimo że nie zawsze udawało się uzyskać cały mikrogram do reakcji DNAzowania (tabela 6.1), kiedy to na jedną reakcję real-time PCR przypadało cDNA odpowiadające około 25 ng masy wyizolowanego RNA.

Niewątpliwym sukcesem opisywanych badań było opracowanie efektywnej procedury izolacji całkowitego RNA ze skóry. W zasadzie wszystkie dostępne na rynku rozwiązania, pozwalające na izolację RNA z tkanek, dotyczyły materiałów miękkich lub umiarkowanie włóknistych, takich jak mózg, wątroba, czy serce. Opisana procedura pozwoliła na izolację RNA wystarczającej jakości, w zadowalającej ilości oraz, co niezwykle istotne, przy użyciu niedrogiego sprzętu.

Procedura ta wymaga jednak dopracowania, przede wszystkim pod względem standaryzacji masy tkanki. Kwestię tę podjęto w dalszej części niniejszego rozdziału. Drugim problemem, choć w większości już zminimalizowanym, jest możliwa ekspozycja użytkownika na opary fenolu.

7.2 Ocena różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy grupą osób chorych a grupą osób zdrowych

7.2.1 HERV-E pol

W PBMC wykazano istotny statystycznie spadek aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV-E pol w porównaniu z osobami zdrowymi o blisko 82% (tabela 6.9). Fakt ten jest dość nietypowy, ponieważ wszystkie inne sekwencje HERV, oznaczane w tym badaniu, wykazywały wzrost aktywności transkrypcyjnej w PBMC. Co więcej, wyniki innych badań w większości wskazują na wzrost aktywności HERV w chorobach o podłożu autoimmunologicznym [Namysł J i wsp. 2005][Zwolińska K 2006][Reynier F i wsp. 2009].

We wcześniejszych badaniach, prowadzonych nad chorymi z łuszczycą zwykłą, również stwierdzono spadek aktywności transkrypcyjnej tej sekwencji o mniej więcej połowę [Kowalczyk MJ i wsp. 2010 (A)]. Z drugiej strony, po przebadaniu większej grupy osób, wykazano statystycznie istotny wzrost ekspresji tej sekwencji w łuszczycy [Szramka – Pawlak B i wsp. w przygotowaniu]. Z tego powodu trudno mówić o wiarygodnym porównaniu pomiędzy tymi chorobami w tym przypadku.

W skórze wartość mediany dla osób chorych była o ponad 34% niższa niż dla osób zdrowych, z tym że różnica ta nie okazała się być statystycznie istotna, zwłaszcza biorąc pod uwagę niską liczebność grupy kontrolnej (tabela 6.10).

Sekwencja tego konkretnego endogennego genomu retrowirusowego została złożona w bazie GenBank pod koniec 2002 roku i opisana jako „związana z przewlekłą białaczką szpikową”. Było to głównym powodem dyktującym wybór tego konkretnego przedstawiciela grupy HERV-E w tym badaniu. Praca autorstwa chińskich badaczy,

opisująca domniemany związek tej sekwencji ze wspomnianą odmianą białaczki pozostaje jednakże nieopublikowana [Xu RZ, Zheng S 2002].

7.2.2 HERV-H (env 62)

W PBMC zanotowano nieistotny statystycznie wzrost aktywności transkrypcyjnej HERV-H (env 62) o blisko 11% w grupie chorych na morfeę. We wcześniej przeprowadzonych badaniach wykryto statystycznie istotne wzrosty aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV-H (env62) w PBMC w łuszczycy zwykłej i pęcherzycy zwykłej [Kowalczyk MJ i wsp. 2010 (B)][Kowalczyk MJ i wsp. 2009] Z drugiej strony, po wykonaniu oznaczeń na większej grupie chorych z łuszczycą i grupie kontrolnej, wspomniany wzrost poziomu transkrypcji utracił istotność statystyczną, a wyniki można uznać za wysoce porównywalne z niniejszym oznaczeniem w grupie chorych na morfeę [Szramka – Pawlak B i wsp. w przygotowaniu].

Ciekawym jest natomiast silny spadek ekspresji w skórze o ponad 80%. Ponieważ białko, będące produktem ekspresji tego genu, ma właściwości immunosupresyjne [Mangenev M. 2001], to spadek jego poziomu powinien wskazywać na natężenie odpowiedzi immunologicznej. Nie wiadomo jednak czy spadek aktywności transkrypcyjnej tej sekwencji spowodowany jest bezpośrednią inhibicją transkrypcji związanej z etiopatogenezą morfeji, czy też jest to skutek uboczny innego procesu, będącego na przykład wynikiem zmian immunologicznych. Związek pomiędzy białkiem o masie 62 kDa, posiadającym właściwości indukcji nowotworów, a spadkiem ekspresji kodującego go genu w zmienionej chorobowo skórze osób z morfeją wymaga dalszej analizy, szczególnie w kontekście możliwego zmniejszonego prawdopodobieństwa wystąpienia onkogenezy w skórze osób chorych na morfeę, dzięki inhibicji HERV-H.

7.2.3 HERV-K env

Wcześniejsze badania prowadzone na PBMC, pobranych od 12 pacjentów z pęcherzycą zwykłą, nie wykazały statystycznie istotnej różnicy w aktywności transkrypcyjnej tej sekwencji pomiędzy osobami chorymi a zdrowymi [Kowalczyk MJ i wsp. 2010 (B)]. W PBMC chorych na łuszczycę zanotowano statystycznie istotny, kilkudziesięcioprocentowy wzrost ekspresji [Szramka – Pawlak B i wsp. w przygotowaniu].

W przypadku morfeii zanotowano statystycznie istotne wzrosty poziomu ekspresji HERV-K env zarówno w PBMC (blisko dwukrotny - tabela 6.9), jak w wycinkach skóry (bardzo silny, kilkukrotny wzrost - tabela 6.10). Należy zauważyć, iż HERV-K env jako jedyna sekwencja podlegała nadekspresji w skórze u osób z morfeją.

Podwyższona ekspresja HERV-K opisywana była wielokrotnie, np. w raku piersi [Feng WJ 2001][Wang-Johanning F I i wsp. 2003][Zwolińska K 2006]. Sytuacja ta jest nieco podobna do wcześniej wspomnianego przypadku HERV-H env, gdyż obydwa białka otoczki opisywano w kontekście procesu nowotworzenia. Należałoby podjąć badania, mające na celu wyjaśnienie przede wszystkim nietypowego, silnego wzrostu aktywności transkrypcyjnej tej sekwencji w skórze osób chorych na morfeję, zwłaszcza w kontekście możliwego potencjału onkogennej tej sekwencji, jako że to właśnie HERV-K env ma mieć związek z procesem nowotworzenia w raku piersi [Wang-Johanning F i wsp. 2003].

Z kolei zanotowana nadekspresja HERV-K env w PBMC podobna jest w swej intensywności do tej stwierdzonej u osób chorych na łuszczycę, nie jest zatem ograniczona wyłącznie do morfeii.

Opisywany przypadek sekwencji HERV-K env wydaje się szczególnie interesujący, gdyż jest to jedyna sytuacja, w której zanotowano silny wzrost aktywności transkrypcyjnej w skórze, co jest odstępstwem od pozostałych wyników, gdzie wykazano spadki aktywności.

Pomijając pewne podobieństwa pomiędzy białkami otoczki HERV-H i HERV-K, bez odpowiedzi pozostaje pytanie, dlaczego w pierwszym przypadku ekspresja podlega inhibicji, a w drugim jest promowana.

7.2.4 HERV-K10 gag

Podwyższoną ekspresję HERV-K10 opisywano w łożysku, tkankach embrionalnych i w niektórych liniach komórkowych. Wiele uwagi poświęca się wpływowi tego endogennego retrowirusa na etiopatogenezę raków jąder i piersi [Sauter M i wsp. 1995][Goedert JJ i wsp. 1999].

Pomiary ekspresji, zarówno w PBMC jak i w skórze, sekwencji HERV-K10 gag wykazują duże rozrzuty względem mediany. Wartość mediany poziomu ekspresji w przeliczeniu na milion kopii transkryptu GAPDH w grupie kontrolnej w PBMC jest bardzo podobna do analogicznej wartości w innym badaniu, przeprowadzonym u osób chorych na łuszczycę (odpowiednio 38220 i 33692 kopii na milion kopii transkryptu GAPDH), chociaż grupa ta składała się tylko z dziesięciu ochotników [Namysł J i wsp. 2005].

Uzyskane wyniki wskazują na wzrost aktywności transkrypcyjnej tej sekwencji o ponad 125% w PBMC u osób chorych na morfeę, który to jednak nie był statystycznie istotny, najprawdopodobniej z powodu sporego rozrzutu wartości i braku normalności rozkładu zmiennej w grupie kontrolnej. Z drugiej strony zanotowany wzrost był statystycznie istotnie niższy niż ten opisany przez Namysła i wsp. w grupie chorych na łuszczycę.

Aktywność transkrypcyjna tej sekwencji w skórze była istotnie statystycznie niższa u osób z morfeą o około 34%. Podobnie jak w przypadku sekwencji HERV-H (env 62) spadek ten jest ciekawy z punktu widzenia możliwego obniżonego potencjału onkogennego. Należy jednak

zauważyć, że stwierdzony poziom istotności statystycznej znalazł się bardzo blisko wartości krytycznej $p=0,05$ (tabela 6.10). W przypadku większej grupy kontrolnej różnica ta mogłaby utracić istotność statystyczną. Należy zatem podchodzić ostrożnie do możliwego spadku ekspresji HERV-K10 gag w skórze, a z kolei niska wartość tej różnicy powoduje, że ewentualne praktyczne wykorzystanie tego zjawiska jest mało realne.

7.2.5 HERV-R (ERV-3) pol-env

ERV-3 to jeden najczęściej badanych ludzkich endogennych retrowirusów [Zwolińska K 2006]. Istnieją silne dowody na jego ważną rolę w rozwoju łożyska. Wirus ten zintegrował się z genomem przodków człowieka około 30-40 milionów lat temu, co ewidentnie świadczy o potrzebie utrzymywania go w genomie - inaczej zmutowałby lub zostałby usunięty [Kato N i wsp. 1987].

Wyniki niniejszego badania wskazują, że zdrowa skóra generuje znacznie, bo aż ponad dwunastokrotnie, więcej transkryptów HERV-R pol-env niż PBMC w grupie kontrolnej. Jest to jednocześnie najwyższy zanotowany poziom ekspresji ze wszystkich sekwencji objętych tym badaniem (tabela 6.9 i 6.10).

Zanotowano silny, statystycznie istotny wzrost aktywności transkrypcyjnej tej sekwencji HERV-R w PBMC u osób chorych na morfeę, przy jednoczesnym wyraźnym spadku tejże aktywności w skórze. Pomimo odnotowanego spadku w skórze, poziom ten jest nadal wyższy od poziomu obserwowanego w PBMC.

W tym przypadku spadek aktywności transkrypcyjnej w wycinkach skóry u osób chorych na morfeę może być bezpośrednim wynikiem znacząco obniżonej liczby gruczołów łojowych w skórze chorobowo

zmienionej. Andersson i wsp. donieśli, że poziom ekspresji ERV-3 jest znacząco podwyższony w gruczołach łojowych u zdrowej populacji. Ponieważ jednym z objawów morfeji jest zanik gruczołów łojowych, istnieje wysokie prawdopodobieństwo, iż jest to bezpośrednia przyczyna zanotowanego spadku ekspresji HERV-R pol-env. Ponieważ badania przeprowadzone przez Anderssona i wsp. nie były ilościowe, lecz tylko jakościowe, hipoteza ta wymaga potwierdzenia [Andersson AC i wsp. 1996].

Uzyskane wyniki są w tym przypadku niezwykle interesujące, ponieważ rozrzut wartości zmiennej u osób chorych na morfeję w skórze był bardzo mały (Ilustracja 6.5.e). Wyniki wskazują na potencjalną możliwość wykorzystania ERV-3 jako transkrypcyjnego markera choroby lub, co bardziej prawdopodobne, jako narzędzia do oceny gruczołów łojowych. Możliwość takiego zastosowania wymagałaby kolejnych badań z użyciem skóry mechanicznie pozbawionej gruczołów łojowych.

7.2.6 HERV-W env

Aktywność transkrypcyjna sekwencji HERV-W env w PBMC u chorych na morfeję była blisko dwukrotnie wyższa niż u zdrowych osób, a różnica ta była istotna statystycznie (tabela 6.9). Z kolei w skórze zanotowano istotny statystycznie spadek ekspresji o blisko 60% w porównaniu do osób zdrowych (tabela 6.10).

Sekwencja ta również była badana przez Namysła i wsp. W badaniu będącym przedmiotem niniejszej rozprawy, zanotowane wartości ekspresji w PBMC normalizowane względem ekspresji genu GAPDH były o rząd wielkości większe. Z drugiej strony, choć wyniki wskazują na mniej więcej dwukrotny wzrost aktywności transkrypcyjnej u osób chorych na morfeję, to w przypadku twardziny układowej Namysł i wsp. zanotowali

wzrost czterokrotny, a jeszcze większy w przypadku łuszczycy. W tym miejscu należy jeszcze raz przypomnieć o nielicznych grupach w badaniach Namysłą i wsp. Twardzina układowa i łuszczycą są chorobami bardziej obciążającymi niż morfeą, ale wniosek sugerujący, że ekspresja HERV-W env w PBMC jest tym większą, im cięższa jest choroba tkanki łącznej, byłby na tym etapie zbyt daleko idący.

Zanotowany spadek ekspresji HERV-W env w skórze jest kolejnym zaskakującym wynikiem dla tej tkanki. W tym przypadku jednak rozrzut wartości zmiennej u osób chorych jest duży, wykresy w znacznym stopniu zachodzą na siebie, a wartość p wynosi prawie 3%. W przypadku skóry, sekwencja HERV-W env nie wydaje się być wysoce atrakcyjna w kontekście przyszłych badań.

7.3 Ocena różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy płciami

W niniejszym badaniu nie wykazano żadnych statystycznie istotnych różnic w aktywności transkrypcyjnej badanych sekwencji HERV pomiędzy grupą kobiet i mężczyzn, zarówno w badaniu PBMC jak i wycinków skóry. Przeprowadzona analiza statystyczna różnic aktywności transkrypcyjnej HERV z podziałem na płeć była konieczna z dwóch powodów.

Po pierwsze, jak już wspomniano, postuluje się większą zachorowalność na morfeę u kobiet niż u mężczyzn. Istniały zatem przesłanki, że ekspresja HERV może być związana z płcią w tym przypadku, chociaż nie zakładano z góry takich różnic.

Po drugie, ewentualne różnice w ekspresji HERV u różnych płci, skłaniałyby do zwrócenia większej uwagi na problem doboru osób w grupach badanych i kontrolnych względem tego kryterium. Jest to szczególnie ważne, gdy przyrównamy grupę PBMC pobranych od osób chorych na morfeę, w której kobiety stanowiły blisko 54%, do kontroli zdrowej, gdzie kobiety stanowiły aż 74% grupy. Ponieważ jednak aktywność transkrypcyjna HERV najwyraźniej nie jest zależna od płci, idealny dobór grup pod względem procentowej liczebności kobiet i mężczyzn nie wydaje się bardzo istotny.

7.4 Ocena różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV pomiędzy grupami z aktywną a nieaktywną formą choroby

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych statystycznych różnic w aktywności transkrypcyjnej sekwencji HERV, porównując pacjentów z formą aktywną do grupy z formą nieaktywną morfeii, z wyjątkiem HERV-W env w skórze. Ze względu na szeroki kontekst tego konkretnego wyniku, omówiono go w dalszej części dyskusji w podrozdziale 7.5.2.

Brak stwierdzonych różnic jest zastanawiający. Logicznym wydaje się założenie, że skoro wykazano różnice w skórze pomiędzy osobami zdrowymi a chorymi, to również podobne różnice powinny być widoczne przy porównaniu starszych ognisk do nowych, lub szerzących się. Można było przypuszczać, że w PBMC aktywność choroby powinna mieć przełożenie na zaistnienie istotne statystycznie różnice, skoro dla większości sekwencji zanotowano wzrosty ekspresji.

Uzyskane wyniki pozwalają na wysunięcie dwóch w zasadzie wzajemnie wykluczających się wniosków. Na tym etapie nie da się jednoznacznie określić, który z nich jest prawdziwy.

Z jednej strony aktywność transkrypcyjna HERV, może być zupełnie niezależna od aktywności choroby w morfeii. Choć stanowi to zaprzeczenie wyników omówionych w podrozdziale 7.2, w chwili obecnej uzyskane wyniki nie wykluczają takiej możliwości.

Z drugiej jednak strony, przyjęte kryteria kwalifikacji osób do poszczególnych podgrup mogą nie odpowiadać w pełni założeniom eksperymentu. Kryteria włączenia do grupy z procesem aktywnym lub nieaktywnym, opisane w podrozdziale 5.13, obejmowały okres aż 6 miesięcy do momentu dokonania kwalifikacji. Okres ten, z punktu widzenia otrzymanych wyników, wydaje się zbyt długi. W tym czasie nowe ogniska mogły upodobnić się do starszych, szerzące się przestać

rosnąć, a rumieniowe obwódki po prostu zaniknąć, prowadząc do zrównania aktywności transkrypcyjnej HERV do poziomów odpowiadającym tym zanotowanym w grupie chorych z nieaktywną formą morfei.

Ponieważ aktywność transkrypcyjna HERV może mieć powiązanie z aktywnym procesem immunologicznym w chorobach tkanki łącznej, należałoby zmienić kryteria włączenia do opisywanych podgrup. Obecne kryteria nie odzwierciedlają różnic immunologicznych, są natomiast użyteczne z klinicznego punktu widzenia. Z kolei zbyt wąskie kryteria włączenia do grupy z aktywnym procesem chorobowym mogłoby skutecznie ograniczyć jej liczebność i uniemożliwić przeprowadzenie analizy statystycznej.

Na chwilę obecną, prócz jednego przypadku, nie można udowodnić wpływu aktywności morfei na ekspresję HERV, co jest również podparte wynikami badań korelacji ze wskaźnikiem LoSSI, opisanym w dalszej części pracy, w podrozdziale 7.5.2.

7.5 Ocena korelacji

7.5.1 Ocena korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a mianem ANA

Jak już wspomniano, nie uzyskano żadnych statystycznie istotnych korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a mianem przeciwciał przeciwjądrowych.

W badaniach własnych nie wykazano korelacji pomiędzy wskaźnikiem LoSSI a mianem przeciwciał przeciwjądrowych, zarówno w próbkach krwi, jak i w wycinkach skóry. Nie wykazano również związku pomiędzy mianem ANA a wiekiem chorych, czy długością trwania choroby (danych tych nie ujęto w wynikach). Wydaje się zatem, że pomimo nacisku na wykonywanie takich badań, ocena przeciwciał przeciwjądrowych w już zdiagnozowanej morfeii ma ograniczoną wartość poznawczą. Skoro miana ANA nie korelują z aktywnością, rozległością zmian, długością trwania choroby, czy też wiekiem chorych, to brak korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a mianem ANA nie jest zaskoczeniem.

Z drugiej strony należy pamiętać, iż analizy korelacji dokonano na podstawie oceny niespecyficzných przeciwciał przeciwjądrowych. Pomimo że użyty zestaw do oceny przeciwciał przeciwjądrowych pozwalał na pewne sprecyzowanie ich specyficzności, to jednak nie umożliwiał wykonania ilościowej analizy konkretných przeciwciał. Analiza miana możliwa była tylko dla wszystkich przeciwciał przeciwjądrowych łącznie. Co gorsza, ze wszystkich opisanych przeciwciał swoistých dla morfeii, użyty w badaniach zestaw umożliwiał tylko na wyodrębnienie przeciwciał przeciw histonom. Być może specyficzna analiza przeciwciał na przykład przeciw topoizomerazie II lub dysmutazie ponadtlenkowej miedziowo-cynkowej pozwoliłaby na uzyskanie bardziej wartościowych wyników.

Otrzymane wyniki nie pozwalają na jednoznaczną ocenę zależności pomiędzy aktywnością transkrypcyjną sekwencji HERV a mianem przeciwciał przeciwwjądrowych. Z jednej strony niewielki wydaje się być związek miana tak szerokiego spektrum przeciwciał z morfeą. Z drugiej, same powiązania aktywności transkrypcyjnej HERV z morfeą, jak pokazują wyniki, nie są tak silne jak zakładano.

7.5.2 Ocena korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a wskaźnikiem LoSSI

W zdecydowanej większości przypadków nie znaleziono żadnych statystycznie istotnych korelacji w kontekście nasilenia zmian skórnych. Tylko w przypadku sekwencji HERV-W env wykazano obecność ujemnej korelacji pomiędzy poziomem aktywności transkrypcyjnej w PBMC a wskaźnikiem LoSSI. Innymi słowy u chorych z większymi objawami ekspresja HERV-W env spada.

Znajduje to potwierdzenie w statystycznie istotnej różnicy w ekspresji HERV-W env pomiędzy pacjentami z aktywną, a nieaktywną formą choroby. Pacjenci z formą aktywną wykazywali mniejszą ekspresję (tabela 6.15 i 6.17). Co więcej, u osób zdrowych poziom ekspresji HERV-W env jest, jak już wspomniano, statystycznie istotnie niższy niż u osób chorych na morfeę, a zatem najwyższego poziomu aktywności transkrypcyjnej można się spodziewać u osób chorych z niewielkimi objawami lub/i nieaktywną formą choroby, ale nie u osób zdrowych i, co niezwykle zastanawiające, z bardziej zaawansowanymi klinicznie postaciami choroby. Fakt ten trudno jednoznacznie wyjaśnić. Gdyby ekspresja HERV-W env korelowała z długością trwania choroby, można by potwierdzić hipotezę, że do jej podwyższenia dochodzi tylko we wczesnych stadiach choroby.

Z drugiej strony, w skórze sytuacja taka nie ma miejsca, gdyż nie stwierdzono statystycznie istotnej korelacji. Jak już wspomniano, wykazana w skórze różnica w ekspresji HERV-W env nie jest bezsprzecznie przekonywująca, a tego właśnie się spodziewano. Wydaje się zatem, że zmiany chorobowe w skórze nie mają bezpośrednio przełożenia na lokalną ekspresję HERV-W env, natomiast pośrednio mogą indukować zmiany ekspresji znalezione we krwi.

Nieobecność innych korelacji w PBMC świadczyć może o braku związku nasilenia choroby na ekspresję HERV. Brak omawianych korelacji w skórze był wynikiem spodziewanym, ponieważ wycinki były tylko fragmentem chorobowo zmienionej skóry, a wskaźnik LoSSI zależy od wielkości i położenia zajętych obszarów.

7.5.3 Ocena korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a długością trwania choroby

Ponieważ morfeę cechuje generalnie dobre rokowanie, brak korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a długością trwania choroby nie jest wynikiem nieoczekiwanym. Choroba ma charakter samoograniczający się, bez ogólnej tendencji do pogarszania się stanu zdrowia na przestrzeni lat [Dańczak-Pazdrowska A 2011]. Skoro zatem obecność HERV miała być w założeniu wskaźnikiem intensywności reakcji autoimmunizacyjnej, to brak takich korelacji jest raczej potwierdzeniem niewielkiego wpływu długości trwania choroby na stan zdrowia chorego.

7.5.4 Ocena korelacji pomiędzy ekspresją sekwencji HERV a wiekiem

W zdecydowanej większości przypadków nie stwierdzono korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną HERV a wiekiem, zarówno osób chorych na morfeę, jak i zdrowych.

W skórze wykazano słabą, dodatnią korelację pomiędzy wiekiem chorych a ekspresją HERV-H (env 62), z tym że poziom istotności statystycznej wyniósł $p=0,06$, czyli nieznacznie powyżej przyjętego progu 5%. Podobna sytuacja występuje w PBMC, gdzie prawdopodobieństwo braku korelacji wyniosło aż 10%. Jednocześnie, w grupie osób zdrowych nie wykazano takich zależności zarówno w PBMC ($r_s = 0,00$; $p = 0,98$), jak i w skórze ($r_s = 0,23$; $p = 0,46$).

Jak już wspomniano, wykazano silny spadek ekspresji HERV-H (env 62) w skórze, ale nie w PBMC. Oba te fakty mogą sugerować, że młodszy pacjenci chorzy na morfeę wykazują większy potencjał inhibicyjny tej sekwencji. Obecny stan wiedzy nie pozwala na odpowiedź na pytanie o przyczyny takiego zjawiska. Opisana korelacja najprawdopodobniej ma niewielką wartość poznawczą.

Drugim, niezwykle istotnym faktem jest zanik ujemnej korelacji między HERV-E pol a wiekiem w skórze. Należy jednak przypomnieć, że grupa kontrolna liczyła tylko trzynaście tkanek. Obecność tej korelacji u osób zdrowych, jak i jej zanik u chorych na morfeę, nie jest zrozumiała. Warto przypomnieć, iż różnica w aktywności transkrypcyjnej HERV-E pol pomiędzy osobami zdrowymi a chorymi na morfeę nie była istotna statystycznie, zatem utracie korelacji z wiekiem w morfeji nie towarzyszy ogólny wzrost lub spadek ekspresji. W dostępnej literaturze nie znaleziono danych na ten temat, a uzyskane wyniki wartę są dalszych badań.

Ogólna tendencja do braku korelacji ekspresji HERV z wiekiem jest

wynikiem spodziewanym. Podobnie jak w przypadku płci, dobór grup badawczych pod względem wieku jest tutaj niezwykle istotnym problemem. Otrzymane wyniki stanowią silną przesłankę, że grupy, pomimo iż ich średnie wieku nie pokrywały się idealnie, dobrane były z wystarczającą dbałością.

7.6 Ocena doboru genu referencyjnego

GAPDH jest jednym z najczęściej wykorzystywanych oraz ewaluowanych genów referencyjnych w badaniach real-time PCR, stąd największa ilość uwag krytycznych odnośnie jego stosowania. Ponieważ nie było możliwości oceny stabilności genu referencyjnego przed przystąpieniem do badań, wybór podyktowany był wskazaniem opisanymi w literaturze. Wzięto pod uwagę zarówno korzyści jak i wady wyboru genu *GAPDH*, bazując na wynikach badań, wykorzystujących zbliżone tematycznie metody [Zainuddin A i wsp. 2008][Turabelidze A i wsp. 2010][Oliveira JG i wsp. 1999].

W przypadku krwi, najłatwiejszą metodą oceny stabilności genu referencyjnego jest odniesienie ekspresji do wejściowej ilości komórek. Jak już wspomniano, opracowanie takie dla badań HERV w chorobach tkanki łącznej dla PBMC zostało wykonane, a skuteczność użycia genu *GAPDH* jako punktu odniesienia - potwierdzona [Namysł J 2006].

W przypadku wycinków skóry zastanawiający jest fakt, że również inne oznaczenia, prowadzone w tym samym laboratorium przy użyciu *GAPDH* jako genu referencyjnego, mają tendencję do generowania wyników obniżonych w skórze chorobowo zmienionej. Tyczy się to łuszczycy [Szramka-Pawlak B i wsp. – w przygotowaniu], atopowego zapalenia skóry [Walkowiak H i wsp – dane w opracowaniu], jak i samej morfeji [Dańczak-Padrowska A 2011][Dańczak-Padrowska A i wsp. 2012].

Wydaje się jednak, że wybór był trafny w przypadku niniejszego opracowania. Po pierwsze zanotowano jeden bardzo silny wzrost ekspresji w skórze (HERV-K env), zatem nie wszystkie poziomy aktywności transkrypcyjnej są względem *GAPDH* obniżone. Po drugie spadek ekspresji HERV-R (ERV-3) pol-env da się wyjaśnić zmniejszoną liczbą gruczołów łojowych. Mimo wszystko, tendencja do spadków, zarówno tych statystycznie istotnych, jak i tych o mniejszej sile, jest zastanawiająca, dlatego autor sugeruje zastosowanie w przyszłych badaniach pewnych ulepszeń w procedurze normalizacji.

W przypadku skóry w zasadzie niemożliwe jest oszacowanie ilości komórek w skórze z zadowalającą dokładnością, zwłaszcza że w badaniu zmieniać będzie się jej twardość. Pozostają zatem dwie możliwości.

Jedną z opcji jest standaryzacja masy pobieranej biopsji. W przypadku niniejszego badania ilość skóry, z której izolowano RNA podlegała pewnym wahaniom, co przekładało się na ilość izolowanego materiału (tabela 6.1). W celu standaryzacji masy należy pobierać wycinki sztancą, co pozwala na pobranie wycinków o zbliżonych rozmiarach. Równocześnie wycinki są nieco większe, co umożliwia uzyskanie większej ilości RNA, a co za tym idzie wykonanie oznaczeń na większej ilości genów. Niestety wycinki o większej masie są bardziej okaleczające. Chociaż pobieranie większych wycinków skóry chorobowo zmienionej od osób chorych można dość łatwo usprawiedliwić, to jednak takie badanie u osób zdrowych niesie za sobą wątpliwości natury etycznej, nawet pomimo zgody tych osób na wykonanie badań.

Innym rozwiązaniem jest normalizacja ekspresji oznaczanych genów nie względem pojedynczego genu referencyjnego, lecz względem współczynnika obliczanego na podstawie ekspresji więcej niż jednego takiego genu. Geny te w miarę możliwości powinny znajdować się na różnych chromosomach i nie powinny być bezpośrednio ze sobą powiązane w tym samym procesie metabolicznym. Umożliwia to

minimalizację ewentualnych fluktuacji, jeśli poziom ekspresji jednego z genów referencyjnych, w kontekście zmiennej niezależnej eksperymentu, byłby zbyt wysoki. Liczba genów referencyjnych, ze względów praktycznych, oscyluje najczęściej między dwa i cztery [Bjerregaard H 2011][Mehta R 2010].

7.7 Podsumowanie uzyskanych wyników

Badania nad ludzkimi endogennymi sekwencjami retrowirusowymi stają się coraz bardziej rozpowszechnione. Poddaje się im coraz większą liczbę sekwencji, a skala tych badań nieustannie rośnie. Nie dotyczą już one tylko głównych dziedzin skupiających się na HERV, takich jak onkogeneza, embriogeneza ssaków, czy genomika, lecz rozprzestrzeniają się również na inne pola, takie jak immunologia czy dermatologia.

Przeprowadzone badania były pierwszą, szeroko zakrojoną próbą określenia istotności wpływu ludzkich endogennych retrowirusów na przebieg morfeji, mającą na celu wskazanie najważniejszych punktów wyjścia do dalszych badań oraz kierunków, które nie wydają się być wartymi dalszej eksploracji.

Uzyskane wyniki wskazują na ogólne tendencje wzrostowe aktywności transkrypcyjnych badanych ludzkich endogennych sekwencji retrowirusowych w PBMC oraz spadkowe w skórze, z pewnymi wyjątkami po obu stronach. Jednocześnie udało się precyzyjnie ustalić poziomy aktywności transkrypcyjnej wszystkich badanych sekwencji HERV. Główny cel badania został zatem całkowicie osiągnięty.

Wspomniane tendencje do wzrostu aktywności transkrypcyjnych badanych ludzkich endogennych sekwencji retrowirusowych w PBMC mogą odzwierciedlać podwyższony poziom aktywności tych komórek, wywołany zaistniałym stanem zapalnym. Z drugiej strony obniżona

transkrypcja w skórze może prowadzić do wniosku, że aktywność HERV w morfei, zwłaszcza rodzin HERV-E i HERV-H, nie stanowi ryzyka onkogenego. Wyjątek stanowi sekwencja HERV-K env, intensywnie badana w kontekście raka piersi, której ekspresja w skórze osób chorych na morfeę jest wyraźnie podwyższona.

Chociaż nie da się przecenić wagi badań nad HERV, wpływ endogennych wirusów na ludzkie schorzenia ma swoje granice. Morfea wydają się należeć do grona chorób o podłożu autoimmunizacyjnym, w których wpływ HERV nie jest już taki oczywisty. Chociaż wykazano wiele różnic w poziomie transkrypcji sekwencji HERV pomiędzy osobami chorymi a zdrowymi, dane te mówią nam niewiele o etiopatogenezie choroby, a skala tych różnic, choć w wielu przypadkach istotna statystycznie, nie jest wielka.

Analiza korelacji aktywności transkrypcyjnej HERV z mianem przeciwciał przeciwjądrowych, wskaźnikiem LoSSI, wiekiem osób objętych badaniem i długością trwania choroby, a także różnic aktywności pomiędzy płciami oraz pomiędzy grupami z aktywną i nieaktywną formą choroby, poza kilkoma wyjątkami, nie wskazuje na istnienie istotnych zależności. Pomimo nieuzyskania zadowalającej liczby statystycznie istotnych wyników, drugi cel badania również został osiągnięty.

Analiza real-time PCR nie pozwala na rozróżnienie przyczyn od skutków wykrytych wzorców ekspresji, ale pozwala na wskazanie interesujących punktów wyjścia do dalszych badań. Ponieważ udało się wskazać kilka takich zagadnień, pod tym względem cel badania również został osiągnięty.

Autor niniejszego opracowania zdaje sobie sprawę, iż wykryte zależności, takie jak wzrost aktywności ekspresyjnej HERV-K env w chorobowo zmienionej skórze, wymagają wyjaśnienia i na dzień dzisiejszy nie dają odpowiedzi na najważniejsze pytanie o mechanizm zależności HERV w morfei.

Opracowanie skutecznego protokołu izolacji RNA z biopsji ludzkiej skóry było niewątpliwym sukcesem niniejszego badania. Protokół ten pozwala na skuteczną analizę ekspresji prawie dowolnych genów w skórze, stąd ostatni cel badania również został osiągnięty.

8. Wnioski

1. Wydaje się, że zarówno wzrost aktywności transkrypcyjnej badanych sekwencji HERV-K env, HERV-R pol-env oraz HERV-W env, jak i spadek aktywności transkrypcyjnej HERV-E pol w PBMC u chorych na morfeę mają charakter regulacyjny. Podobnie w skórze osób chorych na morfeę, wykazane spadki aktywności transkrypcyjnej HERV-H (env 62), HERV-K10 gag, HERV-R pol-env oraz HERV-W env, jak i wzrost aktywności transkrypcyjnej HERV-K env mają raczej regulacyjny charakter.
2. Nie ma związku pomiędzy aktywnością transkrypcyjną badanych sekwencji HERV a wiekiem osób chorych na morfeę, długością trwania choroby, wskaźnikiem LoSSI, płcią oraz aktywnością choroby. Wyjątek stanowi badana sekwencja HERV-W env, której aktywność transkrypcyjna powiązana jest z aktywnością choroby i wskaźnikiem LoSSI w PBMC.
3. Nie ma związku pomiędzy aktywnością transkrypcyjną badanych sekwencji HERV a mianem oznaczanych przeciwciał przeciwjądrowych.
4. Opracowana własna, oryginalna metoda izolacji RNA z wycinków ludzkiej skóry umożliwia badania HERV oraz innych genów metodą real-time PCR.

9. Piśmiennictwo

- 1 **Adelman MK, Marchalonis JJ.** Endogenous retroviruses in systemic lupus erythematosus: candidate lupus viruses. *Clin Immunol.* 2002; 102(2): 107-16.
- 2 **Andersson AC, Merza M, Venables P i wsp.** Elevated levels of the endogenous retrovirus ERV3 in human sebaceous glands. *J Invest Dermatol.* 1996; 106(1): 125-8.
- 3 **Andersson AC, Yun Z, Sperber GO i wsp.** ERV3 and related sequences in humans: structure and RNA expression. *J Virol.* 2005; 79(14): 9270-84.
- 4 **Ariza ME, Williams MV.** A human endogenous retrovirus K dUTPase triggers a TH1, TH17 cytokine response: does it have a role in psoriasis? *J Invest Dermatol.* 2011; 131(12): 2419-27.
- 5 **Arkachaisri T, Pino S.** Localized scleroderma severity index and global assessment: a pilot study of outcome instruments. *J. Rheumatol.* 2008; 35(4): 650-7.
- 6 **Asano Y, Ihn H, Kubo M i wsp.** Clinical significance of serum matrix metalloproteinase-13 levels in patients with localized scleroderma. *Clin Exp Rheumatol.* 2006; 24(4): 394-9.
- 7 **Bakst R, Kovarik C, Werth VP.** A case of localized scleroderma in a sculptor and his wife. *J Clin Rheumatol.* 2009; 15(8): 399-401.
- 8 **Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ.** GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics.* 2005; 21(3): 389-95.
- 9 **Belshaw R, Pereira V, Katzourakis A i wsp.** Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(14): 4894-9.
- 10 **Bessis D, Molès JP, Basset-Séguin N i wsp.** Differential expression of a human endogenous retrovirus E transmembrane envelope glycoprotein in normal, psoriatic and atopic dermatitis human skin. *Br J Dermatol.* 2004; 151(4): 737-45.
- 11 **Bittner JJ.** Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science.* 1936; 84(2172): 162.
- 12 **Bjerregaard B, Holck S, Christensen IJ, Larsson LI.** Syncytin is involved in breast cancer-endothelial cell fusions. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63(16): 1906-11.

-
- 13 **Bjerregaard H, Pedersen S, Kristensen SR, Marcussen N.** Reference genes for gene expression analysis by real-time reverse transcription polymerase chain reaction of renal cell carcinoma. *Diagn Mol Pathol.* 2011; 20(4): 212-7.
- 14 **Blackburn P.** Ribonuclease inhibitor from human placenta: rapid purification and assay. *J Biol Chem.* 1979; 254(24): 12484-7.
- 15 **Blond JL, Besème F, Duret L i wsp.** Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol.* 1999; 73(2): 1175-85.
- 16 **Blond JL, Lavillette D, Cheynet V i wsp.** An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol.* 2000; 74(7): 3321-9.
- 17 **Bonnet-Duquennoy M, Abaibou H, Tailhardat M i wsp.** Study of housekeeping gene expression in human keratinocytes using OLISA, a long-oligonucleotide microarray and q RT-PCR. *Eur J Dermatol.* 2006; 16(2): 136-40.
- 18 **Brinckmann J, Neess CM, Gaber Y i wsp.** Different pattern of collagen cross-links in two sclerotic skin diseases: lipodermatosclerosis and circumscribed scleroderma. *J Invest Dermatol.* 2001; 117(2): 269-73.
- 19 **Brown DM.** A brief history of oligonucleotide synthesis. *Methods Mol Biol.* 1993; 20: 1-17.
- 20 **Burmeister T, Ebert AD, Pritze W i wsp.** Insertional polymorphisms of endogenous HERV-K113 and HERV-K115 retroviruses in breast cancer patients and age-matched controls. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004; 20(11): 1223-9.
- 21 **Bustin SA.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000; 25(2): 169-93.
- 22 **Chantawibul S, Anuwong A, Leelawat K.** Validation of appropriate reference genes for gene expression studies in human thyroid gland using real-time RT-PCR. *J Med Assoc Thai.* 2012; 95 suppl. 3: S36-40.
- 23 **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162(1): 156-9.
- 24 **Chomczynski P.** A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 1993; 15(3): 532-4, 536-7.
-

- 25 **Christen-Zaech S, Hakim MD, Afsar FS i wsp.** Pediatric morphea (localized scleroderma): review of 136 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2008; 59(3): 385-96.
- 26 **Christensen T.** Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev Med Virol.* 2005; 15(3): 179-211.
- 27 **Clark P, Eichhorn GL.** A predictable modification of enzyme specificity. Selective alteration of DNA bases by metal ions to promote cleavage specificity by deoxyribonuclease. *Biochemistry.* 1974; 13(25): 5098-102.
- 28 **Clausen J.** Endogenous retroviruses and MS: using ERVs as disease markers. *Int MS J.* 2003; 10(1): 22-8.
- 29 **Colomé-Grimmer MI, Payne DA, Tyring SK, Sánchez RL.** *Borrelia burgdorferi* DNA and *Borrelia hermsii* DNA are not associated with morphea or lichen sclerosus et atrophicus in the southwestern United States. *Arch Dermatol.* 1997; 133(9): 1174.
- 30 **Colver GB, Rodger A, Mortimer PS i wsp.** Post-irradiation morphoea. *Br J Dermatol.* 1989; 120(6): 831-5.
- 31 **Dańczak-Pazdrowska A.** Znaczenie interleukiny-17a i wybranych cytokin w patomechanizmie morfeji. Katedra i Klinika Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Rozprawa habilitacyjna. 2011.
- 32 **Dańczak-Pazdrowska A, Kowalczyk MJ, Szramka-Pawlak B i wsp.** Interleukin-1B in morphea. *Centr Eur J Immunol.* 2012; 37(3): 247-252.
- 33 **Denton CP, Abraham DJ.** Transgenic analysis of scleroderma: understanding key pathogenic events in vivo. *Autoimmun Rev.* 2004; 3(4): 285-93.
- 34 **Dolei A, Serra C, Mameli G i wsp.** Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. *Neurology.* 2002; 58(3): 471-3.
- 35 **Eisenberg E, Levanon EY.** Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet.* 2003; 19(7): 362-5.
- 36 **Feng WJ, Frost AR, Johanning GL i wsp.** Expression of Human Endogenous Retrovirus K Envelope Transcripts in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(6): 1553-60.
- 37 **Foerster J, Nolte I, Junge J i wsp.** Haplotype sharing analysis identifies a retroviral dUTPase as candidate susceptibility gene for psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2005; 124(1): 99-102.
- 38 **Förster T.** Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik.* 1948; 437: 55-75.

- 39 **Gaudin P, Ijaz S, Tuke PW i wsp.** Infrequency of detection of particle-associated MSRV/HERV-W RNA in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2000; 39(9): 950-4.
- 40 **Gillis AJ, Schuller AP, Skordalakes E.** Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT. *Nature*. 2008; 455(7213): 633-7.
- 41 **Gimenez J, Montgiraud C, Pichon JP i wsp.** Custom human endogenous retroviruses dedicated microarray identifies self-induced HERV-W family elements reactivated in testicular cancer upon methylation control. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38(7): 2229-46.
- 42 **Goedert JJ, Sauter ME, Jacobson LP i wsp.** High prevalence of antibodies against HERV-K10 in patients with testicular cancer but not with AIDS. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999; 8(4 Pt 1): 293-6.
- 43 **Grant SF, Kristjánssdóttir H, Steinsson K i wsp.** Long PCR detection of the C4A null allele in B8-C4AQ0-C4B1-DR3. *J Immunol Methods*. 2000; 244(1-2): 41-7.
- 44 **Gupta RA, Fiorentino D.** Localized scleroderma and systemic sclerosis: is there a connection? *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007; 21(6): 1025-36.
- 45 **Hayakawa I, Hasegawa M, Takehara K, Sato S.** Anti-DNA topoisomerase IIalpha autoantibodies in localized scleroderma. *Arthritis Rheum*. 2004; 50(1): 227-32.
- 46 **Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM.** Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996; 6(10): 986-94.
- 47 **Helmbold P, Fiedler E, Fischer M, Marsch WCh.** Hyperplasia of dermal microvascular pericytes in scleroderma. *J Cutan Pathol*. 2004; 31(6): 431-40.
- 48 **Herrmann T, Günther C, Csere P.** Localized morphea--a rare but significant secondary complication following breast cancer radiotherapy. Case report and review of the literature on radiation reaction among patients with scleroderma/morphea. *Strahlenther Onkol*. 2009; 185(9): 603-7.
- 49 **Hervé CA, Forrest G, Löwer R, i wsp.** Conservation and loss of the ERV3 open reading frame in primates. *Genomics*. 2004; 83(5): 940-3.
- 50 **Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH.** Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88(16): 7276-80.

- 51 **IHGSC - International Human Genome Sequencing Consortium (praca zbiorowa)**. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 409(6822): 860-921.
- 52 **IHGSC - International Human Genome Sequencing Consortium (praca zbiorowa)**. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004; 431(7011): 931-45.
- 53 **Jabłońska S, Majewski S**. Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową. Wyd. 1. s. 299. Warszawa: PZWL; 2008.
- 54 **Jimenez SA, Hitraya E, Varga J**. Pathogenesis of scleroderma. *Collagen. Rheum Dis Clin North Am*. 1996; 22(4): 647-74.
- 55 **Junowicz E, Spencer JH**. Studies on bovine pancreatic deoxyribonuclease A. I. General properties and activation with different bivalent metals. *Biochim Biophys Acta*. 1973;312(1): 72-84.
- 56 **Kainz P**. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1494(1-2): 23-7.
- 57 **Kato N, Pfeifer-Ohlsson S, Kato M i wsp.** Tissue-specific expression of human provirus ERV3 mRNA in human placenta: two of the three ERV3 mRNAs contain human cellular sequences. *J. Virol*. 1987; 61(7): 2182-91.
- 58 **Kim DH, Lee KR, Kim TY i wsp.** Coexistence of lichen sclerosus with morphea showing bilateral symmetry. *Clin. Exp. Dermatol*. 2009; 34(7): 416-8.
- 59 **Kim H, Crow TJ, Hyun BH**. Assignment of the endogenous retrovirus HERV-R (ERV3) to human chromosome 7q11.2 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet*. 2000; 89(1-2): 10.
- 60 **Kirk TZ, Mark ME, Chua CC i wsp.** Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *J Biol Chem*. 1995; 270(7): 3423-8.
- 61 **Kowalczyk M, Gornowicz J, Szramka-Pawlak B i wsp.** Transcription of three HERV sequences in pemphigus vulgaris. 8th Congress of the Baltic Association of Dermatovenerologists; 17-19.09.2009; Wilno, Litwa. Książka Abstraktów. 2009: 75.
- 62 **Kowalczyk MJ, Szramka-Pawlak B, Żaba R, Silny W**. Downregulation of HERV-E pol gene in psoriasis vulgaris. 19th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology; 6-10.10.2010; Göteborg, Szwecja. 2010 **(A)**.
- 63 **Kowalczyk MJ, Szramka-Pawlak B, Żaba R, Silny W**. Upregulation of HERV-H env gene in psoriasis vulgaris. 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research (ESDR); 8-11.09.2010; Helsinki, Finlandia. 2010 **(B)**.

- 64 **Kowalczyk MJ, Dańczak-Pazdrowska A, Szramka-Pawlak B i wsp.** Expression of selected human endogenous retroviral sequences in skin and peripheral blood mononuclear cells in morphea. *Arch Med Sci.* 2012; 8(5): 819-825.
- 65 **Kreuter A, Krieg T, Worm M i wsp.** Diagnosis and therapy of localized scleroderma. *J. Detsch. Dermatol. Ges.* 2009; 7 suppl. 6: S1-S14.
- 66 **Kreuter A.** Localized scleroderma. *Dermatol Ther.* 2012; 25(2): 135-47.
- 67 **Kroft EB, Jong (de) EM, Evers AW.** Psychological distress in patients with morphea and eosinophilic fasciitis. *Arch Dermatol.* 2009; 145(9): 1017-22.
- 68 **Kunitz M.** Crystalline desoxyribonuclease; isolation and general properties; spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. *J Gen Physiol.* 1950; 33(4): 349-62.
- 69 **Lai OY, Chen H, Michaud HA i wsp.** Protective Effect of Human Endogenous Retrovirus K dUTPase Variants on Psoriasis Susceptibility. *J Invest Dermatol.* 2012; 132(7): 1833-40.
- 70 **Larsen JM, Christensen IJ, Nielsen HJ i wsp.** Syncytin immunoreactivity in colorectal cancer: potential prognostic impact. *Cancer Lett.* 2009; 280(1): 44-9.
- 71 **Lee LG, Livak KJ, Mullah B i wsp.** Seven-color, homogeneous detection of six PCR products. *Biotechniques.* 1999; 27(2): 342-9.
- 72 **Leutenegger CM.** The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine. *Vet SciTomorrow.* 2001; 1: 1-15.
- 73 **Lever WF, Schaumburg-Lever G.** Histopathology of the skin. Wyd. 7. s. 514. USA. Lippincott Company; 1990.
- 74 **Li JM, Fan WS, Horsfall AC i wsp.** The expression of human endogenous retrovirus-3 in fetal cardiac tissue and antibodies in congenital heart block. *Clin Exp Immunol.* 1996; 104(3): 388-93.
- 75 **Lindahl T, Ljungquist S, Siebert W i wsp.** DNA N-glycosidases: properties of uracil-DNA glycosidase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1977; 252(10): 3286-94.
- 76 **Lindeskog M, Mager DL, Blomberg J.** Isolation of a human endogenous retroviral HERV-H element with an open env reading frame. *Virology.* 1999; 258(2): 441-50.
- 77 **Longo MC, Berninger MS, Hartley JL.** Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene.* 1990; 93(1): 125-8.

- 78 **Löwer R, Löwer J, Kurth R.** The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(11): 5177-84.
- 79 **Mackay IM, Arden KE, Nitsche A.** Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(6): 1292-305.
- 80 **Mackay IM (red.).** Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization. Norfolk, Wielka Brytania: Caister Academic Press; 2007.
- 81 **Mager DL, Henthorn PS.** Identification of a retrovirus-like repetitive element in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81(23): 7510-4.
- 82 **Man XY, Finnson KW, Baron M, Philip A.** CD109, a TGF-beta co-receptor, attenuates extracellular matrix production in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 2012; 14(3): R144.
- 83 **Mangeny M, Parseval (de) N, Thomas G, Heidmann T.** The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. *J Gen Virol*. 2001; 82(Pt 10): 2515-8.
- 84 **Mattila L, Airola K, Ahonen M i wsp.** Activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 1998; 110(4): 416-21.
- 85 **Mayer J, Meese EU.** Presence of dUTPase in the various human endogenous retrovirus K (HERV-K) families. *J Mol Evol*. 2003; 57(6): 642-9.
- 86 **McCarthy EM, McDonald JF.** Long terminal repeat retrotransposons of *Mus musculus*. *Genome Biol*. 2004; 5(3): R14.
- 87 **Mehta R, Birerdinc A, Hossain N i wsp.** Validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis of human visceral adipose samples. *BMC Mol Biol*. 2010; 11: 39.
- 88 **Mi S, Lee X, Li X i wsp.** Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*. 2000; 403(6771): 785-9.
- 89 **Molès JP, Tesniere A, Guilhou JJ.** A new endogenous retroviral sequence is expressed in skin of patients with psoriasis. *Br J Dermatol*. 2005; 153(1): 83-9.
- 90 **Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT.** Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 1998; 24(6): 954-8, 960, 962.
- 91 **Muir A, Lever A, Moffett A.** Expression and functions of human endogenous retroviruses in the placenta: an update. *Placenta*. 2004; 25 suppl. A: S16-25.

- 92 **Mullis K, Faloona F, Scharf S i wsp.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986; 51 Pt 1: 263-73.
- 93 **Murrell DF.** A radical proposal for the pathogenesis of scleroderma. *J Am Acad Dermatol.* 1993; 28(1): 78-85.
- 94 **Nagai M, Hasegawa M, Takehara K, Sato S.** Novel autoantibody to Cu/Zn superoxide dismutase in patients with localized scleroderma. *J Invest Dermatol.* 2004; 122(3): 594-601.
- 95 **Namysł J, Osmola A, Prokop J†.** Human endogenous retroviruses sequences expression in patients with progressive systemic sclerosis and different clinical forms of psoriasis. *Post Dermatol Alergol.* 2005; 22(2): 99-10.
- 96 **Namysł J.** Identyfikacja i analiza ekspresji endogennych sekwencji retrowirusowych oraz genów kodujących wybrane cytokiny i ich receptory w przebiegu twardziny układowej i różnych odmianach klinicznych łuszczycy. Katedra i Klinika Dermatologii Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Rozprawa doktorska. 2006.
- 97 **Nelson PN, Carnegie PR, Martin J i wsp.** Demystified. Human endogenous retroviruses. *Mol Pathol.* 2003; 56(1): 11-8.
- 98 **Nelson PN, Hooley P, Roden D i wsp.** Human endogenous retroviruses: transposable elements with potential? *Clin Exp Immunol.* 2004; 138(1): 1-9.
- 99 **Nelson P, Davari-Ejtehadi H, Nevill A, Bowman S.** Endogenous retrovirus ERV-3 is not implicated in rheumatoid arthritis but may provide a biomarker for osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2010; 37(2): 473.
- 100 **Nishioka S.** Histological comparison of morphea and lichen sclerosus et atrophicus. *Kurume Med J.* 1997; 44(2): 83-90.
- 101 **Ogasawara H, Naito T, Kaneko H i wsp.** Quantitative analyses of messenger RNA of human endogenous retrovirus in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2001; 28(3): 533-8.
- 102 **Oliveira JG, Prados RZ, Guedes AC i wsp.** The housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is inappropriate as internal control in comparative studies between skin tissue and cultured skin fibroblasts using Northern blot analysis. *Arch Dermatol Res.* 1999; 291(12): 659-61.
- 103 **Ono M, Yasunaga T, Miyata T, Ushikubo H.** Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol.* 1986; 60(2): 589-98.

-
- 104 **Otowa T, Tochigi M, Rogers M i wsp.** Insertional polymorphism of endogenous retrovirus HERV-K115 in schizophrenia. *Neurosci Lett.* 2006; 408(3): 226-9.
- 105 **Pačes J, Pavlíček A, Pačes V.** HERVd: database of human endogenous retroviruses. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(1): 205-6.
- 106 **Parseval (de) N, Casella J, Gressin L, Heidmann T.** Characterization of the three HERV-H proviruses with an open envelope reading frame encompassing the immunosuppressive domain and evolutionary history in primates. *Virology.* 2001; 279(2): 558-69.
- 107 **Parseval (de) N, Lazar V, Casella JF i wsp.** Survey of human genes of retroviral origin: identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins. *J Virol.* 2003; 77(19): 10414-22.
- 108 **Perron H, Garson JA, Bedin F, i wsp.** Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(14): 7583-8.
- 109 **Peterson LS, Nelson AM, Su WP.** Classification of morphea (localized scleroderma). *Mayo Clin Proc.* 1995; 70(11): 1068-76.
- 110 **Peterson LS, Nelson AM, Su WP i wsp.** The epidemiology of morphea (localized scleroderma) in Olmsted County 1960-1993. *J Rheumatol.* 1997; 24(1): 73-80.
- 111 **Pfaffl MW.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(9): e45.
- 112 **Pfaffl MW.** Quantification strategies in real-time PCR. W: **Bustin SA (red.).** A-Z of quantitative PCR. La Jolla, USA: International University Line (IUL); 2004.
- 113 **Portis JL.** Perspectives on the role of endogenous human retroviruses in autoimmune diseases. *Virology.* 2002; 296(1): 1-5.
- 114 **Price PA.** The essential role of Ca²⁺ in the activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease. *J Biol Chem.* 1975; 250(6): 1981-6.
- 115 **Prokop J, Jagodzinski PP.** Identification of retroviral conserved pol sequences in serum of mixed connective tissue disease and systemic sclerosis patients. *Biomed Pharmacother.* 2004; 58(1): 61-4.
- 116 **Repaske R, Steele PE, O'Neill RR i wsp.** Nucleotide sequence of a full-length human endogenous retroviral segment. *J Virol.* 1985; 54(3): 764-72.
- 117 **Reynier F, Verjat T, Turrel F i wsp.** Increase in human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) viral load in active rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.* 2009; 70(3): 295-9.
-

- 118 **Riemer AB, Keskin DB, Reinherz EL.** Identification and validation of reference genes for expression studies in human keratinocyte cell lines treated with and without interferon- γ - a method for qRT-PCR reference gene determination. *Exp Dermatol.* 2012; 21(8): 625-9.
- 119 **Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT.** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1997; 245(2): 154-60.
- 120 **Roche Applied Science.** Increase The Power And Sensitivity For Your cDNA Synthesis with the New Transcriptor Reverse Transcriptase. *Biochemica.* 2003; 4: 17-19.
- 121 **Rote NS, Chakrabarti S, Stetzer BP.** The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. *Placenta.* 2004; 25(8-9): 673-83.
- 122 **Sallamand C, Miscioscia A, Lartia R, Defrancq E.** Phosphorylating reagent-free synthesis of 5'-phosphate oligonucleotides by controlled oxidative degradation of their 5'-end. *Org Lett.* 2012; 14(8): 2030-3.
- 123 **Sambrook J, Russell DW.** *The Condensed Protocols from Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Nowy Jork, USA: CSHL Press; 2006.
- 124 **Santin AP, Souza AF, Brum LS, Furlanetto TW.** Validation of Reference Genes for Normalizing Gene Expression in Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR in Human Thyroid Cells in Primary Culture Treated with Progesterone and Estradiol. *Mol Biotechnol.* Wydanie elektroniczne 06.06.2012; (w druku).
- 125 **Sauter M, Schommer S, Kremmer E i wsp.** Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *J Virol.* 1995; 69(1): 414-21.
- 126 **Schanz S, Fierlbeck G, Ulmer A i wsp.** Localized scleroderma: MR findings and clinical features. *Radiology.* 2011; 260(3): 817-24.
- 127 **Schoch R.** Q&A - A Conversation with Kerry Mullis. *California Monthly* (Berkeley, CA: California Alumni Association). 1994; 1(105): 20.
- 128 **Serra C, Mameli G, Arru G i wsp.** In vitro modulation of the multiple sclerosis (MS)-associated retrovirus by cytokines: implications for MS pathogenesis. *J Neurovirol.* 2003; 9(6): 637-43.
- 129 **Steele PE, Rabson AB, Bryan T, Martin MA.** Distinctive termini characterize two families of human endogenous retroviral sequences. *Science.* 1984; 225(4665): 943-7.

- 130 **Stephenson FH.** Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory. Wyd. 2. Londyn, Wielka Brytania: Academic Press (Elsevier); 2010.
- 131 **Strick R, Ackermann S, Langbein M i wsp.** Proliferation and cell-cell fusion of endometrial carcinoma are induced by the human endogenous retroviral Syncytin-1 and regulated by TGF-beta. *J Mol Med (Berl)*. 2007; 85(1): 23-38.
- 132 **Stryer L.** Biochemia. Wyd. 4. s. 136-138. Warszawa: PWN; 2000.
- 133 **Subramanian RP, Wildschutte JH, Russo C, Coffin JM.** Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. *Retrovirology*. 2011; 8: 90.
- 134 **Szramka-Pawlak B, Kowalczyk MJ, Walkowiak H i wsp.** Human endogenous retroviruses in psoriasis and possible interaction with herpes simplex infection. (w trakcie recenzji).
- 135 **Takehara K, Sato S.** Localized scleroderma is an autoimmune disorder. *Rheumatology (Oxford)*. 2005; 44(3): 274-9.
- 136 **Taruscio D, Florida G, Zoraqi GK i wsp.** Organization and integration sites in the human genome of endogenous retroviral sequences belonging to HERV-E family. *Mamm Genome*. 2002; 13(4): 216-22.
- 137 **Toledano C, Rabhi S, Kettaneh A i wsp.** Localized scleroderma: a series of 52 patients. *Eur J Intern Med*. 2009; 20(3): 331-6.
- 138 **Tomimura S, Ogawa F, Iwata Y i wsp.** Autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with localized scleroderma. *J Dermatol Sci*. 2008; 52(1): 47-54.
- 139 **Tristem M.** Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database. *J Virol*. 2000; 74(8): 3715-30.
- 140 **Turabelidze A, Guo S, DiPietro LA.** Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model. *Wound Repair Regen*. 2010; 18(5): 460-6.
- 141 **Turbeville MA, Rhodes JC, Hyams DM i wsp.** Expression of a putative immunosuppressive protein in human tumors and tissues. *Pathobiology*. 1996; 64(5): 233-8.
- 142 **Uziel Y, Feldman BM, Krafchik BR i wsp.** Increased serum levels of TGFbeta1 in children with localized scleroderma. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2007; 5: 22.
- 143 **VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM.** Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*. 2008; 44(5): 619-26.

-
- 144 **Vierra E, Cunningham BB.** Morphea and localized scleroderma in children. *Semin Cutan Med Surg.* 1999; 18(3): 210-25.
- 145 **Villesen P, Aagaard L, Wiuf C, Pedersen FS.** Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology.* 2004; 1: 32.
- 146 **Wang-Johanning F, Frost AR, Jian B i wsp.** Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene.* 2003; 22(10): 1528-35.
- 147 **Wiame I, Remy S, Swennen R, Sági L.** Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. *Biotechniques.* 2000; 29(2): 252-4, 256.
- 148 **Wienecke R, Schlüpen EM, Zöchling N i wsp.** No evidence for *Borrelia burgdorferi*-specific DNA in lesions of localized scleroderma. *J Invest Dermatol.* 1995; 104(1): 23-6.
- 149 **Xu RZ, Zheng S.** Identification of a novel human retroviral RNA genome associated with human chronic myeloid leukemia. *Praca nieopublikowana.* GenBank: AY208746.1, AAP06677.1; 2002.
- 150 **Yi JM, Kim HS.** Molecular phylogenetic analysis of the human endogenous retrovirus E (HERV-E) family in human tissues and human cancers. *Genes Genet Syst.* 2007; 82(1): 89-98.
- 151 **Zainuddin A, Makpol S, Chua KH i wsp.** GAPDH as housekeeping gene for human skin fibroblast senescent model. *Med J Malaysia.* 2008; 63 suppl. A: 73-4.
- 152 **Zulian F.** New developments in localized scleroderma. *Curr Opin Rheumatol.* 2008; 20(5): 601-7.
- 153 **Zwolińska K.** Sekwencje pochodzenia retrowirusowego w genomie człowieka. Ludzkie endogenne retrowirusy (HERV). *Postepy Hig Med Dosw.* 2006; 60: 637-52.

10. Streszczenie

„Ocena poziomu ekspresji wybranych ludzkich endogennych sekwencji retrowirusowych w twardzinie ograniczonej”

Morfea, zwana także twardziną ograniczoną (localized scleroderma), jest rzadko występującą chorobą, której głównym objawem jest nadmierne włóknienie skóry, prowadzące do jej stwardnienia. Choroba zaliczana jest do grupy chorób tkanki łącznej. Jej zasięg ograniczony jest w zasadzie tylko do skóry i struktur przylegających, w odróżnieniu od twardziny układowej, która charakteryzuje się zajęciem organów wewnętrznych, obecnością objawu Raynauda i zdecydowanie gorszym rokowaniem.

Ludzkie endogenne retrowirusy (HERV) są pozostałościami po dawnych retrowirusowych infekcjach komórek linii rozrodczych, przekazywanych w kolejnych pokoleniach i wielokrotnie powielanych.

Głównym celem pracy było ilościowe określenie aktywności transkrypcyjnej wybranych ludzkich endogennych sekwencji retrowirusowych, tj. HERV-E pol, HERV-H (env 62), HERV-K env, HERV-K10 gag, HERV-R pol-env oraz HERV-W env, w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej a także w skórze chorych na morfeę i porównanie jej z osobami zdrowymi.

Drugim celem była ocena korelacji aktywności wybranych sekwencji HERV, tj. HERV-E pol, HERV-H (env 62), HERV-K env, HERV-K10 gag, HERV-R pol-env oraz HERV-W env, w grupie chorych na morfeę z wiekiem badanych, długością trwania choroby, wskaźnikiem LoSSI oraz mianem przeciwciał przeciwjądrowych, a także różnic w tej aktywności pomiędzy płciami oraz pomiędzy grupami z aktywną i nieaktywną formą choroby.

Trzecim celem było opracowanie skutecznego protokołu oczyszczania RNA z wycinków ludzkiej skóry. Osiągnięcie tego celu, niezależnie od jakości pozostałych wyników, pozwoliłoby na przeprowadzanie innych badań na tym niezwykle wymagającym materiale.

Do badania jednojądrzastych komórek krwi obwodowej włączono 41 osób ze zdiagnozowaną morfeą (22 kobiety, 19 mężczyzn, ze średnią arytmetyczną wieku 44,1 lat). Grupę kontrolną stanowiło 47 zdrowych ochotników (35 kobiet, 12 mężczyzn, ze średnią arytmetyczną 33,0 lat).

Wycinki skóry z okolic chorobowo zmienionych zostały pobrane od 36 pacjentów chorych na morfeę (17 kobiet, 19 mężczyzn, ze średnią arytmetyczną 45,1 lat). Grupę kontrolną stanowiło 13 klinicznie zdrowych fragmentów skóry, pobranych od osób zdrowych oraz przy okazji zabiegów chirurgicznych (6 kobiet, 7 mężczyzn, ze średnią arytmetyczną wieku 52,0 lat).

Całkowite RNA izolowano przy użyciu zmodyfikowanego protokołu opisanego przez Chomczyńskiego i Sacchi, a następnie poddawano odwrotnej transkrypcji przy użyciu losowych starterów heksamerowych. W badaniach aktywności transkrypcyjnej posłużono się metodą real-time PCR, przy użyciu termocyklera Roche LightCycler 2.0 oraz systemu detekcji opartego na barwniku SYBR Green. Poziom aktywności HERV normalizowano względem aktywności transkrypcyjnej genu referencyjnego - GAPDH, a poprawność reakcji badano przy użyciu analizy temperatury topnienia amplikonu.

U chorych na morfeę dokonano również oznaczeń miana przeciwciał przeciwjądrowych ANA, oceny aktywności choroby oraz oceny nasilenia i rozległości zmian skórnych, przy użyciu wskaźnika LoSSI.

Na podstawie uzyskanych wyników wysunięto następujące wnioski:

1. Wydaje się, że zarówno wzrost aktywności transkrypcyjnej badanych sekwencji HERV-K env, HERV-R pol-env oraz HERV-W env, jak i spadek aktywności transkrypcyjnej HERV-E pol w PBMC u chorych na morfeę ma charakter regulacyjny. Podobnie w skórze osób chorych na morfeę, wykazane spadki aktywności transkrypcyjnej HERV-H (env 62), HERV-K10 gag, HERV-R pol-env oraz HERV-W env, jak i wzrost aktywności transkrypcyjnej HERV-K env mają raczej regulacyjny charakter.
2. Nie ma związku pomiędzy aktywnością transkrypcyjną badanych sekwencji HERV a wiekiem osób chorych na morfeę, długością trwania choroby, wskaźnikiem LoSSI, płcią oraz aktywnością choroby. Wyjątek stanowi badana sekwencja HERV-W env, której aktywność transkrypcyjna powiązana jest z aktywnością choroby i wskaźnikiem LoSSI w PBMC.
3. Nie ma związku pomiędzy aktywnością transkrypcyjną badanych sekwencji HERV a mianem oznaczanych przeciwciał przeciwjądrowych.
4. Opracowana własna, oryginalna metoda izolacji RNA z wycinków ludzkiej skóry umożliwia badania HERV oraz innych genów metodą real-time PCR.

11. Abstract

“Assessment of expression of selected human endogenous retroviral sequences in localized scleroderma”

Morphea, also known as localized scleroderma, is a rare disease whose main symptom is excessive skin fibrosis that leads to its hardening. Morphea is categorized as a connective tissue disease. It is limited only to skin and neighboring tissues, in contrast to systemic sclerosis, which is characterized by internal organ involvement, the presence of Raynaud's phenomenon and poorer prognosis.

Human endogenous retroviruses (HERV) are remnants of ancient germ line retroviral infections, passed down through generations and extensively multiplied.

The main goal of the study was to perform a quantitative measurement of transcriptional activity of selected HERV sequences, i.e., HERV-E pol, HERV-H (env 62), HERV-K env, HERV-K10 gag, HERV-R pol-env, and HERV-W env, in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and in skin biopsies and their comparison to healthy controls.

The second goal was the assessment of possible correlations between the transcriptional activities of those HERV sequences, i.e., HERV-E pol, HERV-H (env 62), HERV-K env, HERV-K10 gag, HERV-R pol-env, and HERV-W env, in morphea patients and age of subjects, length of the disease, LoSSI index, titers of anti-nuclear antibodies, as well as the assessment of differences in these activities between sexes and patients classified to groups of active and inactive forms of the disease.

The third goal was a formulation of an effective protocol for RNA

isolation from human skin biopsies. The achievement of this goal, notwithstanding the quality of other results, could allow for future RNA skin biopsy studies.

The studies on PBMC involved 41 diagnosed morphea patients (22 women, 19 men, mean age 44.1 years). The control group consisted of 47 healthy volunteers (35 women, 12 men, mean age 33.0 years).

The studies on skin biopsies involved 36 morphea patients (17 women, 19 men, mean age 45.1 years). The control group consisted of 13 clinically healthy skin fragments, acquired from healthy people along unrelated surgical procedures (6 women, 7 men, mean age 52.0 years).

Whole RNA was isolated with the use of a modified Chomczyński and Sacchi protocol, followed by reverse transcription with the use of random hexamer primers. The studies of transcriptional activities involved real-time PCR, based on SYBR Green detection and Roche LightCycler 2.0 thermocycler. The levels of HERV transcriptional activities were normalized to the GAPDH reference gene level, while the quality of amplified material was assessed with the melting curve analysis method.

The level of anti-nuclear antibodies, disease activity and LoSSI index were additionally assessed in morphea patients.

The following conclusions were drawn on the results of this study:

1. It appears that both the increase of transcriptional activity of HERV-K env, HERV-R pol-env, and HERV-W env, as well as the decrease of the transcriptional activity of HERV-E pol in PBMC among morphea patients appear to have a regulatory character. Similarly, the decrease of transcriptional activity of HERV-H (env 62), HERV-K10 gag, HERV-R pol-env, and HERV-W env, as well as the increase of transcriptional activity of HERV-K env apparently seem to be regulatory.

2. There is no relation between the transcriptional activity of the studied HERV and age of morphea patients, length of the disease, LoSSI index, sex and disease activity. HERV-W env is an exception as it was found to be related with disease activity and LoSSI index in PBMC.
3. There is no relation between the transcriptional activity of the studied HERV and titer of the assessed anti-nuclear antibodies.
4. The formulated original method of RNA isolation from human skin biopsies enables to study HERV and other genes with the use of real-time PCR method.