

Uniwersytet Medyczny w Poznaniu
Wydział Lekarski II
Katedra i Klinika Dermatologii



BEATA SZRAMKA-PAWLAK

**Ekspresja wybranych ludzkich endogennych sekwencji
retrowirusowych u chorych na łuszczycę w przebiegu
zakażenia
wirusami *herpes simplex***

PRACA DOKTORSKA WYKONANA
W KATEDRZE I KLINICE DERMATOLOGII
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W POZNANIU
PROMOTOR: PROF. DR HAB. N. MED. RYSZARD ŻABA

POZNAŃ 2012

Badania Finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu
badawczego nr N402 040 31/1276

Serdeczne podziękowania składam

Panu prof. dr hab. n. med. Ryszardowi Żabie

Promotorowi rozprawy
za cenne uwagi, opiekę i życzliwość

Pani dr hab. n. med. Aleksandrze Dańczak-Pazdrowskiej

i Pani dr n. med. Hannie Walkowiak
za pomoc w zbieraniu materiału badawczego

oraz

Panu prof. dr hab. n. med. Wojciechowi Silnemu

za umożliwienie realizacji pracy naukowej
w Katedrze i Klinice Dermatologii UM w Poznaniu.

SPIS TREŚCI

1. Wstęp.....	10
1.1. Łuszczyca.....	10
1.1.1. Informacje wstępne.....	10
1.1.2. Epidemiologia.....	11
1.1.3. Objawy choroby i podział.....	12
1.1.4. Powstawanie zmian.....	14
1.1.5. Podłoże genetyczne.....	15
1.1.6. Leczenie.....	16
1.1.7. Czynniki prowokujące manifestację choroby.....	17
1.2. Ludzkie endogenne retrowirusy.....	17
1.2.1. Informacje wstępne- elementy ruchome w genomie.....	17
1.2.2. Pochodzenie.....	18
1.2.3. Budowa i klasyfikacja.....	19
1.2.4. Potencjalny wpływ na funkcjonowanie organizmu.....	21
1.2.5. Charakterystyka analizowanych rodzin.....	24
1.2.5.1. Rodzina HERV-E.....	24
1.2.5.2. Rodzina HERV-H.....	25
1.2.5.3. Rodzina HERV-K.....	26
1.2.5.4. Rodzina HERV-R.....	27
1.2.5.5. Rodzina HERV-W.....	28
1.2.6. Regulacja ekspresji.....	28
2. Hipoteza badawcza.....	30
3. Cele pracy.....	31
4. Materiał i metody.....	32
4.1. Układ doświadczenia.....	32
4.2. Grupy badawcze.....	33
4.3. Procedura badań.....	33
4.4. Materiał badawczy.....	33
4.5. Izolacja RNA.....	34
4.6. Odwrotna transkrypcja.....	38
4.7. Analiza względnego poziomu transkryptów metodą real-time PCR.....	39
4.7.1. Wybór genu referencyjnego.....	41

4.7.2. Optymalizacja reakcji.....	41
4.7.3. Wyznaczanie krzywych kalibracyjnych.....	43
4.7.4. Real-time PCR.....	47
4.8. Badanie przeciwciał krążących IgM, IgG oraz IgA skierowanych przeciwko <i>herpes simplex 1/2</i>	49
4.9. Ocena stanu klinicznego.....	51
4.10. Statystyczna analiza danych.....	52
5. Wyniki.....	53
5.1. Statystyczny opis uzyskanych wyników.....	53
5.1.1. Charakterystyka grupy badanej oraz grup kontrolnych.....	53
5.1.2. Względny poziom transkryptów analizowanych sekwencji HERV.....	53
5.1.3. Obecność przeciwciał IgG, IgM oraz IgA anty-HSV.....	59
5.1.4. Nasilenie łuszczycy.....	62
5.2. Porównanie względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej.....	63
5.3. Porównanie względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji w skórze zmienionej chorobowo i pozornie zdrowej.....	64
5.4. Porównanie względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji w skórze pozornie zdrowej oraz w skórze zdrowej.....	64
5.5. Porównanie względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji w skórze zmienionej chorobowo oraz w skórze zdrowej.....	65
5.6. Porównanie względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej pomiędzy osobami o różnym przebiegu łuszczycy.....	66
5.7. Porównanie względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji pomiędzy osobami w różnych stadiach infekcji HSV chorych na łuszczycę.....	68
5.7.1. Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej.....	68
5.7.2. Skóra chorobowo zmieniona.....	69
5.7.3. Skóra pozornie zdrowa.....	69
5.8. Ocena zależności pomiędzy względnym poziomem transkryptów analizowanych sekwencji a nasileniem łuszczycy.....	74
Rozdział 6. Dyskusja.....	75

6.1. Dobór osób badanych.....	75
6.2. Aspekt metodyczny.....	76
6.2.1. Real-time PCR.....	76
6.2.2. Izolacja RNA.....	77
6.2.3. Gen referencyjny.....	78
6.3. Analiza względnego poziomu transkryptów wybranych sekwencji HERV.....	78
6.3.1. HERV-E.....	78
6.3.2. HERV-R.....	81
6.3.3. HERV-H.....	82
6.3.4. HERV-K.....	83
6.3.5. HERV-W.....	84
6.4. Różnice we względnym poziomie transkryptów HERV pomiędzy osobami w różnych stadiach zakażenia <i>herpes simplex</i>	86
6.5. Względny poziom transkryptów wybranych HERV a kliniczny przebieg łuszczycy.....	87
6.6. Podsumowanie.....	88
Rozdział 7. Wnioski.....	90
Literatura.....	91
Streszczenie.....	103
Abstract.....	106

SPIS RYCIN

Rycina 1.1.	Struktura sekwencji ludzkich endogennych retrowirusów	20
Rycina 4.1.	Układ doświadczenia	32
Rycina 4.2.	TissueLyser LT	35
Rycina 4.3.	Izolacja RNA wg procedury opracowanej przez Chomczyńskiego i Sacchi	36
Rycina 4.4.	Widmo absorpcji czystego preparatu RNA.	38
Rycina 4.5.	Krzywe wzrostu logarytmicznego oraz krzywe standardowe genu GAPDH, sekwencji HERV-E pol, HERV-R pol env, HERV-H	45
Rycina 4.6.	Krzywe wzrostu logarytmicznego oraz krzywe standardowesekwencji HERV-K10 gag, HERV-K env, HERV-E	46
Rycina 4.7.	Piki topnienia amplikonów analizowanych sekwencji	48
Rycina 4.8.	Reakcja barwna w teście ELISA	50
Rycina 5.1.	Przykładowy wyniki uzyskiwany w real-time PCR (krzywa amplifikacyjna oraz krzywe topnienia amplikonu dla sekwencji HERV-E (4-1)	55
Rycina 5.2.	Rozdział elektroforetyczny amplikonów analizowanych sekwencji w 1,5% żelu agarozowym	56
Rycina 5.3.	Średnie względne poziomy transkryptów badanych sekwencji HERV w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, skórze pozornie zdrowej oraz zmienionej chorobowo u osób chorych na łuszczycę.	59
Rycina 5.4.	Procentowy udział osób pozytywnych i negatywnych względem przeciwciał IgG anty-HSV w grupie badanej oraz kontrolnej	60
Rycina 5.5.	Procentowy udział osób pozytywnych i negatywnych względem przeciwciał IgM anty-HSV w grupie badanej oraz kontrolnej	60
Rycina 5.6.	Procentowy udział osób pozytywnych i negatywnych względem przeciwciał IgA anty-HSV w grupie badanej oraz kontrolnej	61
Rycina 5.7.	Liczebności grup osób w poszczególnych stadiach infekcji HSV w grupie badanej oraz kontrolnej	61
Rycina 5.8.	Procentowy udział osób o łagodnym, umiarkowanym oraz ciężkim przebiegu łuszczycy w grupie badanej	62
Rycina 5.9.	Porównanie względnego poziomu transkryptów badanych sekwencji HERV w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej pomiędzy osobami chorymi na łuszczycę oraz zdrowymi	63
Rycina 5.10.	Porównanie względnego poziomu transkryptów badanych sekwencji HERV pomiędzy skórą zmienioną chorobowo oraz pozornie zdrową osób chorych na łuszczycę	64
Rycina 5.11.	Porównanie względnego poziomu transkryptów badanych sekwencji HERV pomiędzy skórą pozornie zdrową osób chorych na łuszczycę oraz skórą zdrową osób z grupy kontrolnej	65
Rycina 5.12.	Porównanie względnego poziomu transkryptów badanych sekwencji HERV pomiędzy skórą zmienioną chorobowo osób chorych na łuszczycę oraz skórą zdrową osób z grupy kontrolnej	66

Rycina 5.13.	Porównanie względnego poziomu transkryptów analizowanych w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej pomiędzy osobami o łagodnym i umiarkowanym przebiegu łuszczycy oraz przebiegu ciężkim	67
Rycina 5.14.	Porównanie względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej pomiędzy osobami w poszczególnych stadiach infekcji HSV	68
Rycina 5.15.	Porównanie względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji w skórze zmienionej chorobowo pomiędzy osobami w poszczególnych stadiach infekcji HSV	69
Rycina 5.16.	Porównanie względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji w skórze pozornie zdrowej pomiędzy osobami w poszczególnych stadiach infekcji HSV	70

SPIS TABEL

Tabela 4.1.	Przebieg reakcji odwrotnej transkrypcji oraz skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby	39
Tabela 4.2.	Charakterystyka starterów użytych w real time PCR	42
Tabela 4.3.	Warunki real-time PCR	43
Tabela 4.4.	Skład mieszaniny reakcyjnej w real-time PCR w przeliczeniu na jedną próbę	47
Tabela 4.5.	Kryteria stosowane w określaniu stadium zakażenia <i>herpes simplex</i>	51
Tabela 4.6.	Przykładowy arkusz oceny nasilenia łuszczycy z użyciem PASI	51
Tabela 5.1	Rozkład częstości zmiennej płęć	54
Tabela 5.2	Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV-E pol	56
Tabela 5.3.	Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV-R pol env	57
Tabela 5.4.	Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV-H (env 62)	57
Tabela 5.5.	Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV-K10gag	57
Tabela 5.6.	Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV- K env	58
Tabela 5.7.	Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV-E (4 1) gag	58
Tabela 5.8.	Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV-W env	58
Tabela 5.9.	Częstość występowania przeciwciał w analizowanych grupach	59
Tabela 5.10.	Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu zmiennej nasilenie łuszczycy	62
Tabela 5.11.	Wartość statystyk opisowych dla względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej w grupach o różnym przebiegu łuszczycy	67
Tabela 5.12.	Wartość statystyk opisowych dla względnych poziomów transkryptów badanych sekwencji HERV w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej w grupach osób w różnych stadiach zakażenia HSV	71
Tabela 5.13.	Wartość statystyk opisowych dla względnych poziomów transkryptów badanych sekwencji HERV w skórze zmienionej chorobowo w grupach osób w różnych stadiach zakażenia HSV	72
Tabela 5.14.	Wartość statystyk opisowych dla względnych poziomów transkryptów badanych sekwencji HERV w skórze pozornie zdrowej w grupach osób w różnych stadiach zakażenia HSV	73
Tabela 5.15.	Korelacje pomiędzy wynikiem uzyskanym na skali PASI oraz wiekiem, a analizowanymi sekwencjami	74

WYKAZ SKRÓTÓW

- cDNA**- komplementarny DNA (ang. *complementary DNA*).
- DNA**- kwas deoksyrybonukleinowy
- dUTPaza**- hydrolaza trójfosforanu deoksyurydyny
- EBV**- wirus Epsteina-Barr (*Epstein-Barr virus*)
- ELISA**- immunoenzymatyczny test fazy stałej (ang. *enzyme linked immunosorbent assay*).
- GAPDH**- dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa (ang. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)
- HaCaT**- nieśmiertelne linie komórkowe keratynocytów
- hCG**- gonadotropina kosmówkowa (ang. *human chorionic gonadotropin*)
- HERV**- Ludzkie endogenne retrowirusy (ang. *human endogenous eetroviruses*)
- HIV**- ludzki wirus niedoboru odporności (ang. *human immunodeficiency virus*)
- HLA**- ludzkie antygeny leukocytarne (ang. *human leukocyte antigens*)
- HML**- ang. *human MMTV-like*
- HPV**- wirus brodawczaka ludzkiego (ang. *humman papilloma viruses*)
- HSV**- wirus opryszczki pospolitej (*herpes simplex virus*)
- ICD-10**- Międzynarodową Statystyczną Klasyfikacją Chorób i Problemów Zdrowotnych-10 (ang. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*)
- IL**- interleukina
- INF- γ** - interferon gamma
- LINE**- długie rozproszone elementy jądrowe (ang. *long interspersed element*)
- LTR**- długie powtórzeni końcowe (ang. *long terminal repeats*)
- MMTV**- myszy wirus nowotworu sutka (ang. *mouse mammary tumor virus*)
- PASI**- Skala oceny nasilenia łuszczyca (ang. *Psoriasis Area and Severity Index*)
- PBL**- limfocyty krwi obwodowej (ang. *peripheral blood lymphocytes*)
- PBMC**- komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*)
- PBS**- sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. *phosphate buffered saline*)
- PCR**- reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)
- PSORS1**- (ang. *psoriasis susceptibility locus 1*)
- RA**- względny poziom (ang. *relative abundance*)
- real-time PCR**- reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
- RFLP**- polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism*)
- RNA** – kwas rybonukleinowy
- SINE**- krótkie rozproszone elementy jądrowe (ang. *short interspersed element*)
- SLE**- toczeń rumieniowaty układowy (ang. *systemic lupus erythematosus*)
- SNP**- warianty jednonukleotydowych polimorfizmów (ang. *single nucleotide polymorphism*)
- snRNP**- małe jądrowe nukleoproteiny (ang. *small nuclear ribonucleoproteins*)
- TCR** - ang. *T Cell Receptor*)
- T_m**- temperatura topnienia
- TNF- α** - czynnik martwicy guza (ang. *tumor necrosis factor*)
- tRNA**- transportujący RNA (ang. *transfer RNA*)
- UNG**- uracylo-N-glikozylaza
- VLP**- cząstki retrowirusopodobne (ang. *retrovirus-like particle*)

ROZDZIAŁ 1. WSTĘP

1.1. ŁUSZCZYCA

1.1.1. INFORMACJE WSTĘPNE

Łuszczyca (*psoriasis*) jest przewlekłą chorobą zapalną, o podłożu genetycznym (Elder i wsp., 2001). Cechuje się nadmierną proliferacją keratynocytów, prowadzącą do powstania na skórze łusek i krost mających tendencję do zlewania. Zmiany mogą występować jedynie w postaci nielicznych ognisk w specyficznych lokalizacjach, bądź też zajmować niemal całą powierzchnię ciała oraz stawy. W skrajnych przypadkach choroba ta może prowadzić do inwalidztwa. Przebieg kliniczny jest zróżnicowany- niektórzy chorzy mogą cieszyć się nawet wieloletnimi okresami remisji, kiedy to ustępujące zmiany nie pozostawiają śladu, podczas gdy u pozostałych czas ten jest bardzo krótki (Gawkrodker, 2008; Jabłońska i Majewski, 2008; Christopens i Mrowietz, 2010). W przeszłości uważano, że łuszczyca jest jedynie chorobą skóry (Kremers i wsp., 2007). Od lat 70'tych ubiegłego stulecia pogląd ten był podważany, na korzyść obecnie obowiązującego stanu wiedzy, uznającego łuszczycę za chorobę ogólnoustrojową mediowaną przez układ immunologiczny (Fry, 1988; Kremers i wsp., 2007; Reich, 2012).

Mogłoby się wydawać, że łuszczyca jest jedynie defektem estetycznym i że nie wywiera zbyt dużego wpływu na życie osób nią dotkniętych. Nie jest to prawdą. Skóra jest narządem naszego ciała odgrywającym ważną rolę w kontaktach społecznych. Osoby dotknięte łuszczycą spotykają się z uprzejmymi spojrzeniami, mimicznymi oznakami odrazy, fizycznym odsuwaniem się ludzi, ale także wprost artykułowanymi pytaniami o zakaźność choroby. Zdarza się także, że są proszeni o opuszczenie miejsc publicznych, jak np. salonu fryzjerskiego czy basenu (Hawro, Janusz i Zalewska, 2011). Osoby chore na *psoriasis* doświadczają stygmatyzacji (Miękoś-Zydek i wsp., 2006), a jakość ich życia plasuje się na podobnym poziomie jak osób cierpiących na schorzenia bezpośrednio zagrażające życiu, jak np. zawał serca czy nowotwór (Rapp i wsp., 1999). Van de Kerkhof

(2004), trafnie, określił ją mianem schorzenia rujnującego życie (ang. *life-ruining*), czyniącym je trudnym do zniesienia. Nie ulega zatem wątpliwości, że określenie etiopatogenezy tej choroby jest niezwykle ważne zarówno z poznawczego punktu widzenia jak i ze względów pragmatycznych.

1.1.2. EPIDEMIOLOGIA

Łuszczyca jest chorobą szeroko rozpowszechnioną w populacji. Ocenia się, że dotyka ok. 2-3% mieszkańców Europy (Schafer, 2006) oraz 2,2% osób zamieszkujących Stany Zjednoczone Ameryki Północnej (Stern i wsp, 2004). Częstość występowania *psoriasis* zależy od przynależności etnicznej. W dużych badaniach populacyjnych przeprowadzonych wśród rdzennych mieszkańców Ameryki Południowej (zbadano 26 000 Indian) oraz mieszkańców wysyp Samoa (12 500 badanych) nie odnotowano żadnych przypadków łuszczycy. Choroba jest także mniej częsta w Afryce, choć występuje duże zróżnicowanie pomiędzy mieszkańcami Wschodu i Zachodu tego kontynentu. Natomiast największą liczbę osób chorych na łuszczycę obserwuje się w Norwegii: zapada na nią od 4,8% (za: Gudjonsson i Elder; 2007) do 8,5% (Parisi i wsp., 2012) populacji.

Łuszczyca jest obserwowana u osób obojga płci z równym prawdopodobieństwem, choć pojedyncze doniesienia wskazują na występowanie różnic pomiędzy kobietami a mężczyznami w zakresie częstości zachorowań oraz wieku pierwszego wysiewu choroby. Pierwsza kliniczna manifestacja choroby może pojawić się w każdym wieku, jednak najczęściej występuje u osób między 15 a 30 rokiem życia (za: Gudjonsson i Elder; 2007). Drugi szczyt zachorowań występuje na przełomie 5 i 6 dekady życia (Christopers i Mrowietz, 2010). Hensler i Christophers (1985) zaobserwowali związek wieku pacjenta w momencie pierwszego wysiewu z rodzinnym występowaniem choroby oraz ze specyficznym układem alleli nazwanych HLA-Cw6. Na tej podstawie wyodrębnili oni 2 typy choroby. Dziś przyjmuje się, że typ I związany jest z haplotypem HLA-Cw6, rodzinnym występowaniem, wiekiem chorych poniżej 40 lat, infekcjami

paciorkowcowymi oraz skłonnością do cięższego przebiegu. Natomiast typ II, na który częściej zapadają osoby powyżej 40 roku życia, ma mniejszy związek z antygenami HLA, rodzinnym występowaniem, infekcjami paciorkowcowymi oraz charakteryzuje się stabilniejszym przebiegiem (Weisenseel i wsp., 2002, za: Gudjonsson i Elder; 2007, Christophers & Mrowietz, 2010). Warto zaznaczyć, że choć zaproponowany podział jest powszechnie uznany, istnieją doniesienia przeczące takiemu rozróżnieniu, zwłaszcza w przypadku mieszkańców Dalekiego Wschodu (za: Gudjonsson i Elder; 2007).

Łuszczyca współwystępuje z szeregiem schorzeń. Doniesienia literaturowe w tym zakresie nie zawsze są zbieżne, generalnie jednak wskazywane są takie choroby jak: sercowo-naczyniowe, cukrzyca typu II, zespół metaboliczny, depresja, niewydolność nerek, choroby wątroby, wirusowe zapalenie wątroby typ B i C, astma oskrzelowa, choroba wrzodowa żołądka i dwunastnicy oraz inne schorzenia o podłożu immunizacyjnym (Chen i wsp., 2008; Davidovici i wsp., 2010; Naldi i Mercuri, 2010; Yang i wsp., 2011; Armstrong i wsp., 2012; Takahashi i Iizuka, 2012). Z kolei, do najczęściej wymienianych czynników ryzyka *psoriasis* zalicza się otyłość, palenie papierosów, używanie alkoholu, stres psychologiczny oraz przebyte infekcje (Davidsson i wsp., 2005; Huerta i wsp., 2007, Szramka-Pawlak i wsp., 2011). Warto zwrócić uwagę, że część z wymienionych czynników ryzyka może być zarówno przyczyną jak i konsekwencją zachorowania na łuszcycę, np. doświadczanie stresu może być czynnikiem spustowym w łuszczycy (aspekt psychosomatyczny), jak i rezultatem (aspekt somatopsychiczny).

1.1.3. OBJAWY CHOROBY I PODZIAŁ

Obraz kliniczny *psoriasis* różni się w zależności od cech osobniczych, lokalizacji zmian, sposobu leczenia, czynników ryzyka, typu oraz odmiany klinicznej (Gawkrodker, 2008; Christophers i Mrowietz, 2010). Mogą występować postaci lekkie- z kilkoma grudkami oraz ciężkie obejmującej zmianami prawie całe ciało. Zgodnie Międzynarodową Statystyczną Klasyfikacją Chorób i Problemów Zdrowotnych (ICD-10, ang. *International*

Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) wyróżnia się następujące odmiany łuszczycy:

- łuszczycyca pospolita
- łuszczycyca krostkowa uogólniona
- zapalenie ciągłe krostkowe kończyn
- łuszczycyca krostkowa dłoni i podeszew
- łuszczycyca grudkowa
- łuszczycyca stawowa
- inna łuszczycyca
- nieokreślona łuszczycyca

Morfologiczny obraz zmian jest również charakterystyczny dla specyficznej lokalizacji anatomicznej. Ogniska łuszczycowe mogą występować zarówno na skórze gładkiej jak i owłosionej, w okolicach wyprzeniowych, prącia, podeszew i stóp, błon śluzowych czy paznokci. Miejscami predylekcyjnymi dla łuszczycy zwykłej są okolice kolan i łokci oraz owłosiona skóra głowy. Oprócz wymienionych lokalizacji anatomicznych, zmiany mogą pojawiać się na niemal całej powierzchni ciała. Ponadto u 1-2% chorych rozwija się erythrodermia łuszczycowa, gdzie ogniskami objęte jest powyżej 90% powierzchni skóry chorego (Jabłońska i Majewski, 2008). W dalszej części niniejszego opracowania pod terminem łuszczycyca, autorka będzie odnosiła się do łuszczycy zwykłej (chyba, że zostanie zaznaczone inaczej), jako że tej odmianie klinicznej poświęcone były przeprowadzone badania.

Zazwyczaj pierwszym objawem w łuszczycy są czerwono-brunatne lub czerwone grudki, o dobrze odgraniczonych brzegach, pokrywane się srebrną łuską, na skutek nieprawidłowego i przyspieszonego rogowacenia komórek. Wczesne zmiany występują w postaci drobnych grudek o wielkości do 1-2 cm, szerzących się obwodowo i tworzących obrączki poprzez ustępowanie w części środkowej. W pełni rozwinięte ogniska mają do kilku cm i pokryte są ściśle przylegającymi łuskami, tworząc tzw. blaszki łuszczycowe

(Jabłońska i Majewski, 2008; Christophers i Mrowietz, 2010). Często obserwuje się współwystępowanie silnego świądu. Zwykle zmiany po ustąpieniu nie pozostawiają blizn, choć na skórze mogą okresowo występować przebarwienia.

1.1.4. POWSTAWANIE ZMIAN

Zmiany łuszczykowe powstają wskutek hiperprolifracji keratynocytów. Keratynocyty dzielą się co 36h (w warunkach fizjologicznych cykl życia komórki trwa 300 h), a następnie przesuwają ku powierzchni skóry w ciągu 3-4 dni (w skórze zdrowej proces ten trwa przez 28 dni), po czym oddzielają się jako łuski (za: Gudjonsson i wsp., 2004). Uważa się, że obecne w dużej liczbie w zmianach chorobowych limfocyty T odgrywają główną rolę w etiopatogenezie *psoriasis*. Jedną z hipotez zakłada, że aktywacja limfocytów T następuje pod wpływem wczesnych zmian zapalnych wywołanych przez cytokiny, druga natomiast wtórność hiperprolifracji keratynocytów wobec aktywacji limfocytów i uwalniania cytokin (Christophers, 2006). Cytokiny i komórki układu immunologicznego w etiopatogenezie łuszczycy tworzą sieć wzajemnych, skomplikowanych zależności.

Warto zaznaczyć, że produkowany przez limfocyty T (wśród wielu cytokin) interferon gamma (INF- γ) może być głównym czynnikiem wywołującym zmiany skórne (Christophers, 2006). Ponadto INF- γ oraz czynnik martwicy guza (TNF- α - ang. *tumor necrosis factor*) indukują wytwarzanie przez keratynocyty wielu interleukin oraz innych cytokin i czynników wzrostowych, co prowadzi do postawania swoistego „błędnego koła” (Elder i wsp., 2010). Czynniki i te są bezpośrednio związane z przyspieszeniem cyklu komórkowego i nadmierną aktywnością proliferacyjną komórek (Galadari i wsp., 2007). Pomimo, że limfocyty T osób chorych na łuszczycę posiadają pewne szczególne receptory, jak dotąd nie ustalono antygeny czy też czynnika infekcyjnego istotnego w patogenezie choroby. Jedną z hipotez zakłada, że autoantygeny są produktami kombinacji alleli poszczególnych genów (Albanesi i wsp., 2007).

1.1.5. PODŁOŻE GENETYCZNE

Wiadomo, że łuszczyca ma podłoże genetyczne- u $\frac{1}{3}$ pacjentów obserwuje się dodatni wywiad rodzinny (Łuczowska i Żaba, 2011). *Psoriasis* jest dziedziczona poligenowo i uwarunkowana wieloczynnikowo. W procesie chorobowym istotną rolę odgrywają także warunki środowiskowe. W praktyce oznacza to, że poszukiwanie genów odpowiedzialnych za występowanie łuszczycy jest niezwykle trudne oraz że nie można wyłonić jednego allelu, którego obecność warunkuje wystąpienie choroby.

Dotychczas na podstawie analizy sprzężeń w rodzinach obarczonych chorobą, wytypowano i opisano ok. 20 *loci* związanych z łuszczycą. Natomiast tylko jedno z nich – PSORS1 (ang. *psoriasis susceptibility locus 1*) zawierające gen HLA –C (6p21)- uznawane jest za uniwersalne, co oznacza że jego związek z chorobą jest obserwowany w licznych populacjach (Nair i wsp., 2006; Valdimarsson, 2007; Nestle i wsp., 2009; Elder i wsp., 2010). Ustalono, że osoby o kombinacji polimorficznych miejsc oznaczanych HLA-Cw6 częściej zapadają na *psoriasis* niż osoby o odmiennym haplocyfie. Posiada go 60% osób chorujących na typ I łuszczycy (Duffin i wsp., 2010), a jego obecność związana jest cięższym przebiegiem *psoriasis*. HLA-Cw6 zwiększa ryzyko zachorowania 10-krotnie (Valdimarsson, 2007), co oznacza, że nie każda osoba która posiada taki haplotyp zachoruje na łuszczycę. Uważa się także, że HLA-Cw6 odpowiada za 50% ryzyka wystąpienia choroby u rodzeństwa osób zmagających się z łuszczycą (The International Psoriasis Genetic Consortium, 2003).

Poza opisanym PSORS1 opisano jeszcze dziewięć obszarów podatności na łuszczycę (PSORS 2-PSORS10). Obejmują one szereg genów, w różnych lokalizacjach chromosomowych. Żadne jednak z nich, nie zostało uznane za powszechne, bowiem nie znalazło potwierdzenia w badaniach z udziałem różnych populacji (Nestle i wsp, 2009; Duffin i wsp., 2010). Interakcje pomiędzy kandydującymi genami i haplocyfiemi także są niejednoznaczne i trudne do zinterpretowania. Dlatego póki co nie jest możliwe określenie genetycznej kombinacji różnych *loci*, która miałaby bezpośredni związek z występowaniem choroby (The International Psoriasis Genetic Consortium, 2003).

Interesujących rezultatów dostarczają badania z udziałem bliźniąt monozygotycznych. Wykazano bowiem, że jeżeli choruje jedno z nich, drugie zapada na łuszczycę w blisko 70% przypadków. Jest to niewątpliwie fakt przemawiający, za istotną rolę czynników genetycznych i epigenetycznych w etiopatogenezie łuszczycy-gdyż identyczność genomu z osobą chorą nie jest warunkiem wystarczającym do zachorowania (Krueger i wsp. 2005; Valdimarsson, 2007). Wiadomo zatem, że istnieje genetyczna predyspozycja, natomiast nadal nie znamy czynnika, bądź mechanizmu oddziaływań pomiędzy czynnikami, które przesądzałyby o występowaniu łuszczycy.

1.1.6. LECZENIE

Istnieją różne schematy leczenia łuszczycy, ich stosowanie uzależnione jest od przebiegu klinicznego choroby, wieku, płci pacjenta oraz reakcji na dotychczasową terapię. Powinny one uwzględniać także preferencje osób chorych, bowiem zwykle jest to proces o długoletniej/dożywotniej perspektywie. Stosowane są preparaty miejscowe, których zadaniem jest przede wszystkim usunięcie łuski oraz ograniczenie nadmiernego różnicowania keratynocytów i stanu zapalnego. Leczenie zewnętrzne bywa dużym obciążeniem, bowiem należy regularnie, nieraz kilka razy dziennie aplikować na skórę preparaty (Jabłońska i Majewski, 2008).

Stosowane jest także leczenie ogólne. Warto zaznaczyć, że większość leków stosowanych ogólnie oraz naświetlania promieniami UV mają szerokie spektrum objawów niepożądanych, np.: mogą powodować poważne uszkodzenia nerek, wątroby czy potencjalnie działać teratogenicznie (Christophers i Mrowietz, 2010; Łuczkowska i Żaba, 2011).

1.1.7. CZYNNIKI PROWOKUJĄCE ŁUSZCZYCĘ

Liczne czynniki mogą prowokować wystąpienie łuszczycy i przejście z ukrytej do objawowej postaci choroby. Można je podzielić na czynniki zewnętrzne i wewnątrzpochodne. Do czynników zewnętrznych należą:

- uraz (Grawkroder, 2008; Christopens i Mrowietz, 2010),
- czynniki fizyczne (np. promieniowanie UV, oparzenia, zabiegi chirurgiczne) (Grawkroder, 2008; Christopens i Mrowietz, 2010),
- czynniki chemiczne (np. oparzenia środkami chemicznymi, ekspozycje na działanie środków toksycznych) (Christopens i Mrowietz, 2010; Łuczowska & Żaba, 2011).

Do najczęstszych czynników wewnątrzpochodnych natomiast należą:

- infekcje, przede wszystkim bakteryjne i wirusowe (Leung i wsp., 1995; Weisenseel i wsp., 2002; Majewski i Jabłońska, 2003; Fry i Baker, 2007; Grawkroder, 2008; Valdimarsson i wsp., 2007; Łuczowska i Żaba, 2011),
- przyjmowane leki (np.: beta-blokery, związki litu, leki przeciwmalaryczne) (Fry i Baker, 2007; Grawkroder, 2008; Łuczowska i Żaba, 2011),
- stres psychologiczny (Fortune i wsp., 1998; Pacan i wsp., 2003; Grawkroder, 2008; Łuczowska i Żaba, 2011).

Wśród czynników mogących potencjalnie wyzwać łuszczycę wymienia się także ludzkie endogenne retrowirusy (Fry i Baker, 2007) opisane w dalszej części niniejszego rozdziału.

1.2. LUDZKIE ENDOGENNE RETROWIRUSY

1.2.1. INFORMACJE WSTĘPNE- ELEMENTY RUCHOME W GENOMIE

Od momentu zakończenia z sukcesem Projektu Sekwencjonowania Ludzkiego Genomu wiadomym jest, że ludzki genom zawiera relatywnie małą liczbę genów, a części kodujące (eksony) stanowią jedynie niewiele ponad 1% całego DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*, kwas deoksyrybonukleinowy) komórki (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Villesen i wsp., 2004). Z równie dużym

zaskoczeniem przyjęto informację, że blisko 50%, bo aż 46% genomu stanowią elementy ruchome- transpozony, zwane także wędrującymi, bądź skaczącymi genami (ang. *jumping genes*) lub też mobilnymi elementami genetycznymi (ang. *mobile genetic elements*). Co ciekawe uważa się, że szacunki dotyczące procentowego udziału elementów ruchomych w genomie są zaniżone, ze względu na dywergencję prehistorycznych insercji, które obecnie są już nie do rozpoznania. Sekwencje te mają zdolność do przemieszczania się w obrębie genomu, na drodze procesu zwanego transpozycją.

Zasadniczo, wśród kręgowców wyróżnia się cztery grupy elementów ruchomych: długie rozproszone elementy jądrowe (LINE- ang. *long interspersed element*), krótkie rozproszone elementy jądrowe (SINE- ang. *short interspersed element*), transpozony LTR oraz transpozony DNA. Trzy pierwsze ulegają transpozycji za pośrednictwem transkrypcji na RNA (ang. *ribonucleic acid*, kwasy rybonukleinowy) a następnie odwrotnej transkrypcji na DNA i są określane jako transpozony klasy I (retroelementy), natomiast transpozony DNA przemieszczają się bez pośredniczącej roli RNA i są jedynymi przedstawicielami klasy II. Retroelementy stanowią około 42,2 % ludzkiego genomu oraz około 90% wszystkich elementów ruchomych (Bannert i Kurth, 2004; Cordaux i Batzer, 2009). Uważa się, że obecnie zdolności do aktywnego przemieszczania w genomie posiadają niektóre z elementów ruchomych należące do LINE oraz SINE, a także w ograniczonym stopniu (jeżeli jakimkolwiek) transpozony LTR. Natomiast transpozony DNA stanowią około 2% zawartego w komórkach DNA i były aktywne około 37 mln lat temu (Cordaux i Batzer, 2009). Ze względu na tematykę niniejszej rozprawy, szczegółowo opisane zostaną ludzkie endogenne retrowirusy, należące wraz z retrotranspozonomi do grupy retroelementów charakteryzującej się obecnością niekodujących długich powtórzeń końcowych (LTR-ang. *long terminal repeats*) (Bannert i Kurth, 2004).

1.2.2. POCHODZENIE

Ludzkie endogenne retrowirusy (HERV-ang. *human endogenous eetroviruses*) zostały odkryte w latach 80'tych XX wieku- przyjmuje się, że stanowią ok. 8% ludzkiego

genomu. Prawdopodobnie są ewolucyjnymi pozostałościami po infekcjach retrowirusów egzogennych, które zostały zintegrowane z chromosomami komórek szlaku płciowego i są przekazywane z pokolenia na pokolenie (Bannert i Kurth, 2004; Zwolińska, 2006). Istnieją dwie teorie wyjaśniające nieodwracalną integrację HERV z komórkami gospodarza. Pierwsza z nich, zwana teorią pasożytniczą (ang. *parasitic hypothesis* lub *selfish hypothesis*), zakłada, że w toku ewolucji organizmy nie były zdolny do usunięcia ich z własnych genomów. Natomiast zgodnie z drugą, zwaną teorią symbiotyczną (ang. *symbiotic theory*), obecność HERV w genomie miałyby być wynikiem pozytywnej selekcji naturalnej, gdzie kładzie się nacisk na pełnienie przez nie ważnych dla organizmu funkcji. Teorie te nie muszą się wzajemnie wykluczać: początkowo „pasożytnicza” integracja fragmentów DNA, na skutek zajścia wielu mutacji, mogła okazać się korzystna, jako że doprowadziła do powstawania funkcjonalnie ważnych białek (Larsson i Andersson, 1998; Zwolińska, 2006).

Uważa się, że HERV wbudowały się w niewielkiej liczbie (co znajduje odzwierciedlenie w stosunkowo małej licznie rodzin) do komórek naszych przodków najwcześniej przed 25 mln lat, po czym ulegały wielokrotnym amplifikacjom i rozproszeniu w różne miejsca genomu. Największa częstość omawianych sekwencji występuje na allosomach oraz na chromosomie 4 i 20 (Zwolińska, 2006). Pomimo, że większość HERV w toku ewolucji ulegała kolejnym mutacjom genowym (szczególnie delecjom i insercjom), część z nich posiada otwarte ramki odczytu i jest zdolna do kodowania funkcjonalnych białek, a nawet formowania cząsteczek wirusopodobnych (Nelson i wsp., 2003; Bannert i Kurth, 2004). Tak duży udział procentowy sekwencji ruchomych genomu, w tym endogennych retrowirusów skłania do stawiania pytań odnośnie ich ewolucyjnej funkcji, a także wpływu na funkcjonowanie organizmu.

1.2.3. BUDOWA I KLASYFIKACJA

Ludzkie endogenne sekwencje retrowirusowe mają budowę typową dla retrowirusów, tzn. geny *gag*, *pol* oraz *env* oflankowane są obustronnie sekwencjami LTR

(por Ryc. 1.1.). Gen *gag* odpowiedzialny jest za kodowanie białek strukturalnych, *pol* koduje odwrotną transkryptazę, proteazę, rybonukleazę H i integrazę, a *env* białka otoczkowe oraz powierzchniowe. Przedstawiona struktura jest charakterystyczna dla wszystkich HERV z wyjątkiem reprezentantów rodziny HERV-L, które tak jak transpozony, nie posiadają genu *env*. Należy zaznaczyć, że istotną funkcję dla procesu transpozycji i ekspresji białek pełni LTR. W ich obrębie mieszczą się promotory, wzmacniacze i wyciszacze, które w odpowiedzi na odpowiednie białka warunkują swoistą tkankowo ekspresję (Zwolińska, 2006).



Rycina 1.1. Struktura sekwencji ludzkich endogennych retrowirusów

Źródło: Opracowanie własne

Klasyfikacja HERV nastęrcza wiele niejasności. Zazwyczaj HERV dzieli się na rodziny ze względu na aminokwasową swoistość tRNA (transportujący RNA), który przyłącza się do miejsca PBS (ang. *primer binding site*) w trakcie odwrotnej transkrypcji. Rodzina oznaczana jest literą, będąca skrótem danego aminokwasu, na przykład: w rodzinie HERV-K odnajdziemy sekwencje, dla których swoistym tRNA przyłączającym się do PBS, jest tRNA transportujący lizynę. Zasadniczą wadą zaproponowanej klasyfikacji, jest łączenie w grupy niespokrewnione endogenne retrowirusy, jako że liczne HERV filogenetycznie mające ze sobą niewiele wspólnego używa tego samego starterowego tRNA. Poza tym, ze względu na liczne mutacje, PBS może być nierozpoznany (Mayer i Meese, 2005; Zwolińska, 2006).

Niektórzy badacze, chcąc dokonać precyzyjniejszego opisu nadają nazwy grupom ze względu na ich podobieństwo do wirusów egzogennych, obecności szczególnych motywów sekwencji lub posługując się nazwami zwyczajowymi, jak to ma miejsce w przypadku ERV-3, które ze względu na swoisty dla arginininy tRNA może być

nazywany i zaliczany do rodziny HERV-R (Bannert i Kurth, 2004; Zwolińska, 2006). Takie odstępstwa od przyjętej nomenklatury przyczyniają się do powstawania jeszcze większych niejasności. Niejednorodność klasyfikacji znajduje także odzwierciedlenie w liczbie wyróżnionych rodzin HERV, np.: Gifford i Tristem (2003) wyróżnili 50 rodzin HERV podczas gdy Mager i Medstrand 42 rodziny (za: Mayer i Meese, 2005). Wielu badawczy uważa ponadto, że liczba prowirusów z różnych rodzin ukonstytuowanych w toku ewolucji w genomie była znaczenie większa niż dziś. Mają o tym świadczyć obecne w genomie sekwencje solo-LTR, które są pozostałościami po homologicznej rekombinacji pomiędzy prowirusami (za: Mayer i Meese, 2005).

Zgodnie z drugim schematem taksonomicznym, wyróżnia się trzy klasy HERV na podstawie homologii genu *pol* względem tegoż samego genu wirusów egzogennych. Do klasy I zaliczamy endogenne retrowirusy wykazujące homologię do gammaretrowirusów, do klasy II homologiczne do betaretrowirusów i wreszcie w klasie III odnajdziemy endogenne retrowirusy podobne do spumaretowirusów (de Parseval i Heidmann, 2005; Zwolińska, 2006). Oba schematy taksonomiczne wydają się być rozłączne, choć należy zauważyć, że w klasie II znajdują się tylko i wyłącznie HERV z rodziny K, w klasie III HERV z rodziny L, a w klasie I można odnaleźć pozostałe (Nelson i wsp, 2003).

1.2.4. POTENCJALNY WPŁYW NA FUNKCJONOWANIE ORGANIZMU

Integracja HERV z genomem ma charakter nieodwracalny. Insercje i amplifikacje doprowadziły do nagromadzenia znacznej ilości DNA o nieznannej funkcji, określanego jako „śmieciowe DNA”. Warto jednak zwrócić uwagę, że ruchomość transpozonów wpływała w toku ewolucji na rearanżacje w obrębie genomu, tym samym działając na jego plastyczność, procesy selekcji i adaptacji (Zwolińska, 2006).

Uważa się, że HERV mogą także wpływać na organizm regulując bądź zakłócając ekspresję genów. W literaturze opisywane są promotory pochodzące z endogennych retrowirusów, jak np. genu amylazy ślinowej, plejotropiny czy *mid1* (którego mutacja

powiązana jest z występowaniem Zespołu Smitha-Lemliego-Opitza) (Nelson i wsp., 2004; Zwolińska, 2006). Jordan i wsp. (2003) przy pomocy analizy komputerowej wykazali, że ok 25% ludzkich sekwencji promotorowych wywodzi się z ruchomych elementów genomu.

Także, tworzenie miejsc inicjacji transkrypcji, nowych kodonów stop czy miejsc splicingowych, na skutek losowej integracji z genomem, bez wątpienia nie pozostaje obojętne dla organizmu. Największą uwagę przykuwają schorzenia wywołane przez insercje elementów ruchomych w obrębie genów, wywołujące drastyczne zmiany fenotypowe. Jednakże subtelniejsze zmiany w transkrypcji mogą okazać się równie znaczące dla organizmu, skutkując na przykład zwiększeniem kontroli nad ekspresją genów, jak ma to miejsce w przypadku inaktywacji chromosomu X w czasie rozwoju zarodków płci żeńskiej (Nelson i wsp., 2004).

Przypuszcza się, że endogenne retrowirusy mogą także wpływać na funkcjonowanie organizmu inicjując proces immunizacji przez mimikrę molekularną (ang. *molecular mimicry*). Zjawisko to opiera się na homologii pomiędzy białkami produkowanymi przez patogen a białkami gospodarza, skutkujące uruchomieniem reakcji immunologicznej i produkcją przeciwciał reagujących krzyżowo, tzn. zarówno z antygenami drobnoustrojów jak i gospodarza. Reakcje krzyżowe wykrywano w odniesieniu do retrowirusów egzogennych, np. pomiędzy białkiem p24 ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV- ang. *human immunodeficiency virus*) a cząstkami małych jądrowych nukleoprotein (snRNP- ang. *small nuclear ribonucleoproteins*) u osób chorych na toczeń rumieniowaty układowy (SLE - ang. *systemic lupus erythematosus*), seronegatywnych względem HIV. Badania wskazują na wyższe stężenia przeciwciał skierowanych przeciw białkom produkowanym przez endogenne retrowirusy u osób chorych na stwardnienie rozsiane, SLE czy twardzinę układową w porównaniu z osobami zdrowymi (Nelson i wsp., 2004). Uważa się, że HERV z rodzin R, W oraz K z największym prawdopodobieństwem zdolne są do produkowania białek, mogących potencjalnie oddziaływać na drodze mimikry molekularnej (Nelson i wsp., 2004).

Możliwość zachodzenia molekularnej mimikry w omawianym kontekście jest niekwestionowana, choć należy zaznaczyć że aby mogło do niej dojść HERV muszą posiadać otwartą ramkę odczytu i zdolność do ekspresji całych białek wirusowych bądź ich fragmentów. Badania z zastosowaniem różnorodnych technik molekularnych potwierdziły obecność cząstek retrowirusopodobnych (VLP-ang. *retrovirus-like particle*) np. w mazi stawowej w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów (Reynier i wsp., 2009), w mózgach chorych na stwardnienie rozsiane (Mameli i wsp. 2012; Perron i wsp., 2012) czy komórkach raka piersi stymulowanych hormonami glikokortykosteroidowymi (Nelson i wsp., 2004; Zao i wsp., 2011).

Ludzkie endogenne retrowirusy potencjalnie zdolne są także do wykazywania aktywności superantygenowej. Charakterystyczną cechą limfocytów T jest obecność glikoproteinowych receptorów (TCR- ang. *T Cell Receptor*) składających się z łańcuchów α oraz β , dzięki którym zdolne są one do rozpoznawania kompleksów antygen-cząsteczka HLA (ang. *human leukocyte antigens*, ludzkie antygeny leukocytarne) i inicjacji odpowiedzi immunologicznej. Superantygeny są natomiast zdolne do poliklonalnej aktywacji limfocytów T, na skutek niespecyficznego związania z TCR, bowiem łączą się one tylko z regionem zmiennym jego łańcucha β ($V\beta$) (Macias i wsp., 2011). Są one zdolne do aktywacji ok. 20% populacji limfocytów T (Sundberg i wsp., 2007), podczas gdy w odpowiedzi indukowanej antygenem aktywowanych jest ok. 0,001% (Brodziak i wsp., 2012). Aktywacja tak dużej części populacji limfocytów T, skutkuje masywnym uwalnianiem cytokin prozapalnych i dalszym toczeniem się reakcji immunologicznej. Warto zaznaczyć, że siła reakcji zapalnej w odpowiedzi na superantygen jest swoista osobniczo, ze względu na uwarunkowaną genetycznie izoformę $V\beta$ TCR. Aktywowane są tylko te limfocyty, do których $V\beta$ TCR superantygen ma powinowactwo- ich liczba koreluje z klinicznym nasileniem choroby (Macias i wsp., 2011).

Badania wykazują, że egzogeny myszy wirus nowotworu sutka (MMTV-ang. *mouse mammary tumor virus*), który obecny jest w genomie gospodarza głównie jako endogeny retrowirus nieaktywny replikacyjnie, zdolny jest do kodowania

superantygenów, aktywujących limfocyty T o specyficznym $V\beta$ TCR (np. $V\beta 7$). Spekuluje się, że w przypadku szczepów myszy które cierpią na układową chorobę autoimmunizacyjną, może dochodzić do aktywacji limfocytów T pod wpływem superantygeny kodowanego przez endogenny wirus. Przyjmuje się, że u ludzi HERV również zdolne są do kodowania superantygenów, o równie silnym efekcie immunologicznym. Niektóre geny HERV uważane są za kodujące superantygeny i typowane są jako geny kandydujące w poszczególnych schorzeniach autoimmunizacyjnych (Larsson i Andersson, 1998).

Warto także wspomnieć o kolejnym możliwym niekorzystnym następstwie obecności HERV w genomie, jakim jest możliwość wykorzystania ich produktów ekspresji przez wirusy egzogenne. Warto zaznaczyć, że dane dotyczące tego zjawiska nie są jednoznaczne. Wykazano, że lentiwirusy mają zdolność do wykorzystywania białkowych produktów genów *env* np. HERV-W jako własnych białek. Także proteaza pochodząca HERV-K10 w warunkach *in vitro* wykazywała zdolność do cięcia kapsydu i macierzy HIV-1 prawidłowo rozpoznając miejsca cięcia. Z drugiej jednak strony wykazano także, że wirusy HIV-1 u których zastąpiono własną proteazę proteazą pochodzenia HERV nie były zakaźne (Zwolińska, 2006).

1.2.5.CHARAKTERYSTYKA ANALIZOWANYCH RODZIN

1.2.5.1. RODZINA HERV-E

HERV-E jest rodziną endogennych renowirusów, dla których swoistym tRNA, jest tRNA transportujący kwas glutaminowy. Jest ona rozproszona w liczbie około 50 kopii w obrębie różnych chromosomów. Sekwencje HERV-E są obecne we wzmacniaczach genu amylazy ślinowej, plejotropiny czy wspomnianego już wcześniej genu *mid2* (Yi i Kim, 2006; Yi i Kim, 2007). Transkrypty były natomiast wykrywane w komórkach nowotworów prostaty (przy ich braku w komórkach niezmiętej chorobowo prostaty) (Wang-Johanning i wsp., 2003), w zdrowych komórkach tarczycy oraz trzustki (Shiroma i wsp.,

2001), a także w zmianach łuszcycowych (Molès i wsp., 2005). Produkty białkowe genu *env* wykrywane były w łożysku, w komórkach nowotworowych prostaty, okrężnicy, jądra, oraz w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej osób zdrowych (Turbeville i wsp., 1997; Yi i Kim, 2007).

Rodzina HERV-E była opisywana już wiele lat temu (Steele i wsp. 1984), a sekwencja klonu HERV-E (4 1) (analizowanego w niniejszej rozprawie) została w całości opublikowana w 1985 roku (Repaske i wsp., 1985). Klon HERV-E (4 1) był przedmiotem badań w eksperymentach dotyczących chorób mediowanych przez układ odpornościowy, takich jak: toczeń rumieniowaty układowy czy łuszczyca (Bessis D i wsp. 2004; Ogasawara H i wsp. 2001). Druga z analizowanych sekwencji należąca do rodziny HERV-E położna jest na chromosomie X i wykazuje wysoką homologię z innymi klonami tej samej rodziny.

1.2.5.2. RODZINA HERV-H

Do rodziny HERV-H należą endogenne retrowirusy, dla których swoistym tRNA jest tRNA transportujący histydynę. Przyjmuje się, że pierwsze z nich wbudowały się do komórek linii płciowej naszych przodków ponad 40 milionów lat temu (de Parseval i wsp., 2001). Cechują się dużym zróżnicowaniem i występują w ok. 1000 powtórzeniach w haploidalnym genomie (Urnovitz i Murphy, 1996; Löwer i wsp., 1996). Większość z nich uległa licznym delecjom, przesunięciom ramek odczytu, bądź insercjom kodów stop (Mangenev i wsp., 2001). Z tego względu, jak dotąd zidentyfikowano tylko trzech przedstawicieli posiadających otwarte ramki odczytu dla genu *env* (de Parseval i wsp., 2001), jednakże sekwencja tylko jednej z nich jest kompletna (Mangenev i wsp., 2001). Po jej sklonowaniu i translacji w warunkach *in vitro* uzyskano białko o masie 62kDa (de Parseval i wsp., 2001), które w badaniach na modelu zwierzęcym wykazywało właściwości immunosupresyjne (Mangenev i wsp., 2001).

Transkrypty wirusów endogennych z rodziny H, wykrywane były w łożysku,

płucach, komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, a także niektórych komórkach nowotworowych (Wilkinson i wsp., 1990; de Parseval i wsp., 2001). Ich udział badany był w szeregu schorzeń, w tym w stwardnieniu rozsianym, autyzmie czy nowotworach okrężnicy (Antony i wsp., 2011; Balestrieri i wsp., 2012; Liang i wsp., 2012). W niniejszym badaniu analizie podano gen *env*, kodujący opisane powyżej białko o masie 62kDa.

1.2.5.3. RODZINA HERV-K

HERV-K jest rodziną endogennych retrowirusów, dla których swoistym tRNA, jest tRNA transportujący lizynę. Pierwsze opisy dowodziły, że członkowie HERV-K są najbardziej zbliżeni do MMTV, który to jest główną przyczyną występowania nowotworów piersi u myszy. Jak się jednak później okazało, największe podobieństwo do MMTV wykazują członkowie podrodziny HERV-K(HML-2). Ze względu na dużą różnorodność członków rodziny HERV-K nazywana jest ona przez niektórych badaczy nadrodziną, a w jej obrębie wyróżniono 10 podrodzin (HML-1-HML-10, *ang. human MMTV-like*). Niektóre z podrodzin zostały dokładnie opisane, podczas gdy inne nadal są słabo zbadane. Odkryto np., że rodzina HERV-K(HML-5) ma region PBS swoisty dla tRNA transportującego metioninę, więc tak naprawdę jest to HERV-M (Mayer i Meese, 2005).

Najlepiej opisaną podrodziną jest HERV-K(HML-2). Uważana jest za jedną z największych grup HERV, niektórzy badacze uważają, że występuje nawet w 170 powtórzeniach (za: Khodosevich i wsp., 2002). Jej przedstawiciele często posiadają otwarte ramki odczytu przynajmniej dla niektórych genów i zdolni są do syntezy funkcjonalnych białek. Nadekspresja prowirusów HML-2 była wielokrotnie wykrywana w tkankach transoformowanych nowotworowo, jak np. w raku piersi (Wang-Johanning i wp., 2003a; Frank i wsp., 2008), nowotworach zarodkowych (Sauter i wsp., 1996; Herbst i wsp., 1998), czerniaku złośliwym (Büscher i wsp., 2006; Hahn i wsp., 2008), nowotworze jajników (Hu i wsp., 2006; Wang-Johanning i wsp., 2007), białaczkach

(Iwabuchi i wsp., 2004), chłoniakach (Contreras-Galindo i wsp., 2008), ale także w reumatoidalnym zapaleniu stawów (Sicat i wsp., 2005; Ehlhardt i wsp., 2006; Reynier i wsp., 2009; Freimanis i wsp., 2010), stwardnieniu zanikowym bocznym (Douville i wsp., 2011), czy schizofrenii (Frank i wsp., 2005; Dickerson i wsp., 2008).

W niniejszych badaniach analizowano 2 sekwencje należące do HML-2. Pierwszą z nich jest HERV-K10, która została w 1986 roku wyizolowana przez Ono i wsp. (1986) jako kompletny prowirus, zawierający tylko kilka mutacji nonsensownych. Druga natomiast pochodzi z klonu HERV-K115 ulokowanego na chromosomie 8p23.1 i analizowano transkrypty jej genu *env*. Obie sekwencje są ze sobą spokrewnione.

1.2.5.4. RODZINA HERV-R

HERV-R zwyczajowo zwany jest ERV-3, a swoistym dla niego tRNA, jest tRNA transportujący argininę. Uważa się, że integracja tej właśnie grupy endogennych retrowirusów z genomem naszych przodków zaszła przed 30 mln lat (Hervé i wsp., 2004). Obecnie występuje w genomie ludzkim w pojedynczej kopii (która była analizowana w niniejszej pracy) zlokalizowanej na chromosomie 7q11.2 (Kim i wsp., 2000 Kim i wsp., 2006), choć niektórzy autorzy uważają, że należy do nich zaliczyć także kilka innych powiązanych sekwencji (Andersson i wsp., 2005; Hervé i wsp., 2004). Najintensywniejsze badania dotyczące HERV-R dotyczą trofoblastu i rozwoju łożyska. Uważa się, że bierze on udział w inicjacji produkcji podjednostki β gonadotropiny kosmówkowej (hCG, ang. *human chorionic gonadotropin*) (Rote i wsp., 2004). Istnieją natomiast rozbieżne stanowiska dotyczące roli HERV-R w fuzji komórek oraz właściwości immunosupresyjnych (Rote i wsp., 2004; Villesen i wsp., 2004). Ekspresja HERV-R jest wykrywana w wielu niezmiennych chorobowo tkankach jak na przykład: w korze nadnerczy, gruczołach łojowych, jądrach, gruczole krokowym, grasicy oraz macicy (Andersson i wsp., 1996; Andersson i wsp., 2002; Rote i wsp., 2004; Kim i wsp., 2006). Warto zaznaczyć, że wiele z wymienionych tkanek produkuje hormony, bądź jest wrażliwych na ich działanie.

1.2.5.5. RODZINA HERV-W

Rodzina HERV-W występuje w genomie w 40-115 powtórzeniach, a swoistym dla jej członków tRNA jest tRNA transportujący tryptofan. Większość z nich utraciła zdolność do kodowania białek. Rodzina ta pierwotnie była przedmiotem zainteresowania badaczy głównie ze względu na wykrywanie jej transkryptów w łożysku. Szczegółowe badania dowiodły, że gen *env* HERV-W zlokalizowanego na chromosomie 7q21 koduje funkcjonalne białko o masie 80 kDa, zwane syncytyną. Jego wzmożoną ekspresję wykazano w trofoblaście w czasie formowania syncytiotrofoblastu. W badaniach przeprowadzanych na hodowlach komórkowych wykazano właściwości fuzyjne syncytyny, prowadzące do powstawania syncytiów (Villesen i wsp., 2004; Mayer i Meese, 2005; Muir i wsp., 2006; Kudaka i wsp., 2008). W niniejszym badaniu amplifikacji poddano właśnie fragment genu syncytyny

1.2.6. REGULACJA EKSPRESJI

Jak zaznaczono wcześniej większość HERV nie ulega ekspresji, ze względu na liczne mutacje, ale także ze względu na wyciszające działanie mechanizmów epigenetycznych, jak np. metylacja DNA. Jednak te z nich, które są aktywne transkrypcyjnie, podlegają regulacji ekspresji. Niektóre sekwencje HERV podatne są na działanie promieniowania X lub UV (Zwolińska, 2006). Ważnymi regulatorami ekspresji omawianych sekwencji są też glukokortykosteroidy.

Część sekwencji HERV, które znajdują się w obrębie genów, regulowana jest przez czynniki transkrypcyjne, oddziałujące na te geny. Ponadto, dane piśmiennicze wskazują, że ich aktywność transkrypcyjna zależy także od działania pirymidyn halogenowych czy też cytokin prozapalnych. Wykazano aktywacyjne działanie $\text{INF-}\alpha$ na transkrypcję genu *env-HERV-K18* (Stauffer i wsp., 2001) czy też $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$ oraz $\text{IL-1}\beta$ na transkrypcję HERV-R w komórkach endotelialnych (Zwolińska, 2006).

Aktywność HERV jest także regulowana przez wirusy egzogenne. Uważa się,

że wirus Epsteina-Barr (EBV- ang. Epstein-Barr virus) powoduje wzmożoną transkrypcję genu *env* HERV-K18, który to jest zlokalizowany jest na chromosomie 1 w obrębie intronu genu CD48, kodującego superantygen specyficzny dla $V\beta7^+$ oraz $V\beta13^+$ limfocytów T (Sutkowski i wsp. 2001; Posnett i Yarilina, 2001). Takie zjawisko tłumaczyłoby aktywację limfocytów T $V\beta13^+$ przez EBV, ponieważ jak dotąd nie udało się zidentyfikować bezpośredniego antygeny EBV (Nelson i wsp., 2004). Uważa się, że wirusy egzogenne z różnych rodzin mogą działać transaktywacyjnie wobec HERV, np.: badania potwierdzają, że cytomagallowirus aktywuje HERV-K, jeden z wirusów grypy zwiększa stężenie białek *env* HERV-W w komórkach neuroepitelialnych, natomiast pod wpływem herpeswirusów dochodzi do ekspresji HERV-H (Nellåker i wsp., 2006; za: Zwolińska, 2006; Brudek i wsp., 2007).

Prowadzone jak dotąd badania nad transaktywacyjną rolą wirusów egzogennych dotyczą w większości patofizjologii stwardnia rozsianego. Jednak biorąc pod uwagę stopień podobieństwa sekwencji HERV w obrębie rodzin oraz dane epidemiologiczne ukazujące rozpowszechnienie HSV (*herpes simplex virus*) (jest nim zakażonych nawet do 90% populacji) (Chayavichitsilp i wsp., 2009; Walkowiak i Żaba, 2011), należy wziąć pod uwagę inne choroby o podłożu autoimmunizacyjnym, w których możliwy patogenetyczny wpływ ekspresji endogennych retrowirusów jest postulowany od wielu lat (Christensen, 2005).

ROZDZIAŁ 2. HIPOTEZA BADAWCZA

Ludzkie endogenne retrowirusy mogą wpływać na funkcjonowanie organizmu oraz wykazują potencjalne właściwości inicjacji procesów immunizacyjnych, przez co mogą mieć udział w etiopatogenezie łuszczycy.

Zakażenie wirusem *herpes simplex* może prowadzić do transaktywacji HERV.

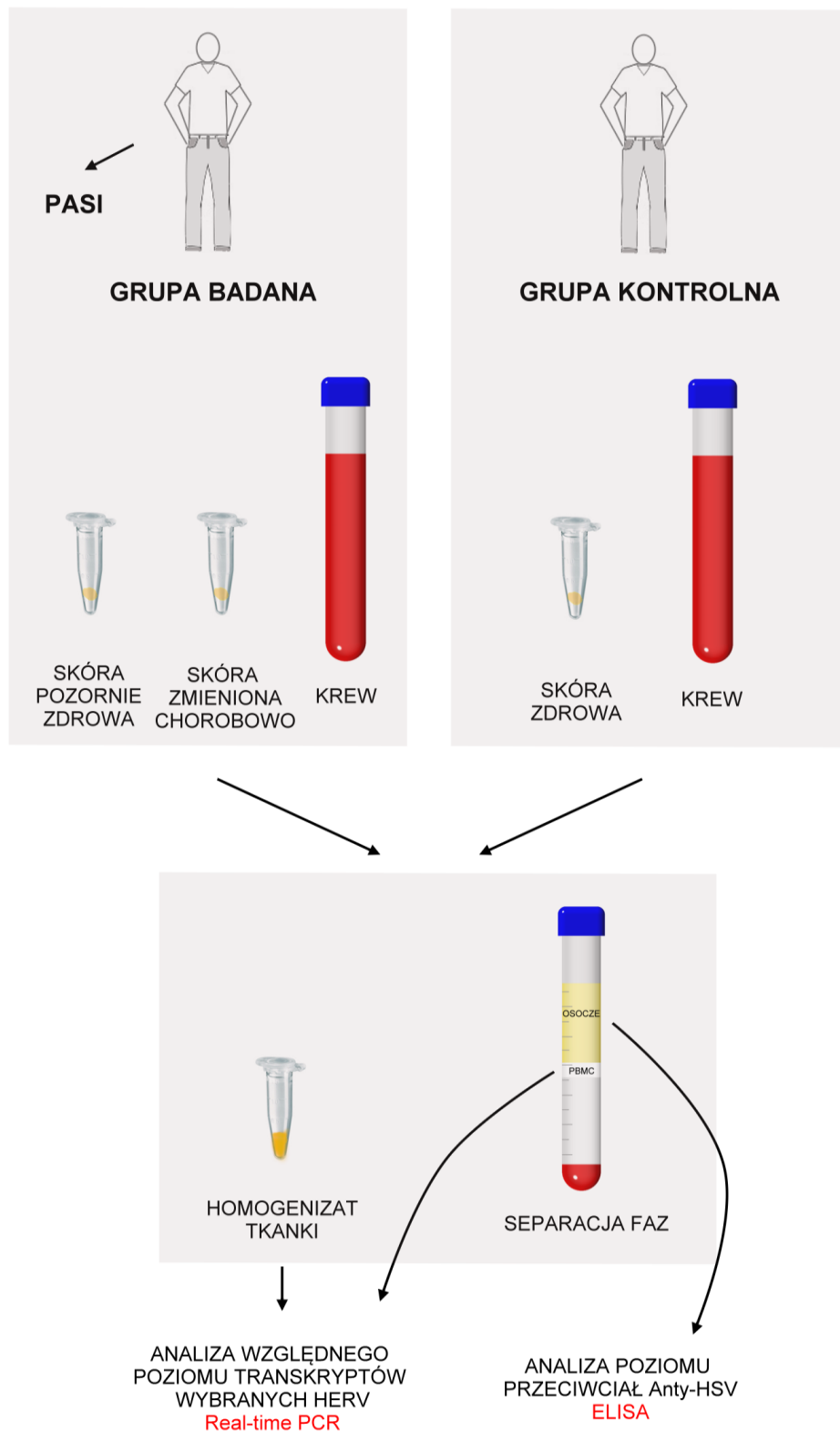
ROZDZIAŁ 3. CELE PRACY

Celem badawczym jest odpowiedź na następujące pytania:

1. Jaki jest względny poziom transkryptów HERV u osób chorych na łuszczycę i osób zdrowych w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz w skórze?
2. Czy istnieje istotna statystycznie różnica we względnym poziomie transkryptów wybranych HERV pomiędzy skórą zmienioną chorobowo oraz pozornie zdrową osób chorych na łuszczycę?
3. Czy istnieje istotna statystycznie różnica we względnym poziomie transkryptów wybranych HERV pomiędzy osobami chorymi na łuszczycę a zdrowymi?
4. Czy istnieje istotna statystycznie różnica we względnym poziomie transkryptów wybranych HERV pomiędzy osobami w różnych stadiach zakażenia *herpes simplex*?
5. Czy istnieje istotna statystycznie różnica we względnym poziomie transkryptów wybranych HERV pomiędzy osobami o różnym przebiegu klinicznym łuszczycy?

ROZDZIAŁ 4. MATERIAŁ I METODY

4.1 UKŁAD DOŚWIADCZENIA



Rycina 4.1. Układ doświadczenia

Źródło: Opracowanie własne

4.2.GRUPY BADAWCZE

Badaniem objęto 45 pacjentów Katedry i Kliniki Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z klinicznym rozpoznaniem łuszczycy potwierdzonym wynikiem badania histopatologicznego. W chwili pobierania materiału do badań oraz w 6 miesięcznym okresie poprzedzającym choroby leczeni byli jedynie miejscowo. Od 24 osób z grupy badanej pobrano krew obwodową oraz 2 biopaty: jeden ze skóry chorobowo zmienionej, a drugi ze skóry pozornie zdrowej. Od pozostałych 21 osób pobrano tylko krew obwodową.

Wyróżniono 2 grupy kontrolne:

- 45 zdrowych ochotników, od których pobrano krew obwodową
- 14 chorych na nowotwory nie wykazujących związków ze skórą. W trakcie zabiegów chirurgicznych, do których wskazaniem była choroba podstawowa pobrano wycinki skóry.

4.3.PROCEDURA BADAŃ

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (zgoda nr 144/11). Wszyscy uczestnicy wyrazili dobrowolną pisemną zgodę na wzięcie w nich udziału. Pobranie materiału od osób chorych na łuszczycę oraz krwi osób z grupy kontrolnej odbywało się w Klinice Dermatologii UMP, natomiast wycinki skóry osób z grupy kontrolnej pobierane były w Wielkopolskim Centrum Onkologii.

4.4.MATERIAŁ BADAWCZY

Podstawowy materiał badawczy w niniejszej pracy stanowiły krew obwodowa oraz wycinki skóry. Wycinki skóry o wielkości nieprzekraczającej 5 mm pobierano przy pomocy skalpela oraz igły, niezwłocznie przenoszono do probówki typu Eppendorf 2,0 ml

i zamrażano w ciekłym azocie. Do czasu wykonywania izolacji RNA materiał przechowywano w -80°C .

Krew (o objętości od 5-9 ml) pobierano w warunkach laboratoryjnych do jałowych, jednorazowych probówek-strzykawek (S-Monovette[®], Sarstedt, Niemcy) zawierających antykoagulant, EDTA. Następnie, w celu pozyskania komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC, ang. *peripheral blood mononuclear cells*) wirowano krew w gradiencie gęstości (Histopaque[®] 1077, Sigma-Aldrich[®] Inc., USA). W jałowych probówkach o objętości 15 ml (Eqimed, Polska) na warstwę fikolu (6 ml) delikatnie наносono 5 ml, uprzednio wymieszanej krwi. Następnie probówki wirowano (800g, 40 min., 22°C) w celu rozdzielenia faz.

Po wirowaniu przenoszono 1,5 ml osocza (górnej fazy) do 3 probówek i zamrażano w -80°C do czasu wykonywania oznaczeń immunoenzymatycznych. PBMC pobierano z granicy faz osocze/fikol, przenoszono do jałowej probówki, uzupełniano 1 x PBS (ang. Phosphate buffered saline) (Instamed 9.55 g/l PBS Dulbecco without $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, Biochrom AG, Niemcy) do objętości 1,5 ml, a następnie wirowano (450 g, 10 min., 22°C). Po usunięciu supernatantu rozpoczynano procedurę izolacji RNA.

4.5. IZOLACJA RNA

Izolację całkowitego RNA przeprowadzono według procedury opracowanej przez Chomczyńskiego i Sacchi na drodze ekstrakcji fenolowo-chloroformowej oraz precypitacji alkoholem (Chomczyński, 1987). W przypadku izolacji RNA z PBMC, po usunięciu supernatantu (por. 4.3.) dodawano 1 ml odczynnika Tri Pure Isolation Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Niemcy) i pipetowano kilkakrotnie do uzyskania całkowitej lizy komórek. Dla zapewnienia całkowitej dysocjacji kompleksów nukleoproteinowych, próby inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej. W celu wyizolowania RNA z biopsji skóry, fragmenty tkanek homogenizowano, nie dłużej niż 5 min, w 1ml odczynnika Tri

Pure Isolation Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Niemcy), przy pomocy urządzenia TissueLyser LT (Qiagen, USA) z zastosowaniem kulek metalowych (por Ryc. 4.2).



Rycina 4.2. TissueLyser LT
Źródło: Opracowanie własne

Po zakończonej homogenizacji próby zamrażano w -80°C . Po ich rozmrożeniu, wirowano (20000 g, 3 min, 2°C) w celu usunięcia pozostałego osadu tkanek i zbierano supernatant. Dalsze etapy procedury przeprowadzano identycznie dla obydwu wyjściowych materiałów.

Dodawano 200 μl chloroformu (Poch, Polska), wortexowano, inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej, po czym wirowano w chłodzonej wirówce (12000 g, 12 min, 2°C). Od tego momentu, wszystkie etapy procedury przeprowadzane były na lodzie. Wirowanie pozwalało na wyodrębnienie 3 faz (por. Ryc. 4.3.):

- czerwonej, organicznej - dolnej,
- białej interfazy,
- bezbarwnej wodnej - górnej, zawierającej RNA.



Rycina 4.3. Izolacja RNA wg procedury opracowanej przez Chomczyńskiego i Sacchi

Źródło: Opracowanie własne

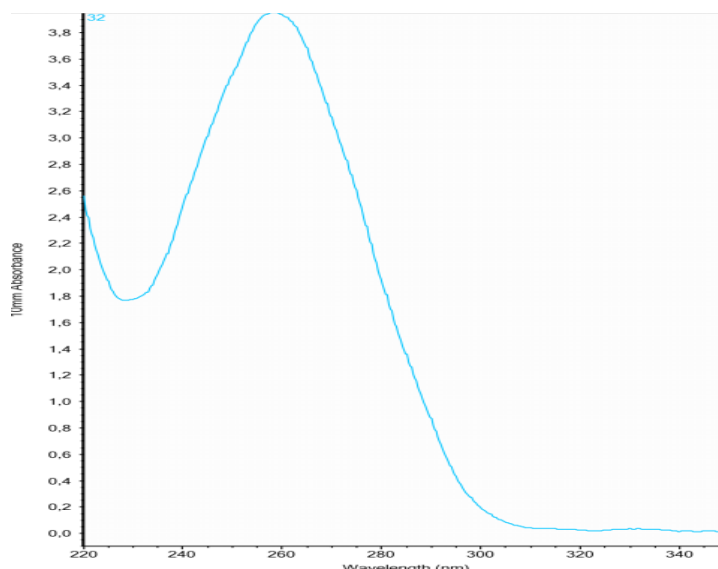
Fazę wodną (ok. 450 μ l) przenoszono do nowej probówki, nie naruszając pozostałych faz. Aby zprecypitować RNA dodawano 500 μ l izopropanolu (Poch, Polska), worteksowano i zamrażano w -80°C do czasu rozpoczęcia dalszych etapów izolacji. Warto zaznaczyć, że mrożenie jest odstępstwem od standardowej procedury, zwiększającym wydajność procesu izolacji. Po rozmrożeniu prób (na lodzie) probówki wirowano (12000 g, 12 min, 2°C) i ostrożnie zlewano izopropanol, tak aby nie wylać osadu RNA (por. Ryc. 4.3.). Następnie dodawano 1 ml 75% Et-OH (Poch, Polska), worteksowano i poddawano kolejnemu wirowaniu (20000 g, 10 min, 2°C). W kolejnym kroku odciągano znad osadu etanol i suszono otwarte probówki pod szafą laminarną, w termobloku w temperaturze 37°C , przez 10 min. Następnie rozpuszczano osad w 20 μ l wody wolnej od nukleaz (50°C , 15 min).

Następnie dokonywano analizy ilościowej i jakościowej preparatów RNA. Wykonywano pomiar spektrofotometrem Nanodrop c2000 (Thermo Fisher Scientific, USA), którego oprogramowanie umożliwia uzyskanie w bardzo szybkim czasie wartości istotnych parametrów dla wykonania oceny jakościowej i ilościowej. RNA ma maksimum absorpcji przy długości fali 260 nm, natomiast stosunek absorbancji A_{260}/A_{280} używany jest do oceny czystości kwasu rybonukleinowego i powinien on zawierać się między 1,8-2,0. Równie ważnym, choć niestety niekiedy pomijanym jest wskaźnik A_{260}/A_{230} świadczący o zanieczyszczeniach solami chaotropowymi, białkami lub resztkami fenolu,

który także powinien być bliski 2,0 (Jura & Słomski, 2004; Biomedical Genomics, 2012) Tylko RNA o obydwu wskaźnikach bliskich wartościom 2,0 może być uznany za idealnie czysty.

Ze względu na obniżony w niektórych próbach stosunek absorbancji A_{260}/A_{230} , wyizolowane RNA przenoszono na kolumnienki ze złożem szklanym (High Pure RNA Isolation Kit, Roche Diagnostics GmbH, Niemcy) w celu uzyskania RNA wyższej jakości. Do wyizolowanego RNA dodawano 400 μ l buforu lizującego-wiążącego, wortexowano przez 15 s, nanoszono na kolumnienkę umieszczoną w probówce i wirowano (8000 g, 15 s, 22°C). Po wyjęciu kolumnienki, usuwano z próbki odwirowany płyn i ponownie umieszczano kolumnienkę w probówce. W celu uniknięcia zanieczyszczenia prób genomowym DNA, na kolumnienkę nakładano mieszaninę buforu do DNAzowania (90 μ l) oraz DNA-zy (10 μ l). Przeprowadzono 15 minutową inkubację w temperaturze pokojowej. Kolejne etapy procedury obejmowały trzy serie nanoszenia buforów przepłukujących i wirowań. W ostatnim kroku eluowano RNA do nowej próbki poprzez podanie na kolumnienkę 45 μ l wody wolnej od nukleaz i wirowanie (8000 g, 1 min, 22°C).

Dokonano także kolejnego pomiaru stężenia, celem określenia stopnia czystości wyizolowanego RNA oraz ilości potrzebnego RNA do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji. Wszystkie preparaty charakteryzowały się wskaźnikami A_{260}/A_{280} oraz A_{260}/A_{230} bliskimi wartości 2,0. Przykładową wizualizację wyniku pomiaru stężenia RNA, generowaną przez oprogramowanie spektrofotometru Nanodrop c2000 przedstawiono na Rycinie 4.4. W celu sprawdzenia rezultatu reakcji DNA-zowania, z każdą próbą RNA wykonano real-time PCR dla genu referencyjnego (reakcja kontrolna typu no-RT).



Rycina 4.4. Widmo absorpcji czystego preparatu RNA.

Źródło: Oprogramowanie spektrofotometru Nanodrop c2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Szesnaście prób RNA izolowanych z tkanek, w których stężenie RNA wahało się między 44 ng/μl a 109 ng/μl poddano precypitacji do objętości 12 μl, tak aby w reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystać 1,5 μg RNA. Do tego celu wykorzystano strącanie octanem sodu i niefluorescencyjnym barwnikiem (NF), który uwidacznia nawet bardzo małe ilości kwasów nukleinowych (NF Pellet Paint Co-precipitant, Novagen USA). Do 42 μl RNA dodawano 1,5 μl barwnika NF, 4,2 μl 3M octanu sodu oraz 84 μl absolutnego alkoholu etylowego, po czym wirowano (800 g, 10 min, 4°C). Usuwano supernatant, a do zabarwionego na kolor niebieskie osadu dodawano 84 μl 70% etanolu, worteksowano i ponownie wirowano. W kolejnym etapie, przeprowadzano analogiczne przemycie osadu używając 100% etanol. Po usunięciu supernatantu, RNA suszono w termobloku w temperaturze 37°C przez ok. 10 min (do całkowitego odparowania pozostałości etanolu). Następnie osad rozpuszczano w 12 μl wody wolnej od nukleaz (50°C, 15 min) i przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji.

4.6. ODWROTNA TRANSKRYPCJA

Po wyizolowaniu RNA konieczne jest przepisanie go na komplementarny DNA (cDNA, ang. *complementary DNA*). Do tego celu, wykorzystywano zestaw odczynników

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, Niemcy) zawierający odwrotną transkryptazę izolowaną z bakterii *E. coli*. W reakcji odwrotnej transkrypcji użyto sześci nukleotydowych starterów o losowych sekwencjach (ang. *random hexamers*). Każdorazowo reakcję przeprowadzano z 1,5 µg wyizolowanego RNA. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz przebieg kolejnych etapów reakcji przedstawiono w Tabeli 4.1. Przygotowany wg zaleceń producenta cDNA rozcieńczano dwukrotnie, dzielono na 5 alikwotów i przechowywano do momentu analizy metodą real-time PCR w temp -80°C.

Tabela 4.1. Przebieg reakcji odwrotnej transkrypcji oraz skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby

Składnik reakcji	Objętość (stężenie)
Startery heksamerowe	2 µl (2,5 µM)
RNA	zależna od próby
Woda	do objętości 13 µl
10 min 65°C – denaturacja	
Bufor reakcyjny 5x stężony	4 µl (1x)
dNTP	2 µl (1mM)
Odwrotna transkryptaza	0,5 µl (10 U)
RNA protektor	0,5 µl (20U)
10 min 25°C-inkubacja	
30min 55°C- odwrotna transkrypcja	
5 min 85°C – zatrzymanie reakcji, inaktywacja enzymów	

Źródło: Opracowanie własne

4.7. ANALIZA WZGLĘDNEGO POZIOMU TRANSKRYPTÓW METODĄ REAL-TIME PCR

Analizę względnego poziomu transkryptów wykonano techniką reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*) z użyciem funkcji absolutnej analizy ilościowej oraz krzywej standardowej wykorzystując instrument LightCycler 2.0 (Roche, Niemcy). Technika real-time PCR polega na monitorowaniu wzrostu fluorescencji po każdym cyklu reakcji, dzięki zastosowaniu systemów detekcyjnych opartych na związkach fluorescencyjnych.

W niniejszych badaniach zastosowano system detekcji z barwnikiem SYBR Green. Wykorzystuje się tutaj jego zdolność do niespecyficznego sekwencyjnie wiązania do małej bruzdy helisy DNA (za: Ciesielska i Sikorski, 2008). W stanie niezwiązanym barwnik ten nie wykazuje wykrywalnej fluorescencji, natomiast po przyłączeniu do dwuniciowego DNA jego fluorescencja znacznie wzrasta (od 100 do 1000 krotnie). Powstające po każdym cyklu reakcji nowo zsyntetyzowane nici DNA, stwarzają nowe miejsca wiązania dla barwnika, przez co obserwuje się wzrost fluorescencji (za: Ciesielska i Sikorski, 2008). Barwnik SYBR Green wzbudzany jest przez wiązkę o długości fali ok. 470 nm, natomiast fluorescencja szczytowana jest przy 530 nm.

Niewątpliwą zaletą zastosowania barwnika SYBR Green jest możliwość równoczesnego stosowania dowolnych par starterów, co zapewnia uniwersalność metody i relatywnie niższe koszty. Natomiast największą wadą jest możliwość wykrywania nieswoistych produktów reakcji PCR, wynikającą z niespecyficznego interkalowania SYBR Green w strukturę dwuniciowych kwasów nukleinowych. Oznacza to, że szczytowana w czasie reakcji fluorescencja, może pochodzić z połączenia barwnika z dowolną dwuniciową cząsteczką DNA (Ciesielska i Sikorski, 2008).

W celu potwierdzenia specyficzności uzyskanych produktów wykonuje się krzywą topnienia temperatury amplikonu. Temperatura topnienia (T_m) DNA, jest to taka temperatura, w której połowa helis ulega denaturacji. Jest ona specyficzna dla danej cząsteczki DNA i zależy od jej długości, stężenia oraz stosunku par GC. Dzięki wykonaniu krzywej topnienia amplikonu można potwierdzić swoistość uzyskanych produktów bez konieczności przeprowadzania analizy elektroforetycznej (Ciesielska i Sikorski, 2008). Topnienie produktu polega na jego ogrzaniu do wyznaczonej temperatury, podczas którego następuje gwałtowny spadek emitowanej fluorescencji, spowodowany denaturacją DNA i oddysocjowywaniem barwnika.

4.7.1. WYBÓR GENU REFERENCYJNEGO

Oznaczenie poziomu analizowanych transkryptów, wiąże się z uprzednim (jak zostało opisane powyżej) pobraniem materiału, izolacją RNA, reakcją odwrotnej transkrypcji oraz amplifikacją uzyskanego cDNA. Nie zawsze znana jest dokładna liczba komórek pobranych do badania, ponadto każdy z wymienionych etapów może przebiegać z różną wydajnością dla poszczególnych badanych prób i na każdym z nich możemy także tracić część uzyskanego materiału genetycznego. Aby uniknąć wyżej opisanych trudności przeprowadza się analizę względnego poziomu (RA, ang. *relative abundance*) transkryptów polegającą na wyrażeniu liczby transkryptów badanych sekwencji w przeliczeniu na liczbę kopii transkryptów genu referencyjnego w badanej, pojedynczej próbie. Jako geny referencyjne wykorzystuje się geny podstawowego metabolizmu (ang. *housekeeping gene*), zaangażowane w najistotniejsze procesy komórkowe (Eisenberg i Levanon, 2003). Ich ekspresja uznawana jest za stałą niezależnie od rodzaju tkanki (Romanowski, 2007), choć w ostatnim czasie przekonanie to bywa podważane (Barber i wsp., 2005)

W niniejszych badaniach wykorzystano gen referencyjny dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanowej (GAPDH, ang. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Jest on jednym z częściej używanym genów referencyjnych, cechującym się stałą ekspresją w poszczególnych tkankach, niezależnie od płci i wieku osób badanych (Barber i wsp.). Jest on opisywany jako adekwatny gen referencyjny w badaniach z wykorzystaniem zarówno PBMC, jak i biopsji skóry (Bonnet-Duquennoy i wsp., 2006; Pan i wsp., 2009; Zainuddin i wsp., 2010).

4.7.2. OPTIMALIZACJA REAKCJI

Reakcję dla każdej analizowanej sekwencji optymalizowano pod kątem doboru odpowiednich starterów, odpowiedniej temperatury przyłączania starterów, czasu elongacji oraz stężenia jonów magnezu. Specyfika używanych starterów determinuje temperaturę

przyłączania starterów, a długość amplikonu powstającego przy ich użyciu, czas elongacji, jak i temperaturę topnienia produktu (por. Tab. 4.2., Tab. 4.3.).

Tabela 4.2. Charakterystyka starterów użytych w real time PCR

Sekwencja	Sekwencja starterów/ temperatura przyłączania starterów/ stężenie MgCl ₂ / długość amplikonu		Referencje
GAPDH	F	CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG	Ensembl: ENST00000229239 Chr. 12p13.31 Namysł i wsp., 2005
	R	TTC TGG GTG GCA GTG ATG	
	C	59°C /3mM/105pz	
HERV-W env	F	TCA TAT CTA AGC CCC GCA AC	GenBank: AF072506.2 7q21.2 Namysł i wsp., 2005
	R	GAG GTT GTG ATA CCG CCA AT	
	C	54°C /4,75mM/ 103pz	
HERV-K10 gag	F	GTA ATG GCT CAG TCA ACG CA	GenBank: M14123 5q33.3 Namysł i wsp., 2005
	R	GCC CCA TTA ATT CTG GAC CT	
	C	59°C /3mM/103pz	
HERV-R pol env	F	GGG CCA ATT ATG CTT ACC AA	GenBank: M12140 Chr. 7q11.2 Namysł, 2006
	R	ATG GGC TGA TCT GGC TCT AA	
	C	54°C/3mM /98pz	
HERV-K env	F	CAC TTG GGT TAA GAC CAT TGG A	Retrosarch: Orf ID: 204173 HERV ID: 29013 Chr. 8p23.1
	R	GGA GCT GTT GAG T AC ACC TG	
	C	59°C/2mM /104pz	
HERV-E pol	F	GTC ATT TGT ATT CTA CCG GAG	Retrosarch: Orf ID: 8435 HERV ID: 1109 Chr. Xq21.32
	R	AAT ACT GCA AAG TTT GGG AC	
	C	57°C/4,75mM /101pz	
HERV-H (env62)	F	TAT GTC ATC CTC TAC CTC TCC C	GenBank: AJ289709.1 Chr. 2Q24.3
	R	CCA GCA GTT GTT CAC TAA GGA	
	C	54°C/3mM /101pz	
HERV-E (4-1) gag	F	CAC ATG GTG GAG AGT CGT GTT T	GenBank: M10976 Namysł i wsp., 2005
	R	GCT TGC GGC TTT TCA GTA TAG G	
	C	59°C/3mM /101pz	

Źródło: Opracowanie własne

(**F** – sekwencja startera przedniego, **R** – sekwencja startera wstecznego **C**-charakterystyka reakcji i jej produktu - podano temperaturę przyłączania starterów, stężenie magnezu oraz długość amplikonu)

Przeprowadzono szereg real-time PCR z użyciem cDNA prób testowych. Optymalne warunki określano na podstawie wyników rozdzielania elektroforetycznego uzyskanych produktów PCR w 1,5% żelu agarozowym (1x TBE) oraz analizy temperatury topnienia amplikonu.

Tabela 4.3. Warunki real-time PCR

Etapy reakcji	Temperatura	Czas	Liczba cykli	Analiza
Inkubacja	50°C	4 min	1	
Wstępna denaturacja i aktywacja polimerazy	95°C	10 min	1	
Denaturacja	95°C	10 s		
Przylączenie starterów	w zależności od analizowanej sekwencji	8 s	50	
Elongacja produktu	72°C	5 s		Detekcja sygnału po każdym cyklu
Topnienie produktu	72°C → 95°C	5min	1	Ciągła detekcja sygnału
Chłodzenie	50°C	30 s	1	

Źródło: Opracowanie własne, na podstawie Instrukcji LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I

4.7.3. WYZNACZANIE KRZYWYCH KALIBRACYJNYCH

Następnie wykonano krzywe standardowe, według opisanych poniżej etapów:

- 1) Real-time PCR ze staterami specyficznymi dla analizowanej sekwencji.
- 2) Oczyszczenie produktów reakcji PCR przy pomocy zestawu innuPREP PCRpure Kit (Analytik Jena, Niemcy). Produkty PCR, nanoszono na kolumnkę filtracyjną ze złożem, dodawano 500 µl buforu wiążącego, mieszano i poddawano wirowaniu (10000 g, 2 min, 22°C). W następnym etapie eluowano DNA do nowej probówki poprzez podanie na kolumnkę 20 µl buforu elucyjnego, minutową inkubację i wirowanie (6000 g, 1 min, 22°C).
- 3) Pomiar spektrofotometryczny stężenia wyizolowanego DNA (Qubit® 1.0, Invitrogen, USA). Znając stężenie dwuniciowego DNA, długość (liczbę par zasad) oraz sekwencję amplikonu obliczano liczbę kopii transkryptu (liczbę kopii cząsteczek w 1 µl) wg poniższego wzoru:

$$\text{LKT}[\text{l.c./}\mu\text{l}] = \frac{\text{stężenie DNA}[\text{g/}\mu\text{l}] * 6,0221367 \times 10^{23}[\text{l.c./mol}]}{\text{średnia masa pary zasad azotowych}[\text{g/mol}] * \text{pz}}$$

gdzie:

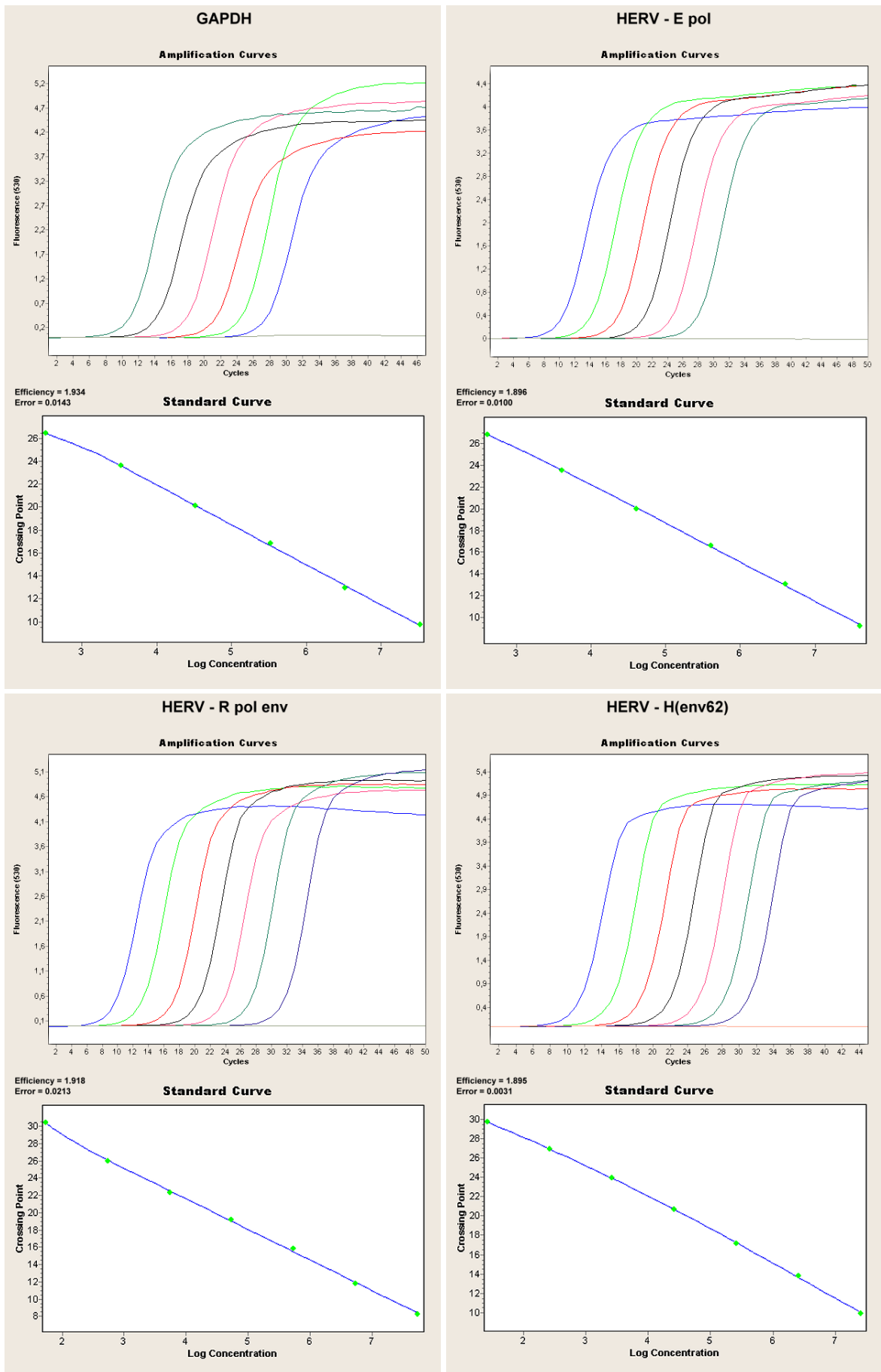
LKT- liczba kopii transkryptu

pz- liczba par zasad azotowych w amplikonie

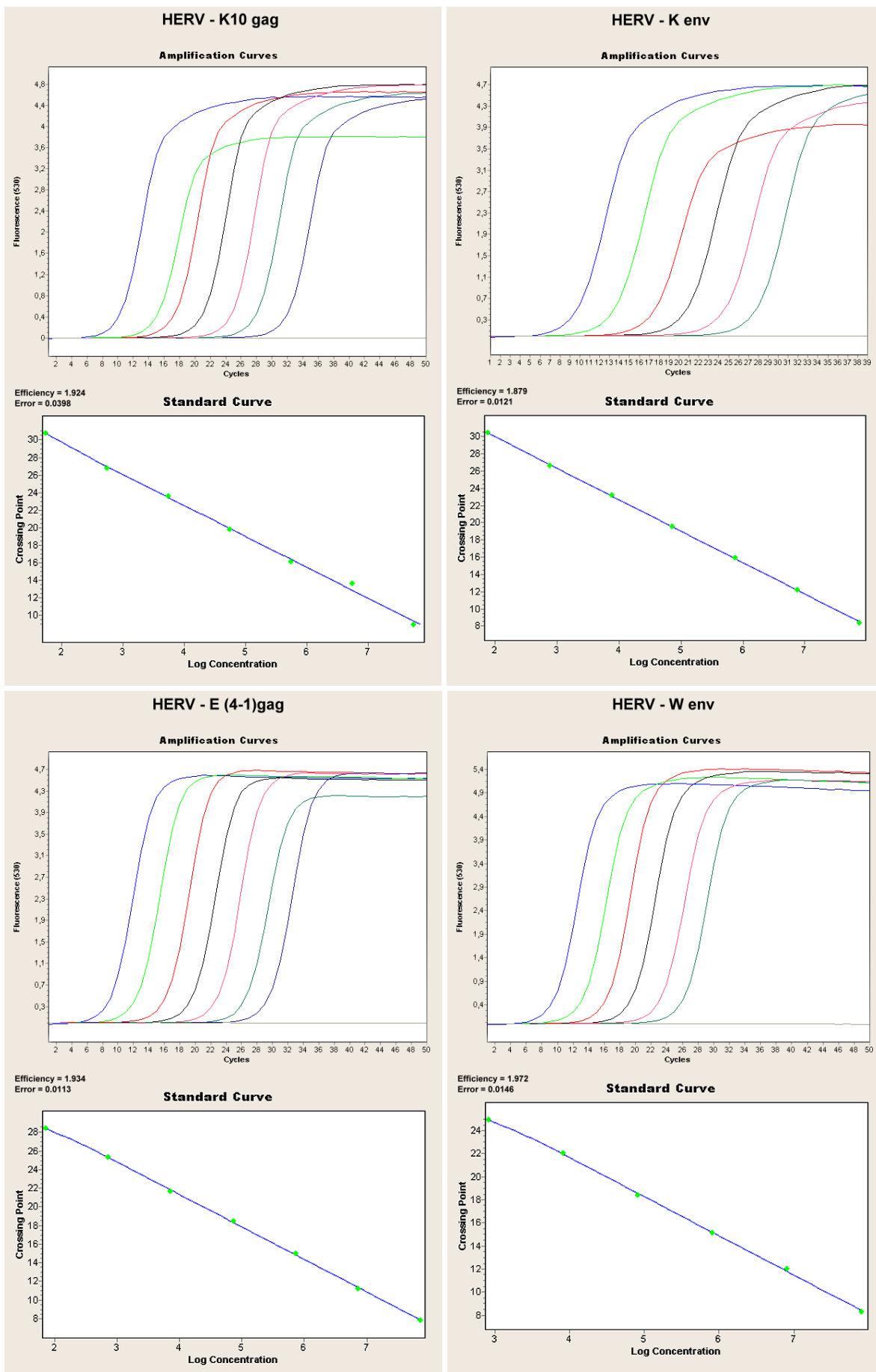
l.c.- liczba kopii transkryptu

- 4) Sporządzenie serii 10 krotnych rozcieńczeń, dodając 10 μl roztworu o znanej liczbie kopii (standard) i 90 μl wody.
- 5) Wykonanie real-time PCR z wykorzystaniem standardów jako matryc.
- 6) Wykreślenie krzywych standardowych. Po wprowadzeniu do oprogramowania informacji na temat stężenia każdego ze standardów użytych w real-time PCR, automatycznie zostały wygenerowane krzywe standardowe.

Dla każdej analizowanej sekwencji tworzono oddzielną krzywą standardową, która służyła jako punkt odniesienia dla wyników uzyskiwanych w real-time PCR. Na Rycinach 4.5. oraz 4.6. przedstawiono krzywe wzrostu logarytmicznego serii kolejnych 10 krotnych rozcieńczeń oraz krzywe standardowe analizowanych sekwencji.



Rycina 4.5. Krzywe wzrostu logarytmicznego oraz krzywe standardowe genu GAPDH, sekwencji HERV-E pol, HERV-R pol env, HERV-H (env62)
 Źródło: Opracowanie własne, na podstawie krzywych wygenerowanych przez oprogramowanie urządzenia LighCycler 2.0.



Rycina 4.6. Krzywe wzrostu logarytmicznego oraz krzywe standardowesekwencji HERV-K10 gag, HERV-K env, HERV-E (4-1) gag, HERV-W env

Źródło: Opracowanie własne, na podstawie krzywych wygenerowanych przez oprogramowanie urządzenia LighCycler 2.0.

4.7.4. REAL-TIME PCR

W celu wykonania reakcji wykorzystano zestaw odczynników LightCycler[®] FastStart DNA Master SYBR Green (Roche Diagnostics GmbH, Niemcy). W przypadku wykonywania real-time PCR dla analizowanych prób, dodawano do mieszaniny reakcyjnej opcjonalny składnik: uracylo-N-glikozylazę (UNG) (Uracil-DNA Glycosylase, Fermentas, USA) oraz przeprowadzano dodatkowy wstępny etap reakcji umożliwiający zadziałanie enzymu. Enzym ten poprzez hydrolizowanie wiązania pomiędzy uracylem a resztą deoksyrybozy zapobiega kontaminacji kolejnych prób produktami poprzednich PCR. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki real-time PCR przedstawiono w Tabeli 4.3. oraz Tabeli 4.4.

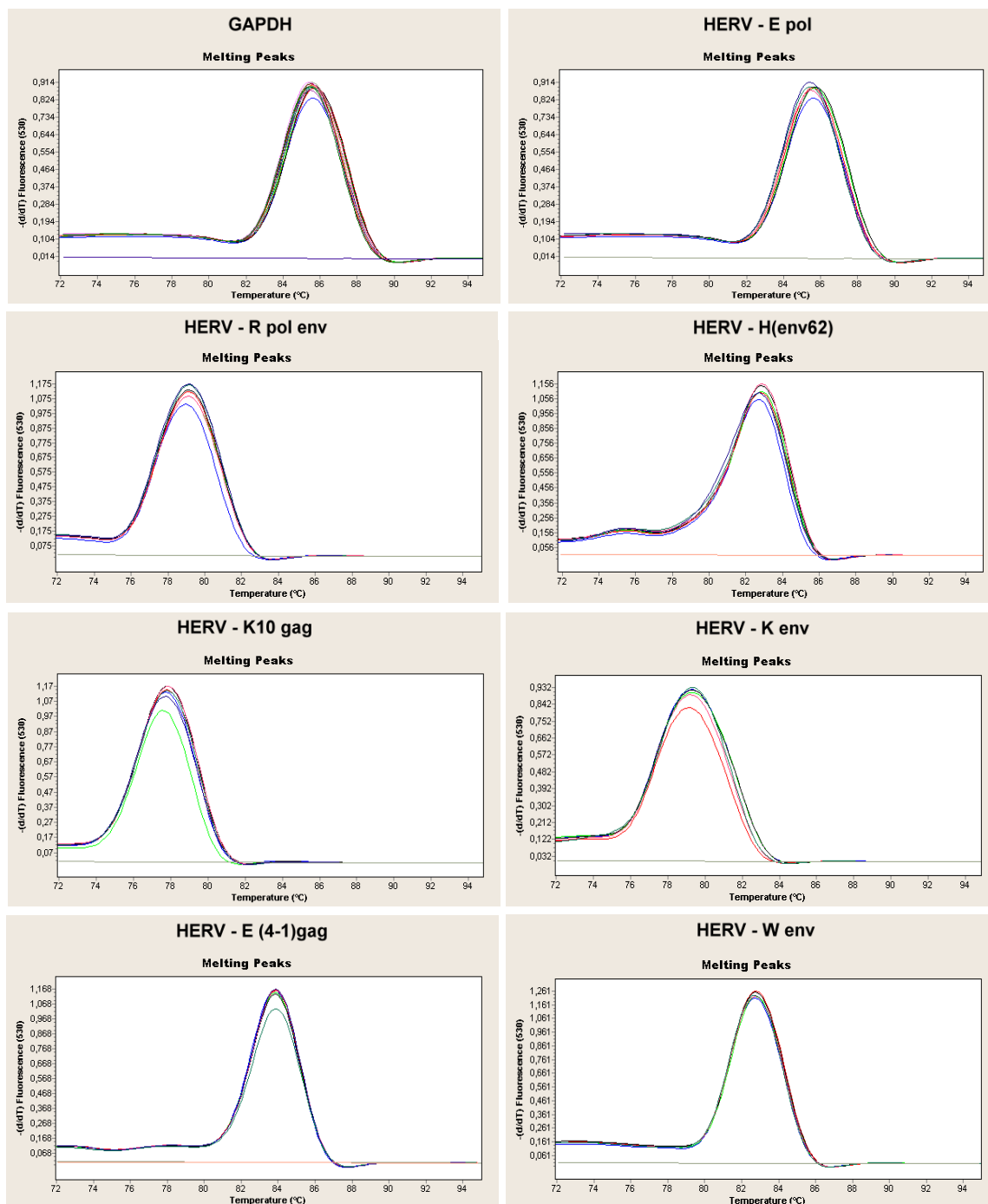
Tabela 4.4. Skład mieszaniny reakcyjnej w real-time PCR w przeliczeniu na jedną próbę

Składnik reakcji	Objętość (stężenie)
cDNA	1 µl
Starter F	1 µl (5 µM)
Starter R	1 µl (5 µM)
LightCycler [®] FastStart DNA Master Sybr Green I	1 µl (1x)
MgCl ₂	w zależności od analizowanej
UNG	0,1 µl

Źródło: Opracowanie własne, na podstawie Instrukcji LightCycler[®] FastStart DNA Master SYBR Green I

Każda próba cDNA amplifikowana była zarówno ze starterami dla analizowanych sekwencji HERV, jak i dla genu referencyjnego w dwukrotnych powtórzeniach. Wszystkie reakcje przeprowadzane były w osobnych kapilarach. Real-time PCR z użyciem instrumentu LightCycler 2.0 mogło obejmować każdorazowo maksymalnie 32 kapilary, co wynika z liczby miejsc w urządzeniu. W każdej z przeprowadzanych reakcji, oprócz badanych prób, do jednej z kapilar zamiast matrycy cDNA dodawano próbkę kalibracyjną- odpowiedni standard o znanym stężeniu oraz kontrolę negatywną- wodę (brak cDNA). Przez odniesienie mierzonego poziomu fluorescencji w pojedynczej kapilarze, do wyznaczonej krzywej kalibracyjnej z uwzględnieniem informacji o stężeniu standardu oprogramowanie obliczało stężenie początkowe matrycy. To z kolei umożliwiało

obliczenie względnego poziomu transkryptów, przez wyrażenie liczby transkryptów w badanej próbce (średnia arytmetyczna z dwóch reakcji) na milion kopii transkryptów genu GAPDH w tej samej próbce (średnia arytmetyczna z dwóch reakcji). W każdej real-time PCR wykonywano także opisaną powyżej krzywą topnienia temperatury amplikonu, celem sprawdzenia specyficzności reakcji. Piki topnienia (ang. *melting peaks*) (zilustrowane jako spadek fluorescencji) analizowanych amplikonów zaprezentowano na Rycinie 4.7.



Rycina 4.7. Piki topnienia amplikonów analizowanych sekwencji

Zródło: Opracowanie własne, na podstawie krzywych wygenerowanych przez oprogramowanie urządzenia LighCycler 2.0

4.8. BADANIE PRZECIWCIAŁ KRAŻĄCYCH IGM, IGG ORAZ IGA SKIEROWANYCH PRZECIWKO *HERPES SIMPLEX 1/2*

Poziomy przeciwciał w klasie M, G oraz A przeciwko wirusowi *herpes simplex* typu I oraz II oznaczono w osoczach z zastosowaniem immunoenzymatycznych testów fazy stałej (ELISA, ang. *enzyme linked immunosorbent assay*). Wykorzystano do tego celu zestawy dostępne komercyjnie, odpowiednio: Herpes 1/2 IgM ELISA (Demeditec Diagnostics, Niemcy), Herpes 1/2 IgG ELISA (Demeditec Diagnostics, Niemcy), Herpes 1/2 IgA ELISA (Demeditec Diagnostics, Niemcy).

Do przeprowadzenia oznaczeń użyto próbek osocza rozcieńczonych w stosunku 1:101 w roztworze rozcieńczającym (*sample diluent*) załączonym do zestawu. Do kolejnych dołków płytki mikrotitracyjnej opłaszczonej antygenem HSV1/2, наносono po 100 µl roztworów standardowych o znanych stężeniach dołączonych do zestawu oraz osocze. Każdorazowo pozostawiono jedną pustą studzienkę, w celu wykonania próby ślepej substratu (*substrate blank*). Następnie płytkę mikrotitracyjną inkubowano bez dostępu światła (60 min, temperatura pokojowa). Po opróżnieniu studzienek i przeprowadzeniu trzykrotnego płukania (300 µl *wash solution*) наносono po 100 µl sprzężonych z peroksydazą chrzanową króliczych przeciwciał przeciwko ludzkim IgM, IgG lub IgA (w zależności od zestawu) i inkubowano w takich samych warunkach. Po opróżnieniu studzienek i przeprowadzeniu trzykrotnego płukania (300 µl *wash solution*) do wszystkich dołków (także próby ślepej) наносono po 100 µl substratu dla peroksydazy chrzanowej i inkubowano w temperaturze pokojowej bez dostępu światła przez 20 minut. W celu zatrzymania reakcji do wszystkich studzienek płytki mikrotitracyjnej dodawano 100 µl odczynnika przerywającego reakcję (*stop solution*). Na Rycinie 4.8. przedstawiono widok płytki 96-dołkowej wykorzystywanej w teście ELISA z uwidocznioną reakcją barwną, powstałą na skutek reakcji utleniania tetrametylobenzydiny katalizowanej przez peroksydazę chrzanową.

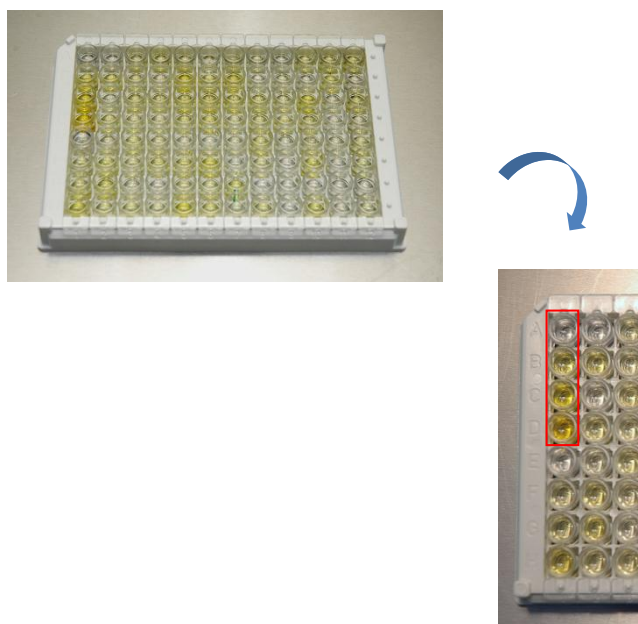
Po zatrzymaniu reakcji dokonano fotometrycznej oceny wyniku przy długości fali 450 nm oraz fali referencyjnej 620 nm czytnikiem mikroplatek Epoch (BioTek, USA), wyposażonym w oprogramowanie Gen5. Pomiar dokonywany był dla wszystkich

studzienek płytki mikrotitracyjnej, także próby ślepej i roztworów standardowych o znanym stężeniu przeciwciał. Urządzenie generowało krzywą standardową uwzględniając absorbancję próby ślepej, a odnosząc do niej uzyskane wyniki dokonywało obliczenia stężeń przeciwciał w każdej badanej próbce osocza.

W prezentowanych badaniach, jako punkt odcięcia przyjęto zgodnie z zaleceniem producenta stężenie 10 U/ml dla wszystkich opisywanych testów. Zastosowano następujące kryteria interpretacyjne:

stężenie < 10 U/ml – wynik ujemny

stężenie > 10 U/ml- wynik dodatni



Rycina 4.8. Reakcja barwna w teście ELISA

(Kolorem czerwonym oznaczono standardy o zwiększającym stężeniu.)

Źródło: Opracowanie własne

Na podstawie wyników uzyskanych w teście ELISA, każdą z osób zakwalifikowano do podgrupy wyróżnionej ze względu na stadium zakażenia (por. Tab. 4.5.). Zastosowano kryteria interpretacyjne na podstawie danych piśmienniczych (Morris i wsp., 1985; Juto i Settergren, 1988; Hashido i Kawana, 1997, Viomecum, 2012).

Tabela 4.5. Kryteria stosowane w określaniu stadium zakażenia *herpes simplex*

IgG	IgM	IgA	Interpretacja
-	-	-	Brak zakażenia
+	-	-	Zakażenie latantne
-	+	+/-	Zakażenie pierwotne
+	+	+	Ostre zakażenie pierwotne/ zakażenie wtórne
+	-	+	Zakażenie wtórne

Źródło: Opracowanie własne na podstawie Morris i wsp., 1985; Juto i Settergren, 1988; Hashido i Kawana, 1997, Viomecum, 2012

4.9. OCENA STANU KLINICZNEGO

Oceny stanu klinicznego dokonano z użyciem obserwacyjnej „Skali oceny nasilenia łuszczycy” (PASI- ang. Psoriasis Area and Severity Index) (Tab. 4.6.). W pierwszym kroku dokonywano oceny nasilenia trzech objawów skórnych typowych dla łuszczycy: złuszczenia, rumienia i nacieku (0 -brak objawów; 4 -nasilenie bardzo ciężkie) oraz procentowego oszacowania powierzchni ciała zajętej zmianami chorobowymi na powierzchni głowy, tułowia, kończyn górnych oraz dolnych (Janowski, 2006; Schmitt i Wozel, 2005).

Tabela 4.6. Przykładowy arkusz oceny nasilenia łuszczycy z użyciem PASI

Część ciała	Rumień (0-4)	Łuska (0-4)	Naciek (0-4)	Powierzchnia ciała (%)
głowa				
tułów				
kończyny górne				
kończyny dolne				

Źródło: Opracowanie własne na podstawie Loudon i wsp., 2004

Następnie procent powierzchni ciała zajętej zmianami chorobowymi na każdej z wymienionych części przeliczano na punkty, wg poniższego przelicznika (Louden i wsp., 2004):

- 0 pkt- skóra niezmienniona;
- 1 pkt - poniżej 10% zajętej powierzchni;
- 2 pkt - 10% do 29% zajętej powierzchni;
- 3 pkt - 30% do 49% zajętej powierzchni;
- 4 pkt - 50% do 69% zajętej powierzchni;
- 5 pkt - 70% do 89% zajętej powierzchni;
- 6 pkt - 90% do 100% zajętej powierzchni.

Wynik PASI obliczano wg poniższego wzoru (Louden i wsp., 2004):

$$\text{PASI} = 0,1 (R_g + L_g + N_g)A_g + 0,2 (R_{kg} + L_{kg} + N_{kg})A_t + 0,3 (R_t + L_t + N_t)A_t + 0,4 (R_{kd} + L_{kd} + N_{kd})A_{kd}$$

gdzie:

R - RUMIEŃ (0-brak/1-lekki/2-umiarkowany/3-wyraźny/4-b. wyraźny)

L - ŁUSKA (0-brak/1-małe i niewiele/2-małe/3-wiele/4-duże i wiele)

N - NACIEK (0-brak/1-lekki/2-umiarkowany/3-głęboki/4-b. głęboki)

g - głowa

t - tułów

kg - kończyny górne

kd - kończyny dolne

A - wartość punktacji uzyskanej z przeliczenia procentowej powierzchni ciała objętej zmianami chorobowymi

Wyniki uzyskiwane na „Skali oceny nasilenia łuszczycy” mieszczą się w przedziale od 0 do 72 punktów. Im wyższy wynik, tym większe nasilenie zmian łuszczycowych. W niniejszej pracy przyjęto kryteria zaawansowania klinicznego choroby zaproponowane przez Schmitt i Wozel (2005), zgodnie z którymi wynik PASI poniżej 7 punktów charakteryzuje osoby o łagodnym przebiegu łuszczycy, wartości pomiędzy 7-12 przypisany jest umiarkowanemu natężeniu łuszczycy, natomiast wynik powyżej 12 oznacza przebieg ciężki.

4.10. STATYSTYCZNA ANALIZA DANYCH

Statystyczną analizę danych przeprowadzono z użyciem pakietu statystycznego SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc., USA). W opisie statystycznym uzyskanych wyników wykorzystano takie statystyki opisowe jak: średnia arytmetyczna, odchylenie standardowe, minimum oraz maksimum.

Normalność rozkładu wartości poszczególnych zmiennych sprawdzano testem Kolmogorowa-Smirnowa. W zależności od rozkładu, w dalszej analizie, do oceny istotności różnic stosowano test parametryczne (test t-Studenta dla prób niezależnych, test t-studenta dla prób zależnych) bądź nieparametryczne (test U Manna-Whitneya, test

znaków rangowanych Wilcoxon oraz test Kruskala-Wallisa). Natomiast w celu określenia siły związku między zmiennymi wykorzystywano współczynnik korelacji r-Spearmana.

Wyniki uznawano za istotne statystycznie, jeżeli założony poziom istotności p był mniejszy bądź równy 0,05.

ROZDZIAŁ 5. WYNIKI

5.1. STATYSTYCZNY OPIS UZYSKANYCH WYNIKÓW

5.1.1. CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ ORAZ GRUP KONTROLNYCH

W grupie badanej, o średniej wieku 46 lat, było 19 kobiet i 26 mężczyzn (por. Tab.5.1.). Najstarszy członek tej grupy miał 76 lat, a najmłodszy 19. Przeciętny wiek w pierwszej grupie kontrolnej, w której było 34 kobiet i 11 mężczyzn, wynosił 33 lata. Jej najmłodszy uczestnik miał 23 lata, a najstarszy 57. W drugiej grupie kontrolnej było 8 mężczyzn i 6 kobiet, a ich średnia wieku wynosiła 51 lat. Najstarszy członek tej grupy miał 85 lat, a najmłodszy 29.

Sprawdzono normalność rozkładu wartości wieku Testem Kołmogorowa-Smirnowa ($Z= 1,808$, $p= 0,003$). Rozkład wyników dla zmiennej wiek nie jest zgodny z rozkładem normalnym.

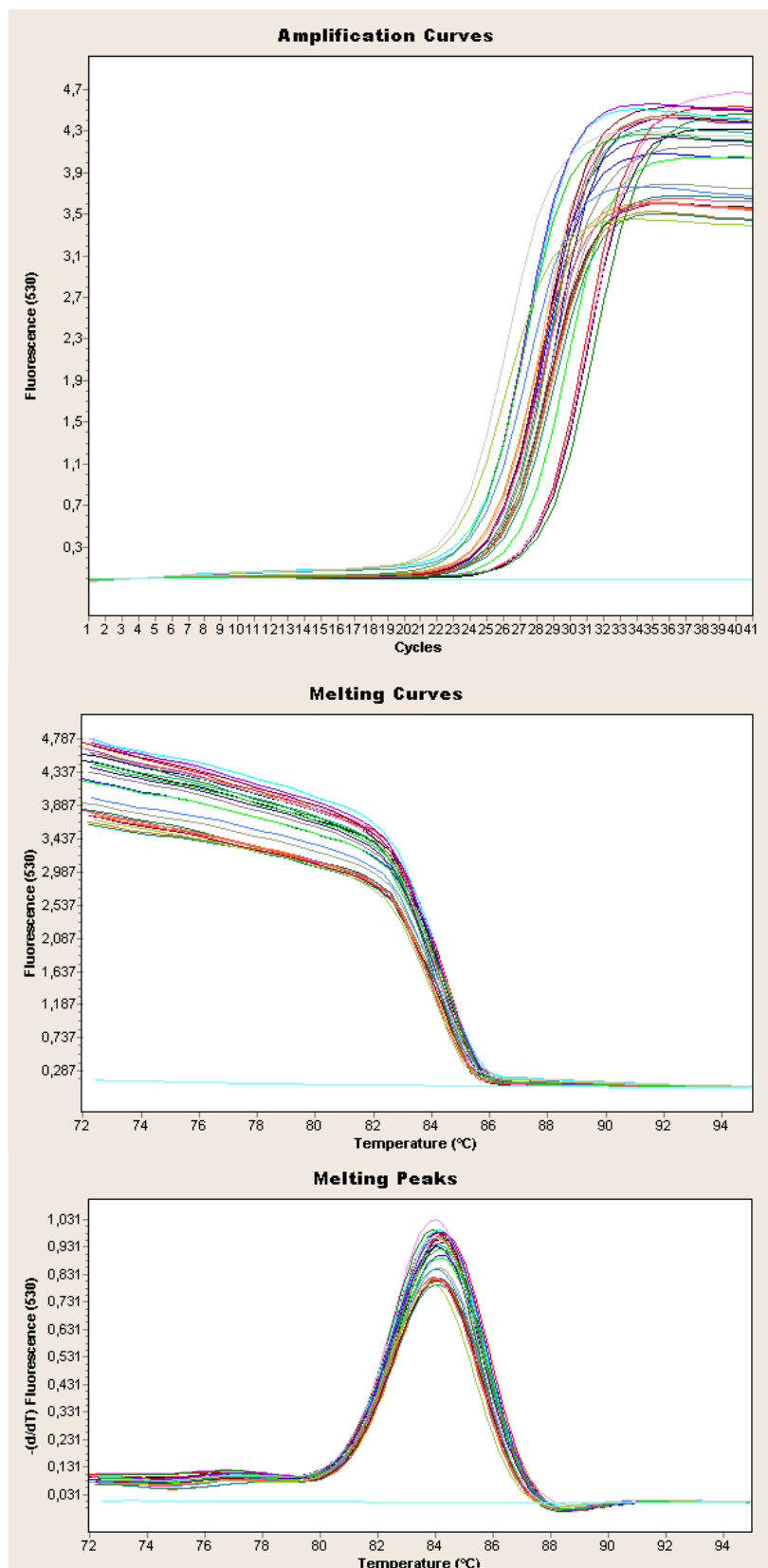
Tabela 5.1. Rozkład częstości zmiennej płeć

Płeć	Grupa badana (n=45)		Grupa kontrolna I (n=45)		Grupa kontrolna II (n=14)		Ogółem n=104	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Kobiety	19	42	34	76	6	43	59	57
Mężczyźni	26	58	11	24	8	57	45	43

Źródło: Opracowanie własne

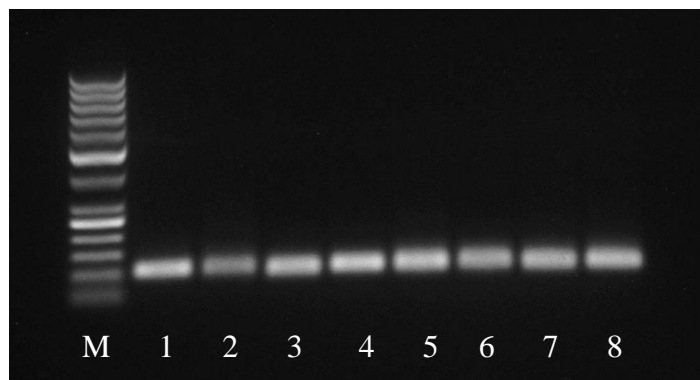
5.1.2. WZGLĘDNY POZIOM TRANSKRYPTÓW ANALIZOWANYCH SEKWENCJI HERV

Jak już zostało zaznaczone w rozdziale 4, analizę względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji wykonano wykorzystując technikę real-time PCR. Na Rycinie 5.1. przedstawiono przykładowy wynik uzyskiwany po przeprowadzeniu łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym, a na Rycinie 5.2. rozdział elektroforetyczny przykładowych amplikonów analizowanych sekwencji.



Rycina 5.1. Przykładowy wyniki uzyskiwany w real-time PCR (krzywa amplifikacyjna oraz krzywe topnienia ampliconu dla sekwencji HERV-E (4-1)

Źródło: Opracowanie własne, na podstawie krzywych wygenerowanych przez oprogramowanie urządzenia LighCycler 2.0



Rycina 5.2. Rozdział elektroforetyczny amplikonów analizowanych sekwencji w 1,5% żelu agarozowym
 (Na kolejnych ścieżkach: **M**:wzorzec wielkości (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Scientific) **1**:GAPDH; **2**:HERV-H (env62); **3**:HERV-R pol; **4**:HERV-E pol; **5**:HERV-E (4-1) gag; **6**:HERV-W env; **7**:HERV-K10 gag; **8**:HERV-K env)
Źródło: Opracowanie własne

Wartość statystyk opisowych względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji HERV w PBMC oraz w biopsjach skóry przedstawiono w Tabelach 5.2.-5.8 (por. Ryc.5.3.). Sprawdzone także normalność rozkładu wartości poszczególnych zmiennych Testem Kołmogorowa-Smirnowa. Wyniki umieszczono kolejno w Tabelach 5.2.-5.8. Rozkład wyników dla względnych poziomów transkryptów analizowanych sekwencji w PBMC nie jest zgodny z rozkładem normalnym. Natomiast w skórze zmienionej chorobowo, skórze pozornie zdrowej oraz w skórze zdrowej rozkład normalny mają jedynie wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV-E (4 1) oraz HERV-W env (por. Tab. 5.2-5.8).

Tabela 5.2. Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV-E pol

		N	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe	Z Kołmogorowa-Smirnowa	Istotność
PBMC	Grupa badana	45	793	50141	7534	9858	0,263	<0,001
	Grupa kontrolna	45	276	9725	2838	2258		
Skóra zmieniona chorobowo		24	144	3384	1012	697	0,202	0,020
Skóra pozornie zdrowa		24	1460	18915	8043	5196	0,207	0,011
Skóra zdrowa-grupa kontrolna II		14	78	12500	4813	4175	0,165	0,200

Źródło: Opracowanie własne (PBMC- komórki jednojądrzaste krwi obwodowej)

Tabela 5.3. Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV-R pol env

		N	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe	Z Kolmogorowa- Smirnowa	Istotność
PBMC	Grupa badana	45	2145	139366	23822	27172	0,221	<0,001
	Grupa kontrolna	45	9	39724	12806	9262		
Skóra zmieniona chorobowo		24	5037	58261	26327	13332	0,152	0,200
Skóra pozornie zdrowa		24	9963	462171	65893	95558	0,293	<0,001
Skóra zdrowa- grupa kontrolna II		14	14050	614799	179884	176681	0,267	0,008

Źródło: Opracowanie własne (PBMC- komórki jednojądrzaste krwi obwodowej)

Tabela 5.4. Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV-H (env 62)

		N	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe	Z Kolmogorowa- Smirnowa	Istotność
PBMC	Grupa badana	45	3344	289700	58354	67146	0,187	<0,001
	Grupa kontrolna	45	4435	110853	45776	28036		
Skóra zmieniona chorobowo		24	2444	299460	37161	60149	,340	<0,001
Skóra pozornie zdrowa		24	9851	341808	66363	70571	0,289	<0,001
Skóra zdrowa- grupa kontrolna II		14	7133	313793	76411	77602	0,223	0,058

Źródło: Opracowanie własne (PBMC- komórki jednojądrzaste krwi obwodowej)

Tabela 5.5. Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV-K10gag

		N	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe	Z Kolmogorowa- Smirnowa	Istotność
PBMC	Grupa badana	45	6318	247483	79558	64723	0,181	<0,001
	Grupa kontrolna	45	0	261240	66116	68783		
Skóra zmieniona chorobowo		24	3692	87027	18849	17746	0,256	0,001
Skóra pozornie zdrowa		24	12455	392655	68872	81702	0,245	0,001
Skóra zdrowa- grupa kontrolna II		14	26022	128593	68345	35960	0,163	0,200

Źródło: Opracowanie własne (PBMC- komórki jednojądrzaste krwi obwodowej)

Tabela 5.6. Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV- K env

		N	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe	Z Kolmogorowa- Smirnowa	Istotność
PBMC	Grupa badana	45	625	139901	41294	39240	0,192	<0,001
	Grupa kontrolna	45	1365	86539	24043	22241		
Skóra zmieniona chorobowo		24	570	9064	2762	1938	0,282	<0,001
Skóra pozornie zdrowa		24	4706	103672	26106	27926	0,255	<0,001
Skóra zdrowa- grupa kontrolna II		14	0	19391	4290	6163	0,312	0,001

Źródło: Opracowanie własne (PBMC- komórki jednojądrzaste krwi obwodowej)

Tabela 5.7. Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV-E (4 1) gag

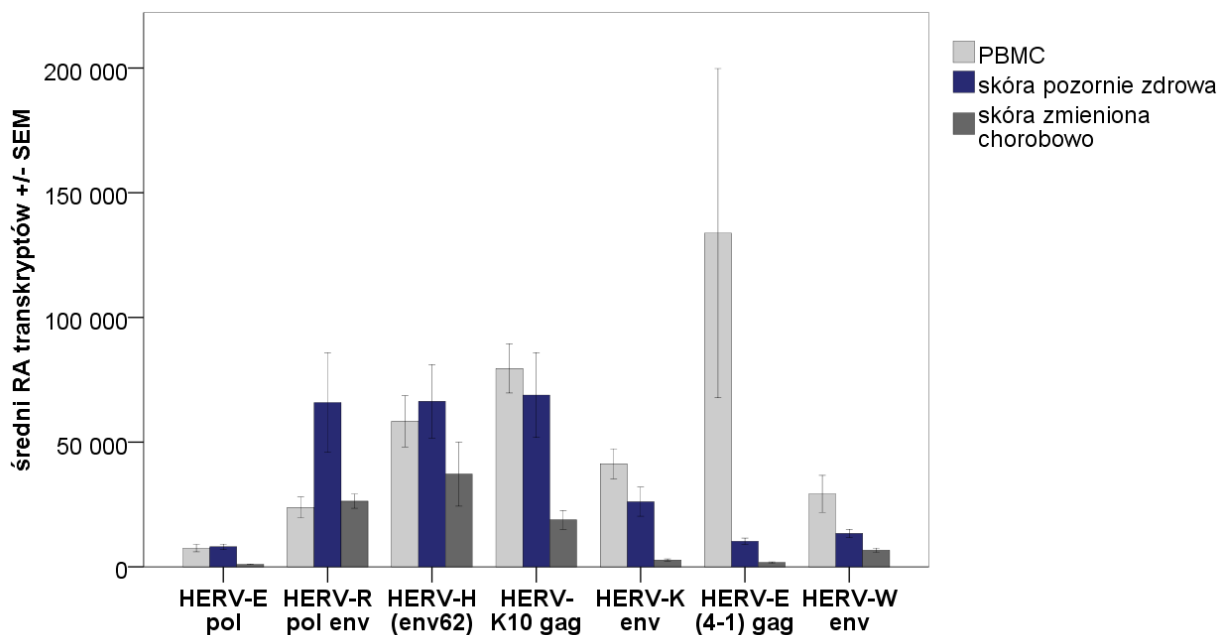
		N	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe	Z Kolmogorowa- Smirnowa	Istotność
PBMC	Grupa badana	45	1274	2149605	133796	432822	0,506	<0,001
	Grupa kontrolna	45	899	28450	11069	6591		
Skóra zmieniona chorobowo		24	51	4225	1733	1209	,099	0,200
Skóra pozornie zdrowa		24	939	23577	10273	6062	0,133	0,200
Skóra zdrowa- grupa kontrolna II		14	1779	17239	7369	4680	0,155	0,200

Źródło: Opracowanie własne (PBMC- komórki jednojądrzaste krwi obwodowej)

Tabela 5.8. Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu wartości względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV-W env

		N	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe	Z Kolmogorowa- Smirnowa	Istotność
PBMC	Grupa badana	45	1807	227684	29268	48552	0,357	<0,001
	Grupa kontrolna	45	4778	33187	15671	7274		
Skóra zmieniona chorobowo		24	838	14811	6659	3845	0,105	0,200
Skóra pozornie zdrowa		24	467	30226	13425	7881	0,111	0,200
Skóra zdrowa- grupa kontrolna II		14	704	116092	44545	31310	0,116	0,200

Źródło: Opracowanie własne (PBMC- komórki jednojądrzaste krwi obwodowej)



Rycina 5.3. Średnie względne poziomy transkryptów badanych sekwencji HERV w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, skórze pozornie zdrowej oraz zmienionej chorobowo u osób chorych na łuszczycę. (PBMC- komórki jednojądrzaste krwi obwodowej; RA-względny poziom)

Źródło: Opracowanie własne

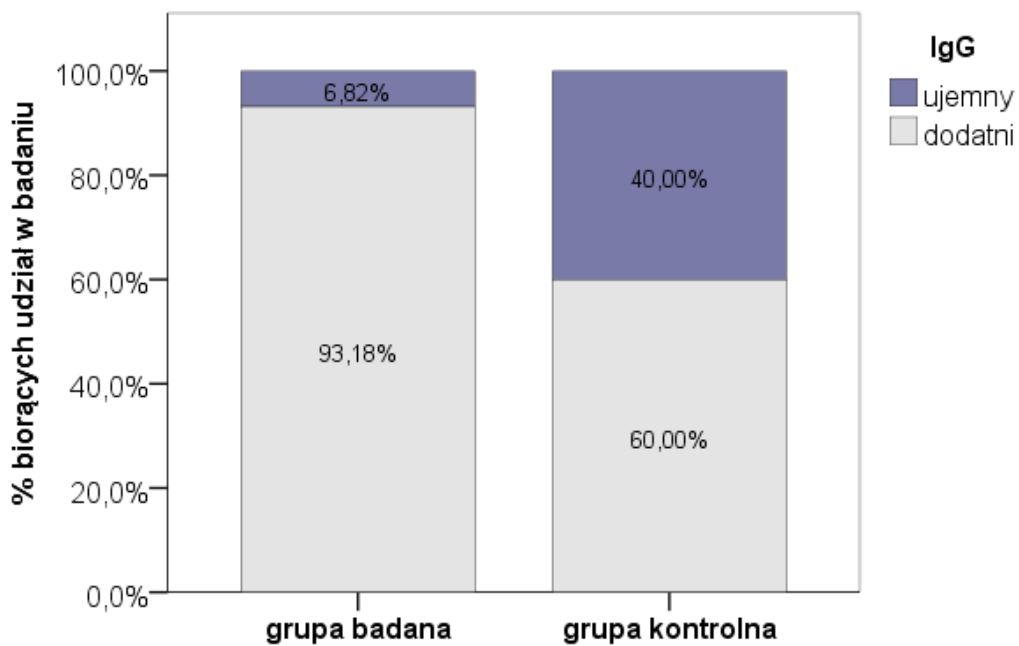
5.1.3. OBECNOŚĆ PRZECIWCIAŁ IGG, IGM ORAZ IGA ANTY-HSV

Liczby osób pozytywnych bądź negatywnych względem przeciwciał anty-HSV poszczególnych klas przedstawiono w Tabeli 5.9. Natomiast procentowy udział osób pozytywnych i negatywnych względem poszczególnych klas przeciwciał w grupie badanej oraz kontrolnej przedstawiono kolejno na Rycinach 5.4., 5.5. oraz 5.6.

Tabela 5.9. Częstość występowania przeciwciał w analizowanych grupach

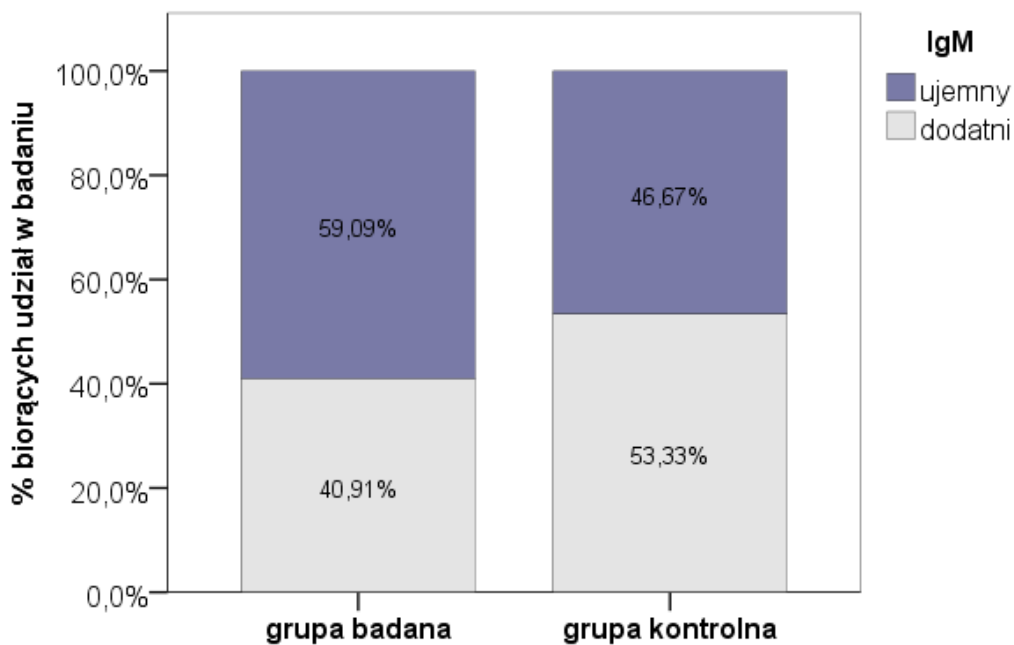
Klasa przeciwciał	Grupa badana		Grupa kontrolna I	
	Pozytywny <i>N</i>	Negatywny <i>N</i>	Pozytywny <i>N</i>	Negatywny <i>N</i>
IgG	41	4	27	18
IgM	18	27	24	21
IgA	10	35	9	36

Źródło: Opracowanie własne



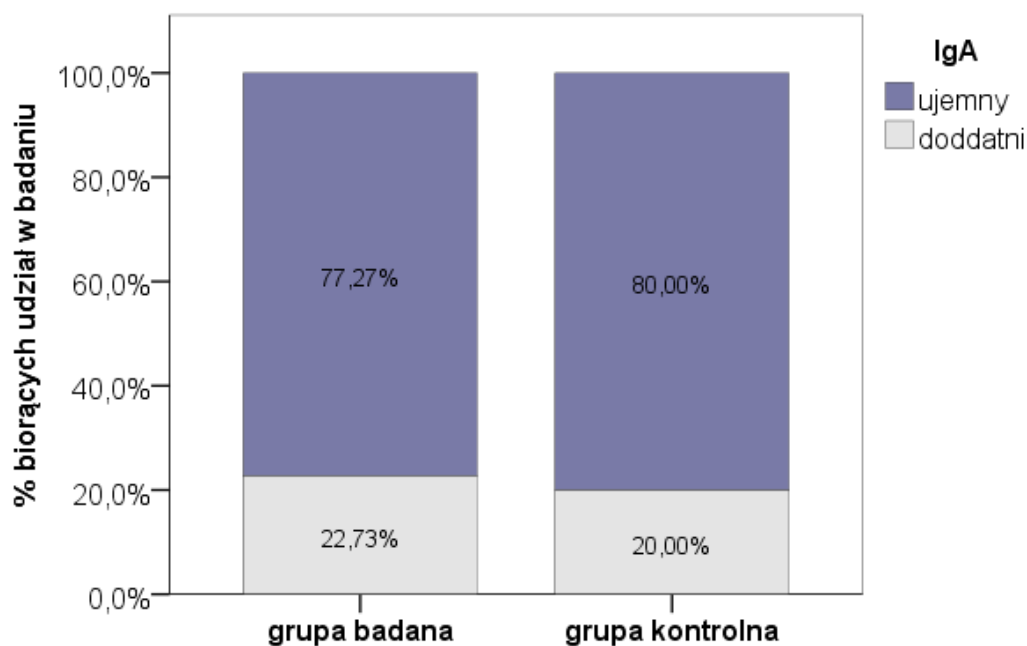
Rycina 5.4. Procentowy udział osób pozytywnych i negatywnych względem przeciwciał IgG anty-HSV w grupie badanej oraz kontrolnej

Źródło: Dane z badań własnych



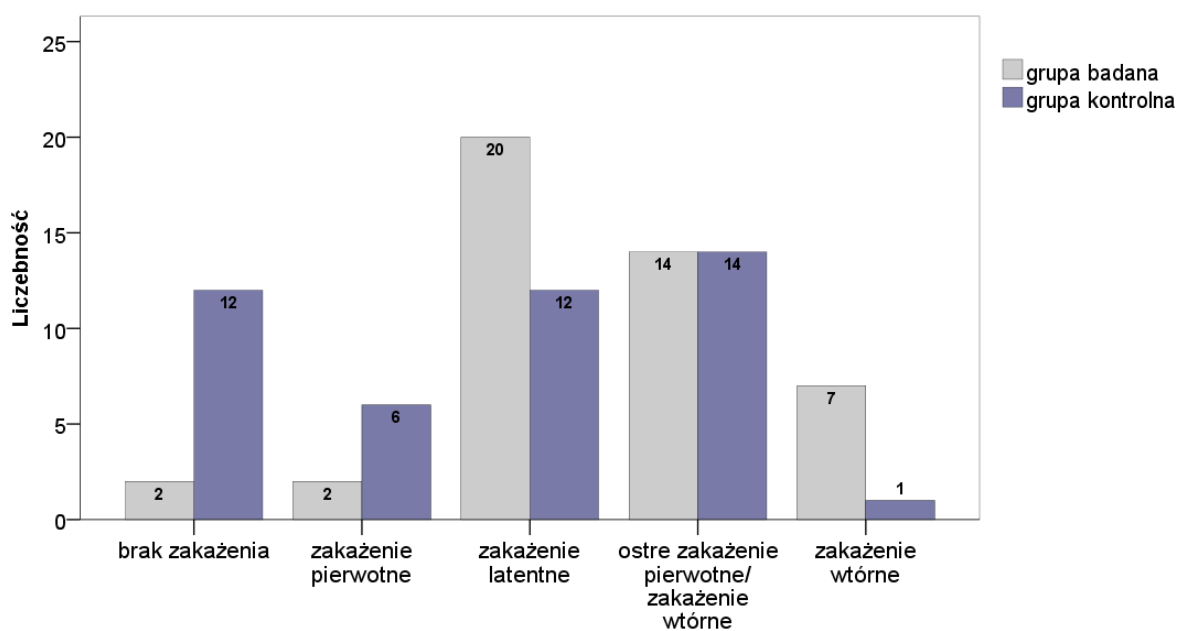
Rycina 5.5. Procentowy udział osób pozytywnych i negatywnych względem przeciwciał IgM anty-HSV w grupie badanej oraz kontrolnej

Źródło: Opracowanie własne



Rycina 5.6. Procentowy udział osób pozytywnych i negatywnych względem przeciwciał IgA anty-HSV w grupie badanej oraz kontrolnej
Źródło: Opracowanie własne

Jak przedstawiono na Rycinie 5.7. na podstawie wyników badań serologicznych, wyróżniono (zgodnie z kryteriami przedstawionymi w Rozdziale 4) grupy osób znajdujące się w różnym stadium infekcji HSV.



Rycina 5.7. Liczebności grup osób w poszczególnych stadiach infekcji HSV w grupie badanej oraz kontrolnej
Źródło: Opracowanie własne

5.1.4. NASILENIE ŁUSZCZYCY

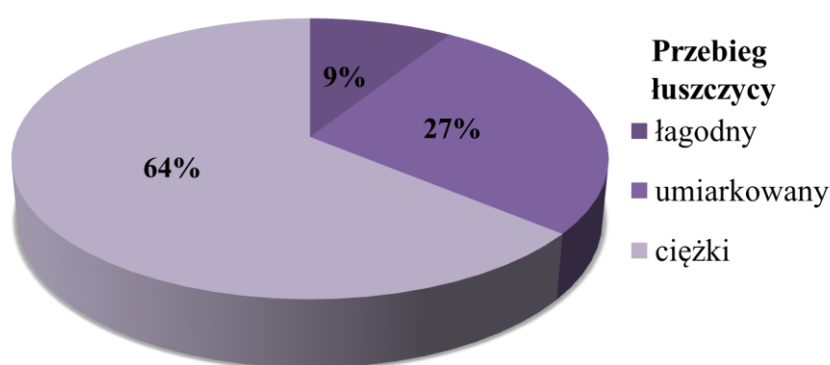
Wartość statystyk opisowych oraz wartość i istotność testu Z Kołmogorowa-Smirnowa dla wyników Skali oceny nasilenia łuszczycy (PASI) przedstawiono w tabeli 5.9. Rozkład wyników dla badanej zmiennej nie jest zgodny z rozkładem normalnym.

Tabela 5.10. Wartość statystyk opisowych oraz normalność rozkładu zmiennej nasilenie łuszczycy

	Średnia	Odchylenie standardowe	Minimum	Maximum	Z Kołmogorowa-Smirnowa	Istotność asymptotyczna (dwustronna)
PASI	19,20	11,11	5	54	0,135	0,047

Źródło: Opracowanie własne

Zgodnie z kryteriami zaawansowania klinicznego choroby zaproponowanymi przez Schmitt i Wozel (2005) (por. Rozdz. 3.) 4 chorych (9%) biorących udział w badaniu charakteryzowało się łagodnym przebiegiem łuszczycy, 12 osób (27%) przebiegiem umiarkowanym, a 29 (64%) przebiegiem ciężkim (por. Ryc. 5.8.)

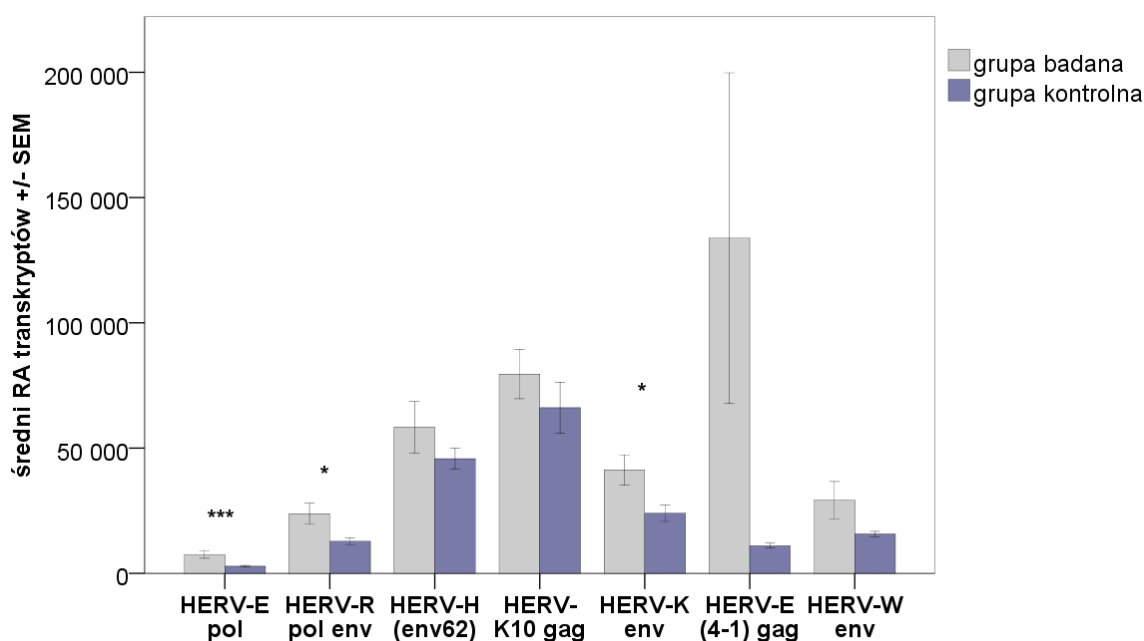


Rycina 5. 8. Procentowy udział osób o łagodnym, umiarkowanym oraz ciężkim przebiegu łuszczycy w grupie badanej

Źródło: Opracowanie własne

5.2. PORÓWNANIE WZGLĘDNEGO POZIOMU TRANSKRYPTÓW ANALIZOWANYCH SEKWENCJI W KOMÓRKACH JEDNOJĄDRZASTYCH KRWI OBWODOWEJ

Przeprowadzono porównanie względnego poziomu transkryptów badanych sekwencji w PBMC pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Jak przedstawiono na Rycinie 5.9. u osób chorych na łuszczycę w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami wykazano istotnie statystycznie wyższy RA transkryptów następujących sekwencji: HERV-E pol ($p<0,001$), HERV-R pol env ($p=0,017$) i HERV-K env ($p=0,046$). Nie odnotowano natomiast istotnych różnic we względnym poziomie transkryptów sekwencji: HERV-H (env62) ($p=0,748$), HERV-K10gag ($p=0,119$), HERV-E (4-1) gag ($p=0,930$) oraz HERV-W env ($p=0,679$).

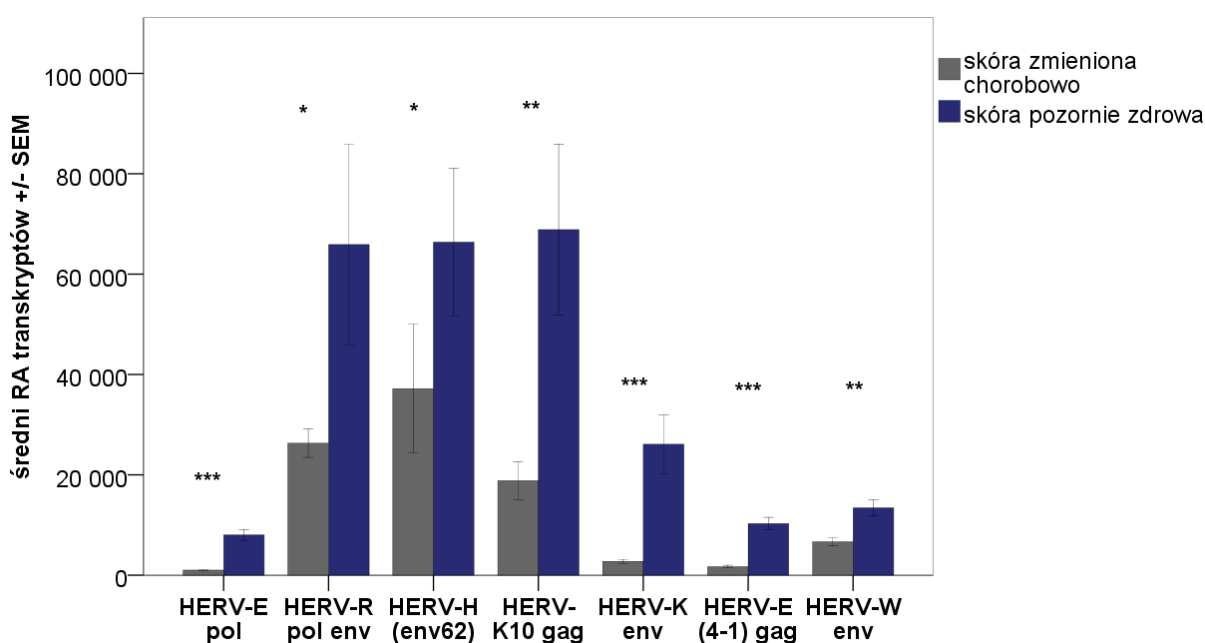


Rycina 5.9. Porównanie względnego poziomu transkryptów badanych sekwencji HERV w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej pomiędzy osobami chorymi na łuszczycę oraz zdrowymi (* $p<0,05$; *** $p<0,001$) (RA-względny poziom)

Źródło: Opracowanie własne

5.3. PORÓWNANIE WZGLĘDNEGO POZIOMU TRANSKRYPTÓW ANALIZOWANYCH SEKWENCJI W SKÓRZE ZMIENIONEJ CHOROBOWO I POZORNIE ZDROWEJ

Jak przedstawiono na Rycinie 5.10. stwierdzono istotne statystycznie niższy RA transkryptów wszystkich analizowanych sekwencji w skórze zmienionej chorobowo: HERV-E pol ($p<0,001$), HERV-R pol env ($p=0,022$), HERV-H (env62) ($p=0,046$), HERV-K10gag ($p=0,001$), HERV-K env ($p<0,001$), HERV-E (4-1) gag ($p<0,001$) oraz HERV-W env ($p=0,001$).



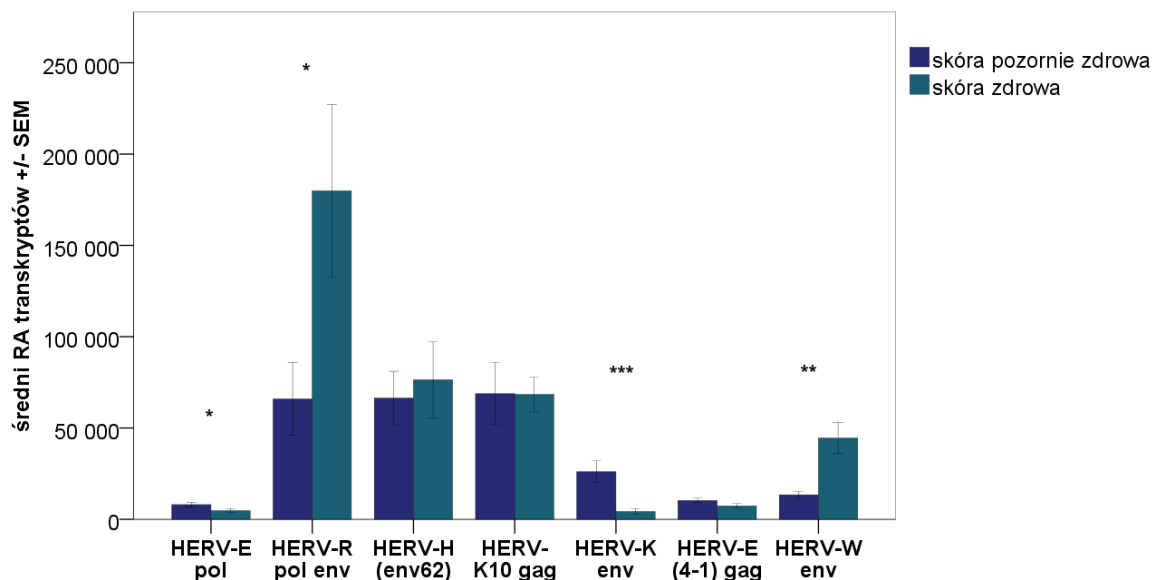
Rycina 5.10. Porównanie względnego poziomu transkryptów badanych sekwencji HERV pomiędzy skórą zmienioną chorobowo oraz pozornie zdrową osób chorych na łuszczycę (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$) (RA- względny poziom)

Źródło: Opracowanie własne

5.4. PORÓWNANIE WZGLĘDNEGO POZIOMU TRANSKRYPTÓW ANALIZOWANYCH SEKWENCJI W SKÓRZE POZORNIE ZDROWEJ ORAZ W SKÓRZE ZDROWEJ

Wykazano istotne statystycznie wyższy RA transkryptów sekwencji HERV-E pol ($p=0,045$) oraz HERV-K env ($p<0,001$) w skórze pozornie zdrowej pobranej od osób chorych na łuszczycę, natomiast niższe w przypadku HERV-R pol env ($p=0,020$) oraz HERV-W env ($p=0,003$) (por. Ryc. 5.11.) w porównaniu z skórą zdrową pobraną od

osób z grupy kontrolnej. Różnice w RA transkryptów pozostałych sekwencji pomiędzy skórą pozornie zdrową oraz zdrową nie były istotne statystycznie: HERV-H (env62) ($p=0,654$) HERV-K10gag ($p=0,298$), HERV-E (4-1) gag ($p=0,134$).

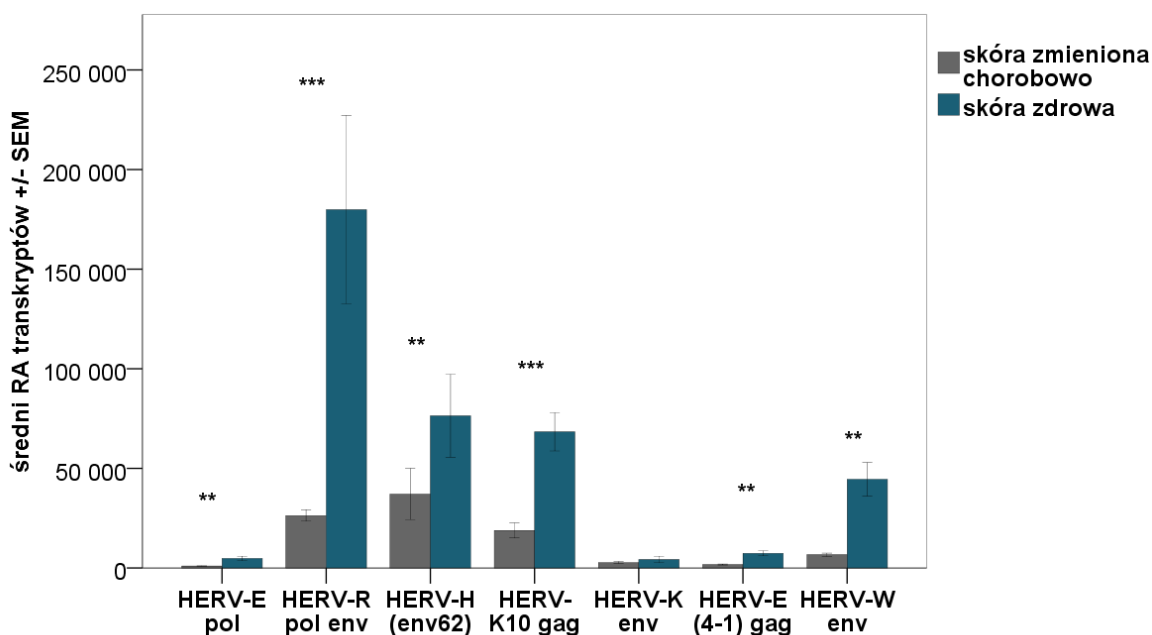


Rycina 5.11. Porównanie względnego poziomu transkryptów badanych sekwencji HERV pomiędzy skórą pozornie zdrową osób chorych na łuszczycę oraz skórą zdrową osób z grupy kontrolnej (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$) (RA-względny poziom)

Źródło: Opracowanie własne

5.5. PORÓWNANIE WZGLĘDNego POZIOMU TRANSKRYPTÓW ANALIZOWANYCH SEKWENCJI W SKÓRZE ZMIENIONEJ CHOROBOWO ORAZ W SKÓRZE ZDROWEJ

Porównano RA transkryptów analizowanych sekwencji pomiędzy skórą zmienioną chorobowo pobraną od osób chorych na łuszczycę oraz skórą zdrową pobraną od osób z grupy kontrolnej II. Stwierdzono istotnie statystycznie wyższy RA transkryptów wszystkich badanych sekwencji (HERV-E pol ($p=0,004$), HERV-R pol env ($p<0,001$), HERV-H (env62) ($p=0,007$), HERV-K10gag ($p<0,001$) HERV-E (4-1) gag ($p=0,001$) oraz HERV-W env ($p=0,001$) z wyjątkiem HERV-K env ($p=0,240$) (por. Ryc. 5.12.) w skórze zdrowej.



Rycina 5.12. Porównanie względnego poziomu transkryptów badanych sekwencji HERV pomiędzy skórą zmienioną chorobowo osób chorych na łuszczycę oraz skórą zdrową osób z grupy kontrolnej (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (RA-względny poziom)

Źródło: Opracowanie własne

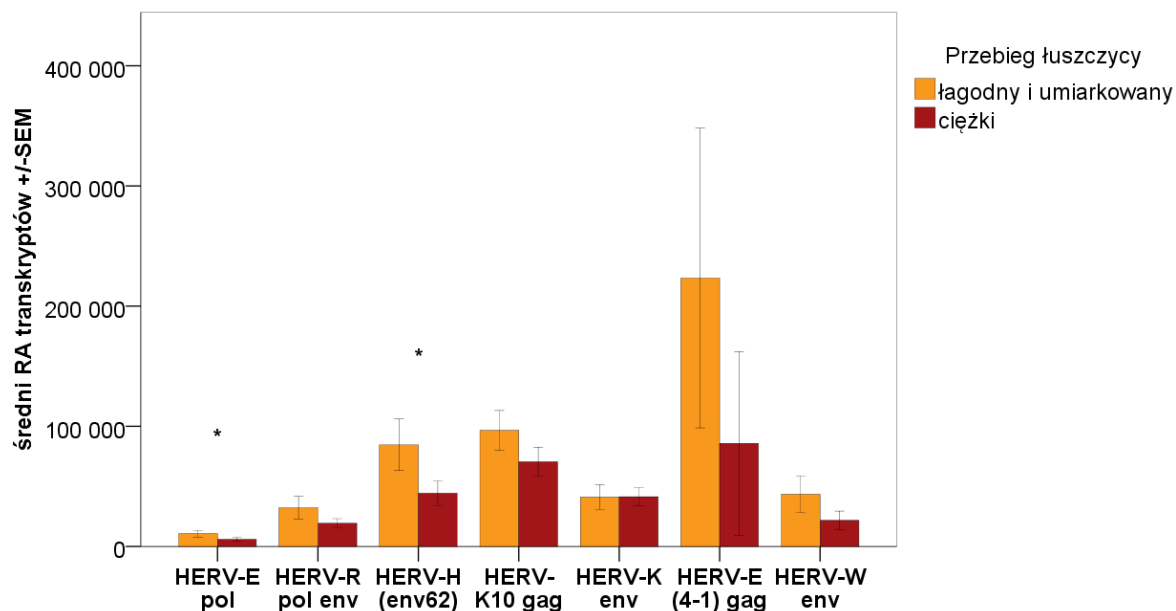
5.6. PORÓWNANIE WZGLĘDNego POZIOMU TRANSKRYPTÓW ANALIZOWANYCH SEKWENCJI W KOMÓRKACH JEDNOJĄDRZASTYCH KRWI OBWODOWEJ POMIĘDZY OSOBAMI O RÓŻNYM PRZEBIEGU ŁUSZCZYCY

Wykonano porównanie RA transkryptów analizowanych sekwencji pomiędzy grupami wyłonionymi ze względu na stopień nasilenia łuszczycy mierzony wskaźnikiem PASI. Ze względu na małą liczebność podgrupy osób o łagodnym przebiegu (4 osoby) wyłoniono 2 grupy porównawcze: o słabym i umiarkowanym przebiegu łuszczycy oraz o przebiegu ciężkim. Dokładne statystyki opisowe dla wyłonionych grup zawarto w Tabeli 5.10. Jak przedstawiono na Rycinie 5.13, istotnie statystycznie były jedynie różnice w RA transkryptów sekwencji HERV-E pol ($p=0,05$) oraz HERV-H (env62) ($p=0,047$), wskazujące na wyższy poziom transkryptów w grupie osób o łagodnym i umiarkowanym przebiegu łuszczycy. Poziomy istotności dla porównań pozostałych sekwencji wynosiły: HERV-R pol env ($p=0,177$), HERV-K10gag ($p=0,133$), HERV-K env ($p=0,899$), HERV-E (4-1) gag ($p=0,070$) oraz HERV-W env ($p=0,088$).

Tabela 5.11. Wartość statystyk opisowych dla względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej w grupach o różnym przebiegu łuszczycy

Sekwencja	Przebieg łagodny i umiarkowany				Przebieg ciężki			
	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe
HERV-E pol	793	32549	10626	10644	979	50141	5878	9179
HERV-R pol env	2145	139366	32274	36104	3119	107062	19294	20289
HERV-H env 62	4547	289700	84622	83009	3344	281130	44281	53403
HERV-K10gag	8089	236988	96525	64382	6318	247483	70468	64199
HERV-K env	1472	124171	41076	39858	625	139901	41411	39641
HERV-E (4 1) gag	1405	1570674	223406	482920	1274	2149605	85790	404518
HERV-W env	1807	190700	43383	59114	2617	227684	21706	41049

Źródło: Opracowanie własne

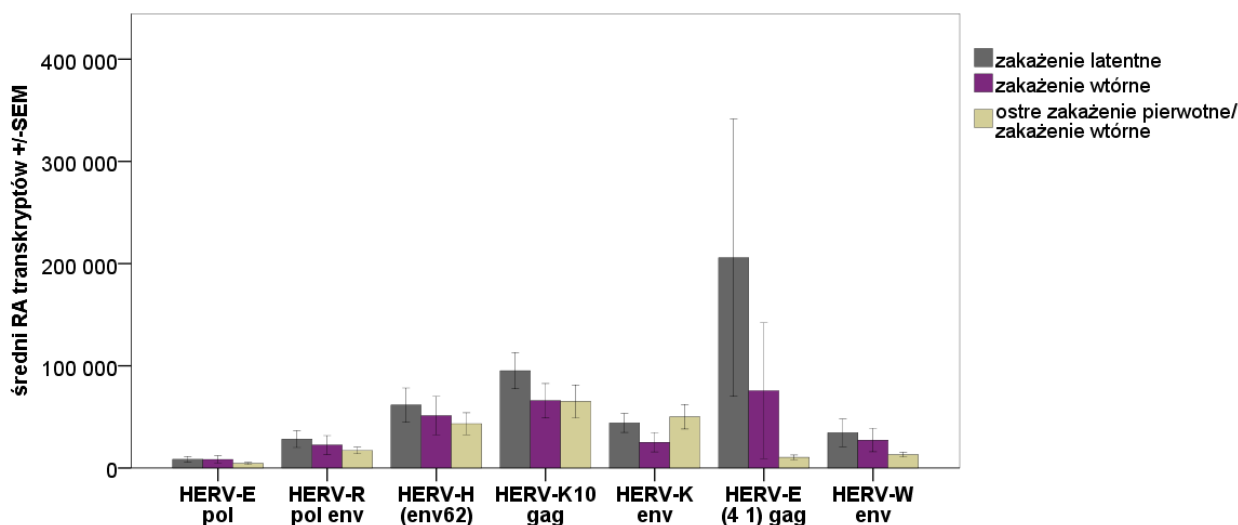
Rycina 5.13. Porównanie względnego poziomu transkryptów analizowanych w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej pomiędzy osobami o łagodnym i umiarkowanym przebiegu łuszczycy oraz przebiegu ciężkim (* $p \leq 0,05$) (RA-względny poziom)

Źródło: Opracowanie własne

5.7. PORÓWNANIE WZGLĘDNEGO POZIOMU TRANSKRYPTÓW ANALIZOWANYCH SEKWENCJI POMIĘDZY OSOBAMI W RÓŻNYCH STADIACH INFЕКCJI HSV CHORYCH NA ŁUSZCZYCĘ

5.7.1. KOMÓRKI JEDNOJĄDRZASTE KRWI OBWODOWEJ

Dokonano porównania RA transkryptów badanych sekwencji w PBMC osób chorych na łuszczycę, pomiędzy osobami w poszczególnych stadiach infekcji HSV. Ze względu na małą liczebność grupy osób niezakażonych oraz z zakażeniem pierwotnym pominięto je w analizie statystycznej. Statystyki opisowe wyników uzyskanych w wyłonionych podgrupach umieszczono w Tabeli 5.11. Żadne z zaobserwowanych różnic nie spełniały kryterium istotności statystycznej: HERV-E pol ($p=0,442$), HERV-R pol env ($p=0,881$), HERV-H (env62) ($p=0,710$), HERV-K10gag ($p=0,463$), HERV-K env ($p=0,371$), HERV-E (4-1) gag ($p=0,732$) oraz HERV-W env ($p=0,354$) (por. Ryc. 5.14).

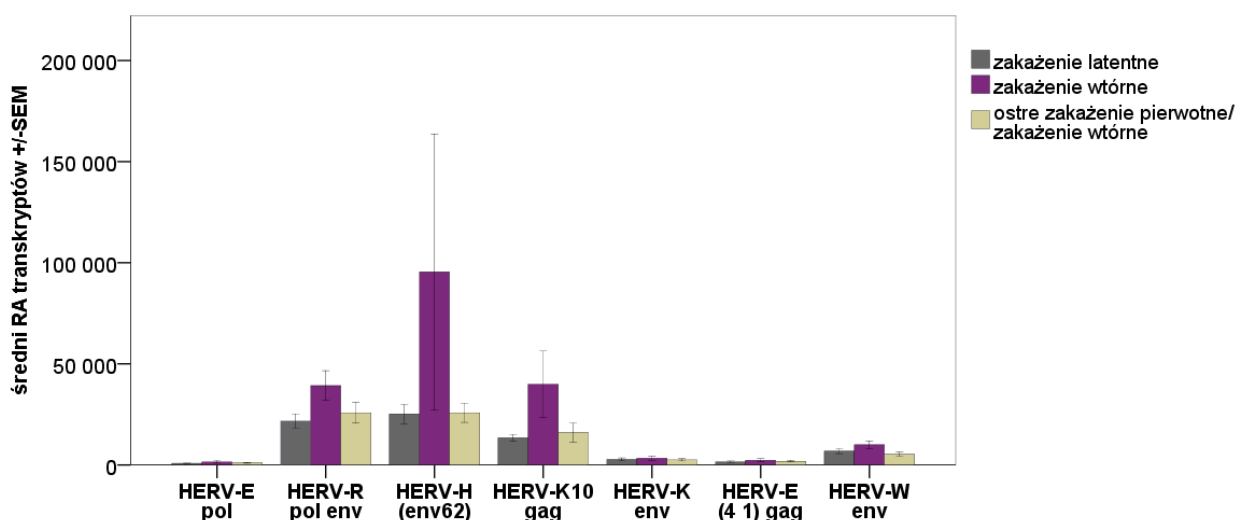


Rycina 5.14. Porównanie względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej pomiędzy osobami w poszczególnych stadiach infekcji HSV (RA-względny poziom)

Źródło: Opracowanie własne

5.7.2. SKÓRA CHOROBY ZMIENIONA

W grupie osób chorych na łuszczycę dokonano porównania RA transkryptów analizowanych sekwencji w skórze zmienionej chorobowo pomiędzy osobami w poszczególnych stadiach infekcji HSV. Tak jak w przypadku analizy w PBMC, ze względu na małą liczebność grupy osób niezakażonych oraz z zakażeniem pierwotnym pominięto je w analizie statystycznej. Szczegółowe statystyki opisowe umieszczono w Tabeli 5.12. Nie wykazano żadnych istotnych statystycznie różnic: HERV-E pol ($p=0,365$), HERV-R pol env ($p=0,089$), HERV-H (env62) ($p=0,611$), HERV-K10gag ($p=0,200$), HERV-K env ($p=0,604$), HERV-E (4-1) gag ($p=0,617$) oraz HERV-W env ($p=0,132$) (por. Ryc. 5.15).



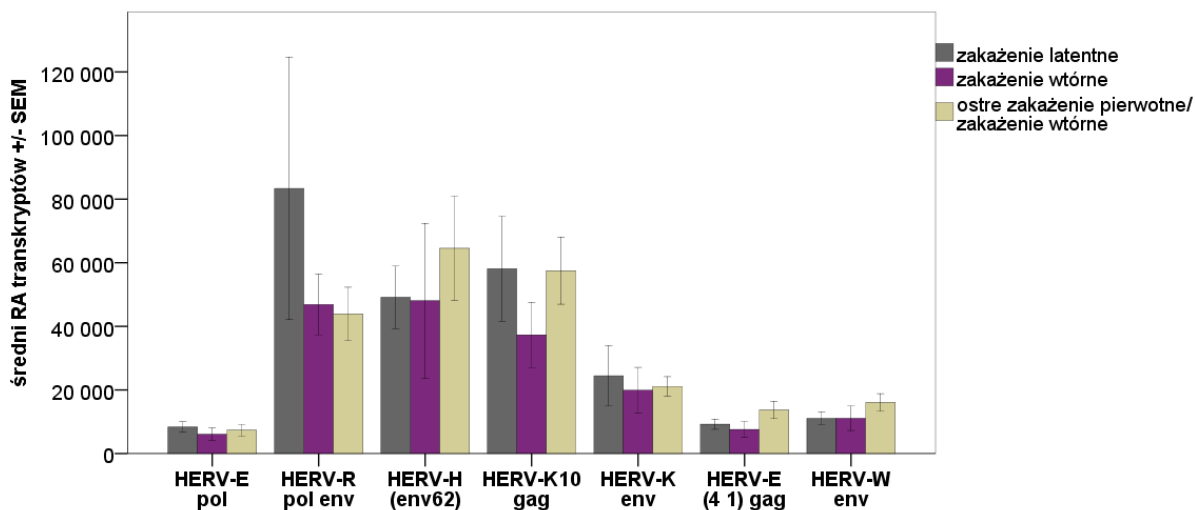
Rycina 5.15. Porównanie względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji w skórze zmienionej chorobowo pomiędzy osobami w poszczególnych stadiach infekcji HSV (RA-względny poziom)

Źródło: Opracowanie własne

5.7.3. SKÓRA POZORNIE ZDROWA

Statystyki opisowe RA transkryptów analizowanych sekwencji w skórze pozornie zdrowej w podgrupach wyodrębnionych ze względu na stadium zakażenia HSV przedstawiono w Tabeli 5.13. Ze względu na niewielką liczbę osób niezakażonych oraz z zakażeniem pierwotnym pominięto te podgrupy w analizie statystycznej. Analiza

porównawcza RA transkryptów badanych sekwencji nie wykazała istotnych statystycznie różnic: HERV-E pol ($p=0,858$), HERV-R pol env ($p=0,515$), HERV-H (env62) ($p=0,540$), HERV-K10gag ($p=0,642$), HERV-K env ($p=0,401$), HERV-E (4-1) gag ($p=0,206$) oraz HERV-W env ($p=0,320$) (por. Ryc. 5.16).



Rycina 5.16. Porównanie względnego poziomu transkryptów analizowanych sekwencji w skórze pozornie zdrowej pomiędzy osobami w poszczególnych stadiach infekcji HSV (RA-względny poziom)
Źródło: Opracowanie własne

Tabela 5.12. Wartość statystyk opisowych dla względnych poziomów transkryptów badanych sekwencji HERV w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej w grupach osób w różnych stadiach zakażenia HSV

	Zakażenie latentne (n=20)				Zakażenie wtórne (n=14)				Ostre pierwotne zakażenia/zakażenie wtórne			
	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe
HERV-E pol	1036	50141	8550	11921	979	28211	8459	9526	793	12663	4508	3540
HERV-R pol env	3258	139365	28270	35725	3117	75000	22529	24412	2145	40498	17186	11943
HERV-H env 62	3344	281130	61608	72956	4491	151301	51259	49596	4547	127248	43369	40104
HERV-K10gag	10157	247483	95218	76788	7893	1305867	65831	44536	6318	197625	65189	60310
HERV-K env	2410	133473	44082	40420	1472	69763	25206	24978	625	139900	50189	45026
HERV-E (4 1) gag	3782	214965	205758	590968	1274	473333	75690	175509	1405	31674	10475	8629
HERV-W env	2926	227684	34465	58795	2617	92683	27328	30174	1807	25093	13107	8103

Źródło: Opracowanie własne

Tabela 5.13. Wartość statystyk opisowych dla względnych poziomów transkryptów badanych sekwencji HERV w skórze zmienionej chorobowo w grupach osób w różnych stadiach zakażenia HSV

	Zakażenie latentne				Zakażenie wtórne				Ostre pierwotne zakażenia/zakażenie wtórne			
	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe
HERV-E pol	144	1454	810	370	401	3384	1529	1307	150	2078	1090	570
HERV-R pol env	5117	43980	21735	11036	22472	58261	39238	14791	5037	49238	25825	13513
HERV-H env 62	7486	58794	25243	15067	15191	299459	95487	136448	13578	47590	25816	12542
HERV-K10gag	3692	21635	13429	5110	10966	87027	39925	32777	5165	40244	16012	12403
HERV-K env	570	9064	2738	2390	1164	5152	3382	2058	739	5274	2527	1438
HERV-E (4 1) gag	51	3365	1598	1280	845	4225	2311	1537	190	2871	1830	870
HERV-W env	1946	13488	6826	3861	5753	14811	9999	3714	1752	8415	5342	2707

Źródło: Opracowanie własne

Tabela 5.14. Wartość statystyk opisowych dla względnych poziomów transkryptów badanych sekwencji HERV w skórze pozornie zdrowej w grupach osób w różnych stadiach zakażenia HSV

	Zakażenie latentne				Zakażenie wtórne				Ostre pierwotne zakażenia/zakażenie wtórne			
	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe	Min	Max	Średnia	Odchylenie standardowe
HERV-E pol	1036	50141	8550	11921	979	28211	8459	9526	793	12663	4508	3540
HERV-R pol env	3258	139365	28270	35725	3117	75000	22529	24412	2145	40498	17186	11943
HERV-H env 62	3344	281130	61608	72956	4491	151301	51259	49596	4547	127248	43369	40104
HERV-K10gag	10157	247483	95218	76788	7893	1305867	65831	44536	6318	197625	65189	60310
HERV-K env	2410	133473	44082	40420	1472	69763	25206	24978	625	139900	50189	45026
HERV-E (4 1) gag	3782	214965	205758	590968	1274	473333	75690	175509	1405	31674	10475	8629
HERV-W env	2926	227684	34465	58795	2617	92683	27328	30174	1807	25093	13107	8103

Źródło: Opracowanie własne

5.8. OCENA ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY WZGLĘDNYM POZIOMEM TRANSKRYPTÓW ANALIZOWANYCH SEKWENCJI A NASILENIEM ŁUSZCZYCY

Aby potwierdzić hipotezę o występowaniu zależności pomiędzy nasileniem łuszczycy, wyrażonym uzyskaną liczbą punktów na Skali Oceny Nasilenia Łuszczycy (PASI) a RA transkryptów badanych sekwencji, przeprowadzono analizę korelacji. Wykazała ona brak istotnych statystycznie związków pomiędzy wymienionymi powyżej zmiennymi. Szczegółową macierz korelacji umieszczono w Tabeli 5.14.

Tabela 5.15. Korelacje pomiędzy wynikiem uzyskanym na skali PASI oraz wiekiem, a analizowanymi sekwencjami

		HERV-E pol	HERV-R pol env	HERV- H(env62)	HERV- K10 gag	HERV- K env	HERV-E (4-1) gag	HERV-W env
PASI	Współczynnik korelacji	-0,204	-0,118	-0,274	-0,216	0,026	-0,224	-0,232
	Istotność	0,196	0,458	0,079	0,170	0,870	0,154	0,139

Źródło: Opracowanie własne

ROZDZIAŁ 6. DYSKUSJA

Od lat dyskutowane są teorie nad potencjalną rolą ludzkich endogennych retrowirusów w etiopatogenezie licznych schorzeń, w tym przede wszystkim, związanych z procesami autoimmunizacyjnymi. Wyniki badań z zastosowaniem coraz to czulszych metod molekularnych dostarczają kolejnych argumentów na rzecz tej tezy. Związek endogennych retrowirusów z etiopatogenezą łuszczycy był postulowany przez niektórych badaczy, od kiedy to w moczu, zmianach skórnych oraz stymulowanych limfocytach osób chrych na *psoriasis* wykazano obecność cząstek wirusopodobnych (Iversen, 1983; za: Bessis i wsp, 2004). Równocześnie istnieje coraz więcej dowodów na możliwy udział infekcji wirusami egzogennymi w aktywacji sekwencji endogennych retrowirusów, potencjalnie skutkujących ich udziałem w procesach autoimmunizacyjnych (Christensen, 2005).

Warto zaznaczyć, że rodziny endogennych retrowirusów różnią się od siebie w sposób znaczący, a białka kodowane przez ich przedstawicieli mogą pełnić różne funkcje. Stąd wyniki uzyskane dla każdej z analizowanych sekwencji zostaną przedyskutowane osobno.

6.1. DOBÓR OSÓB BADANYCH

Jak zostało już nadmienione w Rozdziale 1, liczne czynniki mogą regulować ekspresję HERV. Badania wykonywane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zaplanowano w taki sposób, by zminimalizować oddziaływanie tych czynników na uzyskiwane wyniki. Stąd, do udziału w projekcie, kwalifikowano tylko tych chorych, którzy przez co najmniej 6 miesięcy przed pobieraniem materiału byli leczeni jedynie miejscowo, przy pomocy preparatów niesteroidowych. Wiadomym jest bowiem, że stosowana w terapii łuszczycy fototerapia może znacząco wpływać na ekspresję HERV. Hohenadtl (1999) wraz ze współpracownikami wykazał, że komórki progenitorowe

keratynocytów oraz nieśmiertelne linie komórkowe keratynocytów (HaCaT) wykazują wyższy poziom transkryptów genu *pol* ludzkich endoegennych retrowirusów po naświetlaniach UVB. Zaobserwowano także indukcyjne działanie promieniowania UVB na transkrypcję wybranych HERV w skórze osób zmagających się z toczeniem układowym. Z drugiej strony promieniowanie UVB hamuje transkrypcję ERV-9 w keratynocytach osób zdrowych oraz translację genu *env* HERV-E w zmianach łuszczykowych (Bessis i wsp., 2004; Zwolińska, 2006; Balada i wsp., 2009).

Drugim ważnym czynnikiem regulującym ekspresję HERV (także stosowanym w terapii łuszczyca) są glukokortykosteroidy. Dowiedziono, że najwyższa ekspresja HERV występuje w tkankach, które wydzielają, bądź są wrażliwe na działanie tych hormonów. Obserwowano na przykład zwiększoną ekspresję niektórych HERV pod wpływem glukokortykosteroidów w komórkach raka piersi oraz komórkach łożyska. Wykazano także wzmożoną ekspresję MMTV w mysich komórkach nowotworowych oraz HERV-K10 w ludzkich liniach raka piersi (T47D) pod wpływem glukokortykosteroidów. Natomiast pod wpływem terapii związkami steroidowymi obserwowano obniżenie ekspresji HERV, jak np. mniejszą liczbę transkryptów genu *gag* HERV-E (4-1) u osób chorych na SLE (Balada i wsp., 2009). Dlatego też w badaniu brały udział tylko i wyłącznie te osoby, które nie były poddane działaniu glukokortykosteroidów przez co najmniej 6 miesięcy przed pobieraniem materiału do badań.

6.2. ASPEKT METODYCZNY

6.2.1. REAL-TIME PCR

Wraz z rozwojem technologicznym, jesteśmy świadkami niezwykłego postępu metod mających zastosowanie w biologii molekularnej. Niewątpliwym kamieniem milowym, było wynalezienie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR- ang. *polymerase chain reaction*) przez zespół Kary'ego Mullisa. Metoda ta przyspieszyła oraz usprawniła prace badawcze nad funkcją i strukturą genów. Dzięki niej ludzie nauki, a obecnie także

i diagności laboratoryjni mogą w warunkach *in vitro* amplifikować dowolną wybraną sekwencję, dzięki zastosowaniu dwóch syntetycznych oligonukleotydów (starterów) komplementarnych do sekwencji docelowej (Mullis i Faloona, 1987; Słomski i wsp., 2004). Pomimo rozlicznych zalet, niedostatkami tradycyjnej metody PCR jest niemożność dokonywania oznaczeń ilościowych.

Zastosowana w niniejszej rozprawie technika real-time PCR jest modyfikacją klasycznego PCR pozwalającą na dokonywanie ocen ilościowych. Jej głównymi zaletami jest czułość, szeroki zakres detekcji oraz powtarzalność. Prawidłowe jej zastosowanie wymaga jednak technicznej wiedzy o detekcji produktów, projektowaniu optymalnych dla metody starterów, oceny ilościowej i normalizacji uzyskiwanych wyników, a także niezwyklej dbałości o standardy pracy (Ciesielska i Sikorski, 2008).

6.2.2. IZOLACJA RNA

Newralgicznym punktem przeprowadzonych badań była także izolacja całkowitego RNA z wycinków skóry. Trudność polegała na odpowiedniej homogenizacji materiału, choć warto zaznaczyć, że sama izolacja RNA zawsze wymaga wyjątkowego przestrzegania zasad praktyki laboratoryjnej, bowiem zanieczyszczenie RNAzami powoduje degradację pozyskiwanego kwasu nukleinowego. Pobierane bioptaty skóry były wycinkami nie przekraczającymi 5 mm, zatem ich właściwa homogenizacja miała kluczowe znaczenie dla ilości uzyskiwanego RNA. W niniejszym badaniu użyto urządzenia TissueLyser LT (Qiagen, USA) z zastosowaniem kulek metalowych. Opracowana procedura z wykorzystaniem homogenizatora kulkowego pozwoliła na wysokowydajną izolację całkowitego RNA. Wcześniejsze próby optymalizacji procesu rozdrabniania bioptatów skóry z użyciem homogenizatora mechanicznego typu „rotor-stator” nie spełniały oczekiwań w zakresie wydajnej homogenizacji. Dodatkową zaletą jest dokonywanie homogenizacji w zamkniętej probówce dzięki czemu osoba wykonująca nie jest narażona na ekspozycję oparami fenolu.

6.2.3. GEN REFERENCYJNY

Jak już zaznaczono w rozdziale 4 w niniejszych badaniach wykorzystano gen referencyjny GAPDH. Był on używany przez liczne zespoły badawcze w pracach z wykorzystaniem zarówno PBMC jak i biopsji skóry od osób zdrowych jak i chorych na łuszczycę (M. Kawaguchi i wsp., 2005; Namysł i wsp., 2005). Namysł (2006) wykazał stabilność ekspresji GAPDH w PMBC zarówno u osób z grupy kontrolnej jak i chorych na łuszczycę, poprzez odniesienie liczby jego transkryptów do liczby komórek.

W przypadku wycinków skóry niezwykle trudne jest dokonanie dokładnej oceny liczby komórek. Dlatego nie można też z całą pewnością potwierdzić stabilność ekspresji GAPDH w skórze osób chorych na łuszczycę. W przyszłych eksperymentach można podjąć próbę standaryzacji masy biopsji, poprzez pobieranie jej sztancą. W niniejszych badaniach bioptaty pobierane były przy pomocy igły i skalpela, przez co ich wielkość podlegała wahanom. Drugim rozwiązaniem jest ocena ekspresji więcej niż jednego genu referencyjnego, a następnie normalizacja wyników do ich średniej logarytmicznej (Dheda i wsp., 2005; Bjerregaard i wsp., 2011). Dzięki takiemu podejściu minimalizuje się wpływ możliwej zmienności ekspresji genów z grupy podstawowego metabolizmu komórkowego w różnych tkankach, bądź stanach patologicznych.

6.3. ANALIZA WZGLĘDNEGO POZIOMU TRANSKRYPTÓW WYBRANYCH SEKWENCJI HERV

6.3.1. HERV-E

W niniejszych badaniach wykazano znaczący wzrost względnego poziomu transkryptów sekwencji HERV-E pol w PBMC chorych na łuszczycę w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej. Jest to wynik o tyle ciekawy, że wcześniejsze doniesienia z badań przeprowadzonych na innej grupie pacjentów cierpiących na *psoriasis* wskazywały na odwrotną zależność (Kowalczyk i wsp., 2010). Warto zaznaczyć,

że cytowane badania przeprowadzane były na małej liczbie osób. Zróżnicowanie uzyskiwanych wyników w zależności od liczebności grupy może wskazywać na dużą międzyosobniczą wariację ekspresji HERV-E pol. Badania z użyciem tych samych starterów, przeprowadzone wśród osób chorych na *morphea* wykazywały obniżoną ekspresję omawianej sekwencji w porównaniu do osób zdrowych (Kowalczyk i wsp., 2012).

Zanotowano także znacznie większą względną liczbę transkryptów omawianej sekwencji w skórze pozornie zdrowej w porównaniu ze skórą zmienioną chorobowo pobieraną od chorych, ale także skórą zdrową pobieraną od osób z grupy kontrolnej. Bessis i wsp. (2000) uzyskali odmienne rezultaty, wykazując istotnie większą liczbę transkryptów sekwencji HERV z rodziny E w skórze zmienionej chorobowo w porównaniu do skóry pozornie zdrowej (za: Bessis i wsp., 2004). Ci sami autorzy wykazali także, że produkty białkowe genu *env* HERV-E były obecne w większości analizowanych bioptatów skóry pobranych od osób chorych na łuszczycę, ale tylko w 15% biopsji skóry pobranych od osób zdrowych. Wykazali także zwiększoną ekspresję w skórze zmienionej chorobowo oraz pobranej z otoczenia zmian w porównaniu do skóry pozornie zdrowej.

Zwiększona transkrypcja sekwencji HERV-E pol w skórze pozornie zdrowej w porównaniu do skóry zmienionej chorobowo wydaje się być wynikiem zaskakującym. Z drugiej jednak strony, biorąc pod uwagę jej zwiększenie w stosunku do skóry zdrowej może to świadczyć o udziale HERV-E w zapoczątkowywaniu zmian skórnych. Bessis i współpracownicy (2004) wykazali, że białko *env* HERV-E ulega ekspresji w skórnych limfocytach T CD4+. Subpopulacja ta uważana jest za mającą udział we wczesnych stadiach powstawaniu zmian łuszczycowych, co wykazano w badaniach na modelu zwierzęcym (za: Bessis i wsp., 2004). Można zatem wysunąć hipotezę, że zwiększony RA transkryptów analizowanej sekwencji mogłaby być istotnym czynnikiem w patogenezie łuszczycy.

W ramach niniejszej rozprawy przeanalizowano także względną liczbę transkryptów sekwencji HERV-E (4-1) gag. Tak jak w przypadku sekwencji HERV-E pol,

zanotowano znaczny wzrost liczby transkryptów w skórze pozornie zdrowej w porównaniu do zmienionej chorobowo oraz skórze zdrowej w porównaniu do zmienionej chorobowo. Nie zaobserwowano natomiast różnic w RA transkryptów w skórze pozornie zdrowej oraz zdrowej, a także PBMC pomiędzy grupą badaną oraz kontrolną. Warto wskazać, na znaczne odchylenie standardowe wyników uzyskanych w PBMC będące odzwierciedleniem różnic międzyosobniczych w ekspresji tej sekwencji. Co ciekawe, Namysł wraz ze współpracownikami (2005) wykazali zwiększony RA genu *gag* klonu HERVE-E (4-1) w PBMC osób chorych na twardzinę oraz łuszczycowe zapalenia stawów porównaniu do grupy kontrolnej. Jednakże nie wykryli w ogóle transkryptów w grupie chorych na łuszczycę pospolitą. Wynik ten wydaje się być zaskakujący, jednak należy zaznaczyć, że w cytowanej pracy brak jest informacji o doborze grupy badanej. Być może osoby te w czasie pobierania materiału do badań były pod wpływem czynników regulujących ekspresję HERV.

Z kolei Sekigawa i współpracownicy (2001) nie wykryli mRNA sekwencji HERV-E w limfocytach krwi obwodowej (PBL-ang. *peripheral blood lymphocytes*) osób zdrowych. Natomiast wykazali, że pod wpływem niektórych związków demetylujących dochodziło do uruchomienia aktywności transkrypcyjnej (Sekigawa i wsp., 2001). Związek uruchamiania transkrypcji sekwencji HERV pod wpływem substancji wykazujących działanie demetylujące wobec DNA, takich jak np. niektóre leki (prokainamid czy hydralazyna) wymaga dalszej analizy jako, że mogłyby one potencjalnie uruchamiać ekspresję HERV, a tym samym być potencjalnym czynnikiem wyzwalającym łuszczycę. Z drugiej jednak strony istnieje doniesienie wskazujące na poprawę stanu klinicznego łuszczycy po podawaniu hydralazyny, która posiada właściwości demetylujące (Isaac, 1982). W przyszłej pracy badawczej warto także podjąć, zasygnalizowany powyżej, temat obniżenia ekspresji białek HERV-E pod wpływem działania promieniowania UVB. To zjawisko może bowiem tłumaczyć terapeutyczne działanie naświetlań promieniami UV w łuszczycy (Molès i wsp., 2005).

6.3.2. HERV-R

W niniejszej rozprawie wykazano także istotnie statystycznie większy RA transkryptów sekwencji HERV-R pol env w PBMC osób chorych na łuszczycę w porównaniu do osób zdrowych. Namysł (2006) wykazał natomiast odwrotną zależność. Trzeba jednak zaznaczyć, że przebadał on małe grupy, bowiem zarówno grupa badana jak i kontrolna liczyły po 10 osób. Warto zauważyć, że istnieją także doniesienia świadczące o możliwym udziale HERV-R w etiopatogenezie chorób autoimmunizacyjnych. Przeciwciała skierowane przeciw HERV-R obserwowano u osób chorych na toczeń rumieniowaty układowy oraz zespół Sjögrena, natomiast przenikanie przeciwciał przez łożysko w czasie ciąży wydaje się mieć związek z częstością występowania zapalenia mięśnia sercowego oraz arytmia serca rozwijającego się płodu (za: Portis i wsp., 2002). Istnieją także doniesienia, że może on także stanowić marker choroby zwyrodnieniowej stawów (Nelson i wsp., 2010). W tym ujęciu zwiększenie liczby transkryptów omawianej sekwencji mogłoby sugerować jej możliwy udział w patogenezie łuszczycy. Warto wspomnieć, że Rubin i współpracownicy (1991) wykazali odmienne wzorce polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP- ang. *restriction fragment length polymorphism*) HERV-R u osób chorych na reumatoidalne zapalenie stawów oraz zdrowych (za: Takeuchi i wsp., 1995), co może wskazywać na znaczącą rolę nie samej liczby transkryptów, ale raczej miejsc polimorficznych w obrębie sekwencji endogennych retrowirusów.

Zaobserwowano także znaczący spadek względnej liczby transkryptów sekwencji HERV-R pol env w skórze zmienionej chorobowo w porównaniu do skóry pozornie zdrowej oraz zdrowej. Może być to związane z atrofią gruczołów łojowych obserwowaną w zmianach łuszczycowych (Werner i wsp., 2008). Wykazano bowiem wcześniej (Andersson i wsp., 1996), że ekspresja HERV-R jest znacznie podwyższona w gruczołach łojowych osób zdrowych. Ich zanik w zmianach łuszczycowych, mógłby być przyczyną odnotowanych różnic.

6.3.3. HERV-H

Na podstawie analizy wyników wykazano mniejszy RA transkryptów sekwencji HERV-H (*env62*) w skórze zmienionej chorobowo w porównaniu do skóry pozornie zdrowej jak i zdrowej. Nie wykryto natomiast istotnych statystycznie różnic w zakresie RA transkryptów w PBMC, choć wcześniej (Kowalczyk i wsp., 2010) obserwowaliśmy istotny statystycznie wzrost omawianej sekwencji w PBMC osób chorych na łuszczycę w porównaniu do osób zdrowych. Badanie to jednak było przeprowadzone na mniejszej liczbie osób. Zbieżne wyniki do tych uzyskanych w ramach niniejszej rozprawy uzyskano u chorych na *morphea*, gdzie wykazano, że istnieje statystycznie wzrost RA transkryptów w skórze zdrowej w porównaniu do skóry zmienionej chorobowo (Kowalczyk, 2012).

Jak już wspomniano we wstępie niniejszej dysertacji, produkt białkowy omawianej sekwencji ma właściwości immunosupresyjne. Mangeney i współpracownicy (2001) wykazali na modelu zwierzęcym, że w jego obecności dochodzi do proliferacji komórek nowotworowych w warunkach *in vivo*, podczas gdy przy jego braku nie dochodziło do rozrostu nowotworu. Biorąc pod uwagę spadek RA transkryptów HERV-H (*env-62*) w skórze zmienionej chorobowo, można przypuszczać, że niewielkie jest ryzyko transformacji nowotworowej wywołanej właśnie jego ekspresją u chorych na łuszczycę.

W tym miejscu warto także zastanowić się dlaczego geny *env* w ogóle ulegają translacji, tworząc funkcjonalne białka. Wiadomym jest, że są one konieczne tylko do wnikięcia wirusa do komórki, a zatem nie ma potrzeby ich translacji w czasie wewnątrzkomórkowej transpozycji sekwencji zintegrowanych już z genomem. W tym procesie niezbędne są jedynie produkty genów *pol* i *gag*. Uważa się, że otwarte ramki odczytu dla genów *env* wynikają z pełnienia przez białka ważnych dla gospodarza funkcji. Na przykład u myszy odporność na MLV jest kontrolowana przez *loci Fv*, z których dwa są związane z endogennymi retrowirusami. *Fv-1 locus* pochodzi z genu *gag* rodziny MuERV-L. Białkowy produkt blokuje replikację wirusa po jego wnikięciu do komórek gospodarza, przed integracją nowosyntetyzowanej nici DNA z jego genomem. Z kolei *locus Fv-4* koduje białko otoczki MLV, które zapobiega szerzeniu się infekcji MLV na

drodze zjawiska zwanego interferencją receptora. Receptory komórkowe zostają zablokowane przez białka otoczki wirusów, które już zainfekowały komórkę, chroniąc tym samym przed infekcją wirusami używającymi tych samych receptorów (de Parseval i Heidmann, 2005).

6.3.4. HERV-K

Udział rodziny HERV-K jest w szczególny sposób eksplorowany w badaniach dotyczących etiopatogenezy łuszczycy. Foerster i wsp. (2005) wykazali, że w obrębie PSORS1 znajduje się fragment HERV-K, kodujący hydrolazę trójfosforanu deoksyurydyny (dUTPazę), a jego dwa warianty jednonukleotydowych polimorfizmów (SNP- ang. *single nucleotide polymorphism*) pozwalają na różnicowanie haplotypów determinujących wysokie i niskie ryzyko zachorowania na *psoriasis* (Foerster i wsp., 2005). Odkąd wykazano, że dUTPaza produkowana przez wirus EBV bierze udział we wrodzonej odporności przez aktywację TLR 2 (ang. *toll-like receptor*) oraz modulowanie ekspresji genów zaangażowanych w ścieżki sygnałowe związane z cytokinami oraz interferonem, wysunięto hipotezę o możliwym udziale dUTPazy pochodzącej z HERV-K w etiopatogenezie łuszczycy (Ariza i wsp., 2011; Lai i wsp., 2012).

W niniejszej rozprawie odnotowano znaczący wzrost RA transkryptów HERV-K env w PBMC osób chorych na łuszczycę w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Wykazano także statystycznie istotne wzrosty w skórze pozornie zdrowej w porównaniu do skóry zmienionej chorobowo oraz zdrowej. Badania przeprowadzone wśród osób chorych na *morphea* również wykazywały zwiększoną ekspresję omawianej sekwencji w PBMC oraz w zmianach skórnych w porównaniu do grupy kontrolnej (Kowalczyk i wsp., 2012). Biorąc pod uwagę, że zwiększoną liczbę transkryptów HERV-K env wykrywa się w nowotworach piersi, a także jej potencjalnie onkogenne właściwości (Wang-Johanning i wsp., 2003), należałoby przeprowadzić kolejne badania, w celu oceny ryzyka transformacji nowotworowej u osób chorych na łuszczycę, związanej ze zwiększoną ekspresją HERV-K env.

W niniejszej rozprawie nie wykazano istotnych różnic w RA transkryptów HERV-K10 gag w PBMC chorych na łuszczycę oraz zdrowych. Co ciekawe Namysl i współpracownicy (2005) wykazali taki wzrost w porównaniu z osobami zdrowymi oraz cierpiącymi na twardzinę układową. Raz jeszcze należy zaznaczyć, że przeanalizowane przez cytowanych badaczy grupy były mało liczne. Przeprowadzone badania wskazują także na istotny statystycznie spadek RA transkryptów w skórze zmienionej chorobowo w porównaniu do skóry pozornie zdrowej oraz zdrowej. Są to wyniki, o tyle zaskakujące, że produkty białkowe genów *gag* uważane są za posiadające największy potencjał do wywoływania reakcji autoimmunizacyjnej, a białka kodowane przez HERV-K10 wykrywane były *in vivo* (Urnovitz i Murphy, 1996). Badania z zastosowaniem rekombinowanych konstruktów białkowych env, wykazały, że zarówno u osób zdrowych, chorych na nowotwory piersi, zakażonych HIV i cytomegalowirusem występują przeciwciała skierowane przeciwko białkom HERV-K 10 env. Na tej podstawie autorzy eksperymentu wyciągnęli wniosek, że ekspresja HERV zachodzi nie tylko na poziomie transkryptów, ale także na poziomie białek, które nie są obojętne dla ludzkiego organizmu, jako że są przeciw nim produkowane przeciwciała (za: Urnovitz i Murphy, 1996). Wykazano również, że produkt translacji jednego z prowirusów należących do rodziny K (HML-2) ma właściwości superantygenowe (de Parseval i Heidmann, 2005), co zaznaczono we wstępie niniejszej rozprawy. W tym kontekście nie dziwi fakt, że transkrypty HERV-K10 gag (Brodziak i wsp., 2012) niejednokrotnie wykrywane były u osób chorych na reumatoidalne zapalenie stawów zarówno w osoczu jak i komórkach mazi stawowej (Nelson i wsp., 2004).

6.3.5. HERV-W

Udział rodziny HERV-W oraz syncytyny jest szeroko badany w stwardnieniu rozsianym, gdzie wykazano akumulację produktów białkowych *gag* w aksonach (Perron i wsp., 2005; Perron i wsp., 2012), aktywacyjne działanie na makrofagi (Johnston i wsp.,

2001) oraz wywoływanie stanu zapalnego w mózgu (Firouzi i wsp., 2003; Bhat i wsp., 2011). Jeden z klonów zlokalizowany na chromosomie 11 wykazywał nadekspresję w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej chorych na schizofrenię (Yao i wsp., 2008). Transkrypty wykrywane były także u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (Gaudin P i wsp., 2000) oraz twardzinę układową (Namysł i wsp., 2006). Ze względu na fuzyjne właściwości syncytyny badano także udział HERV-W w procesie transformacji nowotworowej i wykazano ich udział w raku jelita grubego (Larsen i wsp., 2009), raku piersi (Bjerregaard i wsp., 2006) oraz jąder (Gimenez i wsp., 2010). HERV-W env wykrywany jest także w komórkach cytotrofoblastu, a inhibicja jego ekspresji w kulturach komórkowych prowadziła do spadku fuzji komórek oraz różnicowania (de Parseval i Heidmann, 2005).

W niniejszej pracy nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w RA transkryptów HERV-W env w PBMC pomiędzy grupą badaną oraz kontrolną. Uzyskane wyniki są odmienne od uzyskanych przez Namysła i współpracowników- wykazali oni istotnie statystyczny wzrost ekspresji sekwencji HERV-W w PBMC osób chorych na łuszczycę pospolitą w porównaniu do grupy osób zdrowych. Także badania przeprowadzone wśród chorych na *morphea* wykazały istotny wzrost liczby transkryptów w PBMC osób chorych (Kowalczyk i wsp., 2012).

W badaniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej wykazano natomiast istotnie statystyczny wzrost ekspresji HERV-W skórze pozornie zdrowej w porównaniu do skóry zmienionej chorobowo oraz zdrowej. Przy czym należy zaznaczyć, że omawianych transkryptów najwięcej było w skórze zdrowej. Również Kowalczyk i współpracownicy (2012) wykryli znaczący spadek RA transkryptów HERV-W env w skórze zmienionej chorobowo w porównaniu do skóry zdrowej. Wyniki te są o tyle zaskakujące, że niektóre z badań dowodzą iż produkty białkowe HERV-W działają prozapalnie w mózgu (Douville i wsp., 2011).

6.4. RÓŻNICE WE WZGLĘDNYM POZIOMIE TRANSKRYPTÓW HERV POMIĘDZY OSOBAMI W RÓŻNYCH STADIACH ZAKAŻENIA *HERPES SIMPLEX*

Liczne wyniki badań wskazują na transaktywacyjne działanie wirusów *herpes simplex* zarówno na wirusy egzo- jak i endogenne (Lee i wsp., 2003; Brudek i wsp., 2004; Brudek i wsp., 2007; Balada i wsp., 2009). W badaniach *in vitro* z użyciem materiału pochodzącego od chorych na stwardnienie rozsiane wykazano aktywacyjny wpływ herpeswirusów na ekspresję endogennych retrowirusów z rodziny H. Pod wpływem wirusa z rodziny herpes dochodziło do ekspresji białek HERV-H w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej. Eksperymenty te były odzwierciedleniem sytuacji *in vivo*, gdzie infekcja *herpes simplex* wpływała aktywująco na ekspresję retrowirusowej odwrotnej transkryptazy (Brudek i wsp., 2004; Brudek i wsp., 2007; Balada i wsp., 2009). Badania wskazywały również, że HSV-1 indukuje ekspresję HERV-W w komórkach ludzkiej neuroblastomy (Lafon i wsp., 2002), w komórkach nerwowych i endotelialnych mózgu (Ruprecht K. i wsp., 2006; Zwolińska, 2006). W innym doświadczeniu wykazano natomiast wzmożoną LRT-zależną transkrypcję HERV-K pod wpływem infekcji HSV, mediowaną prawdopodobnie przez białko ICP0 (ang. *infected cell polypeptide 0*) (Kwun i wsp., 2002; Nelson i wsp., 2004), którego jedną z funkcji jest aktywacja transkrypcji wielu wirusowych i komórkowych genów.

Co ciekawe w niniejszych badaniach nie wykazano wśród chorych na łuszczycę różnic we względnej liczbie transkryptów analizowanych sekwencji HERV w PBMC, skórze zmienionej chorobowo, jak i pozornie zdrowej pomiędzy osobami będącymi w różnych stadiach zakażenia *herpes simplex*. Przygotowując eksperyment zakładano, że takie różnice mogą występować zwłaszcza pomiędzy osobami zakażonymi i niezakażonymi HSV. Ze względu na szerokie rozpowszechnienie wirusa w populacji (nawet do 90%) (Chayavichitsilp i wsp., 2009) nie udało się zebrać dostatecznie dużej liczby osób niezakażonych, aby móc dokonać porównań metodami statystycznymi. Tylko 2 osoby wśród chorych na łuszczycę nie były zakażone.

Z drugiej jednak strony transaktywacyjne działanie *herpes simplex*, jak zaznaczono

powyżej, mediowane jest najprawdopodobniej przez białko ICP0. W czasie latencji jest ono wyciszane za pomocą antysensowanego RNA (Farrel i wsp., 1991). Można było zatem spodziewać się różnic w RA transkryptów HERV u osób w trakcie zakażenia (pierwotnego bądź wtórnego) w porównaniu do osób w czasie infekcji latentnej. Również takich różnic nie wykryto.

Warto zaznaczyć, że jak dotąd nie łączono zakażenia wirusami *herpes simplex* z łuszczycą, podczas gdy udział wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV *Human papilloma viruses*) w patogenie *psoriasis* był już dyskutowany. Majewski i Jabłońska (2003) wykryli w zmianach łuszczycowych DNA HPV oraz przeciwciała skierowane przeciw jego białkom, co w konsekwencji miałyby prowadzić do aktywacji limfocytów i nasilenia produkcji cytokin prozapalnych. Wydaje się zatem zasadne w dalszej pracy badawczej podjęcie tematu ewntualnej transaktywacji HERV przez HPV u chorych na łuszczycę.

6.5. WZGLĘDNY POZIOM TRANSKRYPTÓW WYBRANYCH HERV A KLINICZNY PRZEBIEG ŁUSZCZYCY

W ramach niniejszej pracy dokonano oceny różnic we względnym poziomie transkryptów pomiędzy osobami o różnym przebiegu klinicznym łuszczycy. Analizowano także zależności pomiędzy nasileniem klinicznym łuszczycy (mierzonym współczynnikiem PASI) oraz RA transkryptów. Zarówno w jednym jak i drugim przypadku brano pod uwagę względną liczbę transkryptów w PBMC. Biopaty były jedynie fragmentem skóry, a wskaźnik PASI odnosi się do jej całej powierzchni. Nie można, więc by było w tym wypadku wnioskować o różnicach bądź zależnościach.

Coraz częściej podnoszonym zarzutem względem użyteczności skal subiektywnych służących do oceny nasilenia zmian skórnych, w tym także PASI, jest mała zgodność ocen dokonywanych przez dwóch niezależnych badających (ang. *inter-rater reliability*). W przypadku PASI rzetelność ta jest najniższa dla wyników poniżej 20 (Gourraud i wsp., 2012). W niniejszych badaniach, aby zminimalizować błąd generowany

w trakcie subiektywnego szacowania, ocena kliniczna zawsze dokonywana była przez tą samą osobę.

Uzyskane wyniki wskazują, że nie ma istotnego statystycznie związku pomiędzy nasileniem łuszczycy a RA transkryptów HERV. Kowalczyk i współpracownicy (dane nieopublikowane) wykazali natomiast istotną statystycznie zależność pomiędzy klinicznym nasileniem *morphea* i aktywnością choroby a ekspresją HERV-W env. Z kolei Reynier i współpracownicy (2009) wykazali u osób chorych na reumatoidalne zapalenie stawów istotny statystycznie związek pomiędzy aktywnością choroby a mianem endogennych retrowirusów HERV-K(HML-2) w osoczu.

W niniejszej pracy odnotowano natomiast istotnie statystycznie większy RA transkryptów sekwencji HERV-E pol oraz HERV-H (env62) w PBMC u osób o łagodnym i umiarkowanym przebiegu choroby w porównaniu do osób o przebiegu ciężkim. Z jednej strony wynik taki wydawać się może zaskakujący. Z drugiej jednak biorąc pod uwagę immunosupresyjne właściwości produktu białkowego HERV-H (env62), wzmożona transkrypcja tej właśnie sekwencji może być raczej odpowiedzią na toczący się proces zapalny niż jego przyczyną, a tym samym skutkować łagodniejszym przebiegiem *psoriasis*.

6.6. PODSUMOWANIE

Należy mieć na uwadze, że uzyskane wyniki dają odpowiedź na pytanie o ekspresję HERV na poziomie RNA, co niekoniecznie musi bezpośrednio przekładać się na ilość białek. Znane są bowiem mechanizmy wyciszania bądź wyłączenia genów na drodze interferencji poprzez degradację mRNA, bądź blokowanie translacji (Fire i wsp., 1998; Fire, 2007). Z drugiej jednak strony, duże różnice w poziomie transkryptów endogennych retrowirusów w różnych tkankach wskazują na pełnienie przez nie ważnej dla organizmu roli. W przeciwnym razie ewolucyjna presja selekcyjna doprowadziłaby do zaniku bądź zmniejszenia transkrypcji.

Warto także zauważyć, że rejony promotorowe HERV zawierają miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych genów, które podlegają ekspresji w procesie zapalnym. W takiej sytuacji zwiększona ekspresja HERV zarówno na poziomie mRNA jak i białek, byłaby odpowiedzią na toczący się proces zapalny, a nie jego przyczyną. Z drugiej jednak strony wykrywana w licznych badaniach obecność przeciwciał anti-HERV świadczyłaby o tym, że produkty ich ekspresji nie są obojętne dla organizmu. Nawet jeśli HERV ulegają ekspresji w wyniku stanu zapalnego, możliwe jest, że dodatkowo go potęgują (Balada i wsp., 2009).

ROZDZIAŁ 7. WNIOSKI

1. Wyższy względny poziom transkryptów HERV-E pol, HERV-R pol env i HERV-K env w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej osób chorych, może świadczyć o ich udziale w procesach etiopatogenetycznych w łuszczycy.
2. W skórze pozornie zdrowej w porównaniu do skóry zmienionej chorobowo oraz zdrowej odnotowano wyższy względny poziom transkryptów sekwencji HERV-E pol oraz HERV-K env, co może stanowić argument na rzecz tezy o ich możliwej roli w zapoczątkowywaniu procesu autoimmunizacji.
3. Wydaje się, że wzmożona transkrypcja sekwencji HERV-H (env62) w grupie osób o łagodnym i umiarkowanym przebiegu łuszczycy w porównaniu do osób o przebiegu ciężkim jest raczej odpowiedzią na toczący się proces zapalny niż jego przyczyną.
4. Nie wydaje się, aby stadium zakażenia wirusem *herpes simplex* wpływało na poziom transkrypcji HERV.

- Albanesi C, De Pità O, Girolomoni G. (2007) Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. *Clin Dermatol.* 25(6):581-588.
- Andersson AC, Merza M, Venables P, Pontén F, Sundström J, Cohen M, Larsson E. (1996) Elevated levels of the endogenous retrovirus ERV3 in human sebaceous glands. *J Invest Dermatol.* 106(1):125-128.
- Andersson AC, Venables PJ, Tönjes RR, Scherer J, Eriksson L, Larsson E. (2002) Developmental expression of HERV-R (ERV3) and HERV-K in human tissue. *Virology.* 297(2):220-225.
- Andersson AC, Yun Z, Sperber GO, Larsson E, Blomberg J. (2005) ERV3 and related sequences in humans: structure and RNA expression. *J Virol.* 79(14):9270-9284.
- Antony JM, Deslauriers AM, Bhat RK, Ellestad KK, Power C. (2011) Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: innocent bystanders or disease determinants? *Biochim Biophys Acta.* 1812(2):162-176.
- Ariza ME, Williams MV. (2011) A human endogenous retrovirus K dUTPase triggers a TH1, TH17 cytokine response: does it have a role in psoriasis? *J Invest Dermatol.* 131(12):2419-2427.
- Armstrong AW, Schupp C, Bebo B. (2012) Psoriasis Comorbidities: Results from the National Psoriasis Foundation Surveys 2003 to 2011. *Dermatology.* 225(2):121-126.
- Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarrés M. (2009) Molecular mechanisms mediated by human endogenous retroviruses (HERVs) in autoimmunity. *Rev Med Virol.* 19(5):273-286.
- Balestrieri E, Arpino C, Matteucci C, Sorrentino R, Pica F, Alessandrelli R, Coniglio A, Curatolo P, Rezza G, Macciardi F, Garaci E, Gaudi S, Sinibaldi-Vallebona P. (2012) HERVs Expression in Autism Spectrum Disorders. *PLoS One.* 7(11):e48831.
- Bannert N, Kurth R. (2004) Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 Suppl 2:14572-14579.
- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics.* 21(3):389-395.
- Bessis D, Molès JP, Basset-Séguin N, Tesniere A, Arpin C, Guilhou JJ. (2004) Differential expression of a human endogenous retrovirus E transmembrane envelope glycoprotein in normal, psoriatic and atopic dermatitis human skin. *Br J Dermatol.* 151(4):737-745.
- Bhat RK, Ellestad KK, Wheatley BM, Warren R, Holt RA, Power C. (2011) Age- and disease-dependent HERV-W envelope allelic variation in brain: association with neuroimmune gene expression. *PLoS One.* 29;6(4):e19176.
- Bjerregaard B, Holck S, Christensen IJ, Larsson LI. (2006) Syncytin is involved in breast cancer-endothelial cell fusions. *Cell Mol Life Sci.* 63(16):1906-1911.
- Bjerregaard H, Pedersen S, Kristensen SR, Marcussen N. (2011) Reference genes for gene expression analysis by real-time reverse transcription polymerase chain reaction of renal cell carcinoma. *Diagn Mol Pathol.* 20(4): 212-217.

- Bonnet-Duquennoy M, Abaibou H, Tailhardat M, Lazou K, Bosset S, Le Varlet B, Cleuziat P, Kurfürst R. (2006). Study of housekeeping gene expression in human keratinocytes using OLISA, a long-oligonucleotide microarray and q RT-PCR. *Eur J Dermatol.* 16(2):136-140.
- Brodziak A, Ziółko E, Muc-Wierzgoń M, Nowakowska-Zajdel E, Kokot T, Klakla K. (2012) The role of human endogenous retroviruses in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Med Sci Monit.* (6):RA80-88.
- Brudek T, Christensen T, Hansen HJ, Bobecka J, Møller-Larsen A. (2004) Simultaneous presence of endogenous retrovirus and herpes virus antigens has profound effect on cell-mediated immune responses: implications for multiple sclerosis. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 20(4):415-423.
- Brudek T, Lühdorf P, Christensen T, Hansen HJ, Møller-Larsen A. (2007) Activation of endogenous retrovirus reverse transcriptase in multiple sclerosis patient lymphocytes by inactivated HSV 1, HHV-6 and VZV. *J Neuroimmunol.* 187(1-2):147-155.
- Büscher K, Hahn S, Hofmann M, Trefzer U, Ozel M, Sterry W, Löwer J, Löwer R, Kurth R, Denner J. (2006) Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 16(3):223-234.
- Chayavichitsilp P, Buckwalter JV, Krakowski AC, Friedlander SF. (2009) Herpes simplex. *Pediatr Rev.* 30(4):119-129.
- Chen YJ, Wu CY, Shen JL, Chu SY, Chen CK, Chang YT, Chen CM. (2008) Psoriasis independently associated with hyperleptinemia contributing to metabolic syndrome. *Arch Dermatol.* 144(12):1571-1575.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-159.
- Christensen T. (2005) Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev Med Virol.* 15(3):179-211.
- Christopers E, Mrowietz U. (2010) Łuszczyca. W: W. H. C. Burgdorf, G. Plewig, H. H. Wolf, M. Landthaler (red.), *Braun-Falco. Dermatologia* (t.1, s. 526-546). Lublin: Czelej.
- Christopers E. (2006) Etiopatogeneza łuszczycy. W: H. Wolska, A. Langner (red) *Łuszczyca* (wyd.1, s. 1-23). Lublin: Wydawnictwo Czelej.
- Ciesielska A, Sikorski M. (2008) Zastosowanie techniki PCR w czasie rzeczywistym do walidacji eksperymentu mikromacierzowego. *Biotechnologia.* 4(83):88-100.
- Contreras-Galindo R, Kaplan MH, Leissner P, Verjat T, Ferlenghi I, Bagnoli F, Giusti F, Dosik MH, Hayes DF, Gitlin SD, Markovitz DM. (2008) Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer. *J Virol.* 82(19):9329-9336.
- Cordaux R, Batzer MA.(2009) The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet.* 10(10):691-703.

- Davidovici BB, Sattar N, Prinz JC, Puig L, Emery P, Barker JN, van de Kerkhof P, Ståhle M, Nestle FO, Girolomoni G, Krueger JG. (2010) Psoriasis and systemic inflammatory diseases: potential mechanistic links between skin disease and comorbid conditions. *J Invest Dermatol.* 130(7):1785-1796.
- Davidsson S, Blomqvist K, Molin L, Mørk C, Sigurgeirsson B, Zachariae H, Zachariae R. (2005) Lifestyle of Nordic people with psoriasis. *Int J Dermatol.* 44(5):378-383.
- de Parseval N, Casella J, Gressin L, Heidmann T. (2001) Characterization of the three HERV-H proviruses with an open envelope reading frame encompassing the immunosuppressive domain and evolutionary history in primates. *Virology.* 279(2):558-569.
- de Parseval N, Heidmann T. (2005) Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet Genome Res.* 110(1-4):318-332.
- Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GA, Zumla A. (2005) The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem.* 344(1):141-143.
- Dickerson F, Rubalcaba E, Viscidi R, Yang S, Stallings C, Sullens A, Origoni A, Leister F, Yolken R. (2008) Polymorphisms in human endogenous retrovirus K-18 and risk of type 2 diabetes in individuals with schizophrenia. *Schizophr Res.* 104(1-3):121-126.
- Douville R, Liu J, Rothstein J, Nath A. (2011) Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 69(1):141-151.
- Duffin KC, Woodcock J, Krueger GG. (2010) Genetic variations associated with psoriasis and psoriatic arthritis found by genome-wide association. *Dermatol Ther.* 23(2):101-113.
- Ehlhardt S, Seifert M, Schneider J, Ojak A, Zang KD, Mehraein Y. (2006) Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) Rec expression and transcriptional activities in normal and rheumatoid arthritis synovia. *J Rheumatol.* 33(1):16-23.
- Eisenberg E, Levanon EY. (2003). Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet.* 19(7):362-365.
- Elder JT, Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Chia N, Christophers E, Voorhees JJ. (2001). The genetics of psoriasis 2001: the odyssey continues. *Arch Dermatol.* 137(11):1447-1434
- Elder JT, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Stuart PE, Tejasvi T, Voorhees JJ, Abecasis GR, Nair RP. (2010) Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *J Invest Dermatol.* 130(5):1213-1226.
- Farrell MJ, Dobson AT, Feldman LT. (1991) Herpes simplex virus latency-associated transcript is a stable intron. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(3):790-794.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391(6669):806-811.
- Fire AZ. (2007) Gene silencing by double-stranded RNA (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 46(37):6966-84.

- Firouzi R, Rolland A, Michel M, Jouvin-Marche E, Hauw JJ, Malcus-Vocanson C, Lazarini F, Gebuhrer L, Seigneurin JM, Touraine JL, Sanhadji K, Marche PN, Perron H. (2003) Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model. *J Neurovirol.* 9(1):79-93.
- Foerster J, Nolte I, Junge J, Bruinenberg M, Schweiger S, Spaar K, van der Steege G, Ehlert C, Mulder M, Kalscheuer V, Blumenthal-Barby E, Winter J, Seeman P, Ständer M, Sterry W, Te Meerman G. (2005) Haplotype sharing analysis identifies a retroviral dUTPase as candidate susceptibility gene for psoriasis. *J Invest Dermatol.* 124(1):99-102.
- Frank O, Giehl M, Zheng C, Hehlmann R, Leib-Mösch C, Seifarth W. (2005) Human endogenous retrovirus expression profiles in samples from brains of patients with schizophrenia and bipolar disorders. *J Virol.* 79(17):10890-10901.
- Frank O, Verbeke C, Schwarz N, Mayer J, Fabarius A, Hehlmann R, Leib-Mösch C, Seifarth W. (2008) Variable transcriptional activity of endogenous retroviruses in human breast cancer. *J Virol.* 82(4):1808-1818.
- Freimanis G, Hooley P, Ejtehadi HD, Ali HA, Veitch A, Rylance PB, Alawi A, Axford J, Nevill A, Murray PG, Nelson PN. (2010) A role for human endogenous retrovirus-K (HML-2) in rheumatoid arthritis: investigating mechanisms of pathogenesis. *Clin Exp Immunol.* 160(3):340-347.
- Fry L. (1988). Psoriasis. *Br J Dermatol.* 119:445-446.
- Fry L, Baker BS. (2007) Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clin Dermatol.* 25(6):606-615.
- Galadari I, Sharif MO, Galadari H. (2005) Psoriasis: a fresh look. *Clin Dermatol.* 23(5):491-502.
- Gaudin P, Ijaz S, Tuke PW, Marcel F, Paraz A, Seigneurin JM, Mandrand B, Perron H, Garson JA. (2000) Infrequency of detection of particle-associated MSR/V/HERV-W RNA in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 39(9):950-954.
- Gawkrodker DJ. (2008). Eruptions. W: DJ. Gawkrodker, *Dermatology* (wyd.4, s. 28-31). Elsevier: Churchill Livingstone.
- Gifford R, Tristem M. (2003) The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes.* 26(3):291-315.
- Gimenez J, Montgiraud C, Pichon JP, Bonnaud B, Arsac M, Ruel K, Bouton O, Mallet F. (2010) Custom human endogenous retroviruses dedicated microarray identifies self-induced HERV-W family elements reactivated in testicular cancer upon methylation control. *Nucleic Acids Res.* 38(7):2229-2246.
- Gourraud PA, Le Gall C, Puzenat E, Aubin F, Ortonne JP, Paul CF. (2012) Why statistics matter: limited inter-rater agreement prevents using the psoriasis area and severity index as a unique determinant of therapeutic decision in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 132(9):2171-2175.
- Gudjonsson JE, Elder JT. (2007). Psoriasis: epidemiology. *Clin Dermatol.* 25(6):535-546.

- Hahn S, Ugurel S, Hanschmann KM, Strobel H, Tondera C, Schadendorf D, Löwer J, Löwer R. (2008) Serological response to human endogenous retrovirus K in melanoma patients correlates with survival probability. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 24(5):717-723.
- Hashido M, Kawana T. (1997) Herpes simplex virus-specific IgM, IgA and IgG subclass antibody responses in primary and nonprimary genital herpes patients. *Microbiol Immunol*. 41(5):415-420.
- Hawro T, Janusz I, Zalewska A. (2011). Jakość życia i stygmatyzacja a nasilenie zmian skórnych i świądu u osób chorych na łuszczycę. W: T. Rzepa, J. Szepietowski, R. Żaba (red.), *Psychologiczne i medyczne aspekty chorób skóry* (wyd.1, s. 166-172). Wrocław: Cornetis.
- Herbst H, Sauter M, Kühler-Obbarius C, Löning T, Mueller-Lantzsch N. (1998) Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in germ cell and trophoblastic tumours. *APMIS*. 106(1):216-220.
- Hervé CA, Forrest G, Löwer R, Griffiths DJ, Venables PJ. (2004) Conservation and loss of the ERV3 open reading frame in primates. *Genomics*. 83(5):940-943.
- Hohenadl C, Germaier H, Walchner M, Hagenhofer M, Herrmann M, Stürzl M, Kind P, Hehlmann R, Erfle V, Leib-Mösch C. (1999) Transcriptional activation of endogenous retroviral sequences in human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *J Invest Dermatol*. 113(4):587-594.
- Hu L, Hornung D, Kurek R, Ostman H, Blomberg J, Bergqvist A. (2006) Expression of human endogenous gammaretroviral sequences in endometriosis and ovarian cancer. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 22(6):551-557.
- Huerta C, Rivero E, Rodríguez LA. (2007) Incidence and risk factors for psoriasis in the general population. *Arch Dermatol*. 143(12):1559-1565.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409(6822):860-921.
- International Psoriasis Genetics Consortium. (2003) The International Psoriasis Genetics Study: assessing linkage to 14 candidate susceptibility loci in a cohort of 942 affected sib pairs. *Am J Hum Genet*. 73(2):430-437.
- Isaac P. (1982) Hydralazine and psoriasis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 285(6343): 744.
- Iversen OJ. (1983) Isolation of virus-like particles in urine from a psoriatic patient. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B*. 91(6):407-412
- Iwabuchi H, Kakihara T, Kobayashi T, Imai C, Tanaka A, Uchiyama M, Fukuda T. (2004) A gene homologous to human endogenous retrovirus overexpressed in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 45(11):2303-2306.
- Jabłońska S, Majewski S. (2008). Łuszczycyca i dermatozy łuszczycopodobne. W: S. Jabłońska, S. Majewski, *Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową* (wyd. 1, s. 205-224). Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- Janowski, K. (2006). *Osobowościowe uwarunkowania radzenia sobie ze stresem łuszczycy*. Lublin: Wydawnictwo Polihymnia.

- Johnston JB, Silva C, Holden J, Warren KG, Clark AW, Power C. (2001) Monocyte activation and differentiation augment human endogenous retrovirus expression: implications for inflammatory brain diseases. *Ann Neurol.* 50(4):434-442
- Jordan IK, Rogozin IB, Glazko GV, Koonin EV. (2003) Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. *Trends Genet.* 19(2):68-72.
- Jura J, Słomski R. (2004). Ocena ilościowa i jakościowa preparatów DNA i RNA. W: R. Słomski (red) *Przykłady analiz DNA* (wyd.1, s. 38-40). Poznań: Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu.
- Juto P, Settergren B. (1988) Specific serum IgA, IgG and IgM antibody determination by a modified indirect ELISA-technique in primary and recurrent herpes simplex virus infection. *Journal of Virological Methods* 20(1): 45–55.
- Kawaguchi M, Mitsuhashi Y, Kondo S. (2005). Overexpression of tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme in psoriasis. *Br J Dermatol.* 152(5):915-919.
- Khodosevich K, Lebedev Y, Sverdlov E. (2002) Endogenous retroviruses and human evolution. *Comp Funct Genomics.* 3(6):494-498.
- Kim H, Crow TJ, Hyun BH. (2000) Assignment of the endogenous retrovirus HERV-R (ERV3) to human chromosome 7q11.2 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet.* 89(1-2):10.
- Kim HS, Yi JM, Hirai H, Huh JW, Jeong MS, Jang SB, Kim CG, Saitou N, Hyun BH, Lee WH. (2006) Human Endogenous Retrovirus (HERV)-R family in primates: Chromosomal location, gene expression, and evolution. *Gene.* 370:34-42.
- Kowalczyk MJ, Szramka-Pawlak B, Zaba R, Silny W (2010) Upregulation of HERV-H env gene in psoriasis vulgaris. Proceedings of the 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research (ESDR), Helsinki, Finland. Sept 8-11, streszczenie zjazdowe.
- Kowalczyk MJ, Szramka-Pawlak B, Zaba R, Silny W. (2010) Downregulation of HERV-E pol gene in psoriasis vulgaris. Proceedings of the 19th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology, Gothenburg, Sweden. Oct 6-10, streszczenie zjazdowe.
- Kowalczyk MJ, Dańczak-Pazdrowska A, Szramka-Pawlak B, Zaba R, Silny W, Osmola-Mańkowska A. (2012) Expression of selected human endogenous retroviral sequences in skin and peripheral blood mononuclear cells in morphea. *Arch Med Sci.* 8(5):819-825.
- Kremers HM, McEvoy MT, Dann FJ, Gabriel SE. (2007) Heart disease in psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 57(2):347-354.
- Krueger G, Ellis CN. (2005) Psoriasis--recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. *J Am Acad Dermatol.* 53(1 Suppl 1):S94-100.
- Kudaka W, Oda T, Jinno Y, Yoshimi N, Aoki Y. (2008) Cellular localization of placenta-specific human endogenous retrovirus (HERV) transcripts and their possible implication in pregnancy-induced hypertension. *Placenta.* 29(3):282-289.

- Kwun HJ, Han HJ, Lee WJ, Kim HS, Jang KL. (2002) Transactivation of the human endogenous retrovirus K long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein 0. *Virus Res.* 86(1-2):93-100.
- Lafon M, Jouvin-Marche E, Marche PN, Perron H. (2002) Human viral superantigens: to be or not to be transactivated? *Trends Immunol.* 23(5):238-29.
- Lai OY, Chen H, Michaud HA, Hayashi G, Kuebler PJ, Hultman GK, Ariza ME, Williams MV, Batista MD, Nixon DF, Foerster J, Bowcock AM, Liao W. (2012) Protective effect of human endogenous retrovirus K dUTPase variants on psoriasis susceptibility. *J Invest Dermatol.* 132(7):1833-1840.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J i wsp. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409(6822):860-921
- Larsen JM, Christensen IJ, Nielsen HJ, Hansen U, Bjerregaard B, Talts JF, Larsson LI. (2009) Syncytin immunoreactivity in colorectal cancer: potential prognostic impact. *Cancer Lett.* 18;280(1):44-49.
- Larsson E, Andersson G.(1998) Beneficial role of human endogenous retroviruses: facts and hypotheses. *Scand J Immunol.* 48(4):329-338.
- Lee WJ, Kwun HJ, Kim HS, Jang KL. (2003) Activation of the human endogenous retrovirus W long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein 1. *Mol Cells.* 15(1):75-80.
- Leung DY, Travers JB, Giorno R, Norris DA, Skinner R, Aelion J, Kazemi LV, Kim MH, Trumble AE, Kotb M, i wsp. (1995) Evidence for a streptococcal superantigen-driven process in acute guttate psoriasis. *J Clin Invest.* 96(5):2106–2112.
- Liang Q, Xu Z, Xu R, Wu L, Zheng S. (2012) Expression patterns of non-coding spliced transcripts from human endogenous retrovirus HERV-H elements in colon cancer. *PLoS One.* 7(1):e29950.
- Louden BA, Pearce DJ, Lang W, Feldman SR. (2004) A Simplified Psoriasis Area Severity Index (SPASI) for rating psoriasis severity in clinic patients. *Dermatol Online J.* 10(2):7.
- Löwer R, Löwer J, Kurth R. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(11):5177-5184.
- Łuczkowska M, Żaba R. (2011). Łuszczyca. W: T. Rzepa, J. Szepietowski, R. Żaba (red.), *Psychologiczne i medyczne aspekty chorób skóry* (wyd.1, s. 166-172). Wrocław: Cornetis.
- Macias ES, Pereira FA, Rietkerk W, Safai B. (2011) Superantigens in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 64(3):455-472.
- Majewski S, Jabłońska S. (2003) Possible involvement of epidermodysplasia verruciformis human papillomaviruses in the immunopathogenesis of psoriasis: a proposed hypothesis. *Exp Dermatol.* 12(6):721-728.

- Mameli G, Poddighe L, Mei A, Uleri E, Sotgiu S, Serra C, Manetti R, Dolei A. (2012) Expression and activation by epstein barr virus of human endogenous retroviruses-w in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis. *PLoS One*. 7(9):e44991.
- Mangeny M, de Parseval N, Thomas G, Heidmann T. (2001) The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. *J Gen Virol*. 82(Pt 10):2515-2518.
- Mayer J, Meese E. Human endogenous retroviruses in the primate lineage and their influence on host genomes. (2005) *Cytogenet Genome Res*. 110(1-4):448-456.
- Miękoś-Zydek B, Ryglewska-Cho A, Lassota-Falczewska M, Czyż P, Kaszuba A. (2006). Jakość życia pacjentów w łuszczycą. *Postępy Dermatologii i Alergologii*, XXIII:273-277.
- Molès JP, Tesniere A, Guilhou JJ. (2000) Expression of new endogenous retroviral sequences in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 115:576, streszczenie zjazdowe
- Molès JP, Tesniere A, Guilhou JJ. (2005) A new endogenous retroviral sequence is expressed in skin of patients with psoriasis. *Br J Dermatol*. 153 (1):83-89
- Morris GE, Coleman RM, Best JM, Benetato BB, Nahmias AJ. (1985) Persistence of serum IgA antibodies to herpes simplex, varicella-zoster, cytomegalovirus, and rubella virus detected by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Med Virol*. 16(4):343-349.
- Muir A, Lever AM, Moffett A. Human endogenous retrovirus-W envelope (syncytin) is expressed in both villous and extravillous trophoblast populations. (2006) *J Gen Virol*. 87(Pt 7):2067-2071
- Mullis KB, Faloona FA. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 155:335-350.
- Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NVC, Jenisch S, Weichenthal M, Abecasis GR, Lim HW, Christophers E, Voorhees JJ, Elder JT. (2006) Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet*. 78(5):827-851.
- Naldi L, Mercuri SR. (2010) Epidemiology of comorbidities in psoriasis. *Dermatol Ther*. 23(2):114-118.
- Namysł J, Osmola A, Prokop J. (2005). Ekspresja sekwencji ludzkich endogennych retrowirusów u chorych z twardziną układową i różnymi odmianami klinicznymi łuszczycy. *Postep Derm Alergol*. 22(2):99-104.
- Namysł J. (2006). *Identyfikacja i analiza ekspresji endogennych sekwencji retrowirusowych oraz genów kodujących wybrane cytokiny i ich receptory w przebiegu twardziny układowej i różnych odmianach klinicznych łuszczycy*. Rozprawa doktorska. Katedra i Klinika Dermatologii AM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.
- Nellåker C, Yao Y, Jones-Brando L, Mallet F, Yolken RH, Karlsson H. (2006) Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection. *Retrovirology*. 6;3:44.

- Nelson P, Davari-Ejtehadi H, Nevill A, Bowman S. (2010) Endogenous retrovirus ERV-3 is not implicated in rheumatoid arthritis but may provide a biomarker for osteoarthritis. *J Rheumatol*. 37(2):473.
- Nelson PN, Carnegie PR, Martin J, Davari Ejtehadi H, Hooley P, Roden D, Rowland-Jones S, Warren P, Astley J, Murray PG. (2003) Demystified. Human endogenous retroviruses. *Mol Pathol*. 56(1):11-18.
- Nelson PN, Hooley P, Roden D, Davari Ejtehadi H, Rylance P, Warren P, Martin J, Murray PG; Molecular Immunology Research Group. (2004) Human endogenous retroviruses: transposable elements with potential? *Clin Exp Immunol*. 138(1):1-9.
- Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. (2009) Psoriasis. *N Engl J Med*. 361(5):496-509.
- Ogasawara H, Okada M, Kaneko H, Hishikawa T, Sekigawa I, Iida N, Maruyama N, Yamamoto N, Hashimoto H. (2001) Quantitative comparison of human endogenous retrovirus mRNA between SLE and rheumatoid arthritis. *Lupus*. 10(7):517-718.
- Pacan P, Szepietowski JC, Kiejna A. (2003). Stressful Life Events and Depression in Patients Suffering from Psoriasis Vulgaris. *Dermatol Psychosom*. 4:142-145
- Pan D, Shin YH, Gopalakrishnan G, Hennessey J, De Groot LJ. (2009) Regulatory T cells in Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 71(4):587-593.
- Parisi R, Symmons DP, Griffiths CE, Ashcroft DM; on behalf of the Identification and Management of Psoriasis and Associated Comorbidity (IMPACT) project team. (2012) Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. *J Invest Dermatol*. 2012 Sep 27. doi: 10.1038/jid.2012.339.
- Perron H, Lazarini F, Ruprecht K, Péchoux-Longin C, Seilhean D, Sazdovitch V, Créange A, Battail-Poirot N, Sibai G, Santoro L, Jolivet M, Darlix JL, Rieckmann P, Arzberger T, Hauw JJ, Lassmann H. (2005) Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. *J Neurovirol*. 11(1):23-33.
- Perron H, Germi R, Bernard C, Garcia-Montojo M, Deluen C, Farinelli L, Faucard R, Veas F, Stefan I, Fabrik BO, Van-Horssen J, Van-der-Valk P, Gerdil C, Mancuso R, Saresella M, Clerici M, Marcel S, Creange A, Cavaretta R, Caputo D, Arru G, Morand P, Lang AB, Sotgiu S, Ruprecht K, Rieckmann P, Villoslada P, Chofflon M, Boucraut J, Pelletier J, Hartung HP. (2012) Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Mult Scler*. Mar 30 DOI: 10.1177/1352458512441381
- Portis JL. (2002) Perspectives on the role of endogenous human retroviruses in autoimmune diseases. *Virology*. 25:296(1):1-5.
- Posnett DN, Yarilina AA. (2001) Sleeping with the enemy--endogenous superantigens in humans. *Immunity*. 15(4):503-506.
- Rapp SR, Feldman, S.R., Exum, M.L., Fleischer, A.B. Jr, Reboussin, D.M. (1999). Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *J Am Acad Dermatol*, 41(3 Pt 1):401-407.
- Reich K. (2012). The concept of psoriasis as a systemic inflammation: implications for disease management. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 26 (Suppl 2):3-11.

- Reynier F, Verjat T, Turrel F, Imbert PE, Marotte H, Mouglin B, Miossec P. (2009) Increase in human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) viral load in active rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.* 70(3):295-299.
- Romanowski T, Markiewicz A, Bednarz N, Bielawski KP. (2007). Geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne w ilościowym oznaczaniu ekspresji genów metodą real-time PCR, *Postepy Hig Med Dosw (Online.)*, 61:500-510.
- Rote NS, Chakrabarti S, Stetzer BP. (2004) The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. *Placenta.* 25(8-9):673-683.
- Rubin LA, Siminovitch KA, Shi MH, Cohen M. (1991) A novel retroviral gene association with rheumatoid arthritis (RA). *Arthritis Rheum.* 34:S60.
- Ruprecht K, Obojes K, Wengel V, Gronen F, Kim KS, Perron H, Schneider-Schaulies J, Rieckmann P. (2006) Regulation of human endogenous retrovirus W protein expression by herpes simplex virus type 1: implications for multiple sclerosis. *J Neurovirol.* 12(1):65-71.
- Sauter M, Roemer K, Best B, Afting M, Schommer S, Seitz G, Hartmann M, Mueller-Lantzsch N. (1996) Specificity of antibodies directed against Env protein of human endogenous retroviruses in patients with germ cell tumors. *Cancer Res.* 56(19):4362-4365.
- Schafer T. (2006). Epidemiology of psoriasis. Review and the German perspective. *Dermatology*, 212(4):327-337.
- Schmitt J, Wozel G. (2005). The Psoriasis Area and Severity Index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque -type psoriasis. *Dermatology*, 210, 194-199.
- Sekigawa I, Ogasawara H, Kaneko H, Hishikawa T, Hashimoto H. (2001) Retroviruses and autoimmunity. *Intern Med.* 40(2):80-86.
- Shiroma T, Sugimoto J, Oda T, Jinno Y, Kanaya F. (2001) Search for active endogenous retroviruses: identification and characterization of a HERV-E gene that is expressed in the pancreas and thyroid. *J Hum Genet.* 46(11):619-625.
- Sicat J, Sutkowski N, Huber BT. (2005) Expression of human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen is elevated in juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 32(9):1821-1831.
- Słomski R, Szalata M, Napierała D, Kaczmarek M, Kowalska K, Wielgus K. (2004) Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR). W: R. Słomski (red) *Przykłady analiz DNA* (wyd.1, s. 79-89). Poznań: Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu.
- Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, Ucla C, Sutkowski N, Huber B, Pelet T, Conrad B. (2001) Interferon-alpha-induced endogenous superantigen. a model linking environment and autoimmunity. *Immunity.* 15(4):591-601.
- Steele PE, Rabson AB, Bryan T, Martin MA. (1984) Distinctive termini characterize two families of human endogenous retroviral sequences. *Science.* 225(4665):943-947.

- Stern RS, Nijsten T, Feldman SR, Margolis DJ, Rolstad T. (2004). Psoriasis is common, carries a substantial burden even when not extensive, and is associated with widespread treatment dissatisfaction. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 9(2):136-139.
- Subramanian RP, Wildschutte JH, Russo C, Coffin JM. (2011) Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML 2) group of human endogenous retroviruses. *Retrovirology*. 8;8:90.
- Sundberg EJ, Deng L, Mariuzza RA. (2007) TCR recognition of peptide/MHC class II complexes and superantigens. *Semin Immunol*. 19(4):262-271.
- Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT. (2001) Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity*. 15(4):579-589
- Szramka-Pawlak B, Kowalczyk MJ, Żaba R. (2011) Palenie tytoniu sprzyja zachorowaniu na łuszczycę- mit czy rzeczywistość? W: Psychologiczne i medyczne aspekty chorób skóry. Rzepa, Szepietowski, Żaba (red). Cornetis: Wrocław
- Takahashi H, Iizuka H. (2012) Psoriasis and metabolic syndrome. *J Dermatol*. 39(3):212-218.
- Takeuchi K, Katsumata K, Ikeda H, Minami M, Wakisaka A, Yoshiki T. (1995) Expression of endogenous retroviruses, ERV3 and lambda 4-1, in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 99(3):338-444.
- Taruscio D, Floridia G, Zoraqi GK, Mantovani A, Falbo V. (2002) Organization and integration sites in the human genome of endogenous retroviral sequences belonging to HERV-E family. *Mamm Genome*. 13(4):216-222.
- Turbeville MA, Rhodes JC, Hyams DM, Distler CM, Steele PE. (1997) Characterization of a putative retroviral env-related human protein. *Pathobiology*. 65(3):123-128.
- Valdimarsson H. (2007). The genetic basis of psoriasis. *Clin Dermatol*. 25(6):563-567.
- Valdimarsson H, Thorleifsdottir RH, Sigurdardottir SL, Gudjonsson JE, Johnston A. (2009) Psoriasis--as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends Immunol*. 30(10):494-501.
- van de Kerkhof PC. (2004). The impact of a two -compound product containing calcipotriol and betamethasone dipropionate (Daivobet/Dovobet) on the quality of life in patients with psoriasis vulgaris: a randomized controlled trial. *British Journal of Dermatology* 151(3):663 -668.
- Villesen P, Aagaard L, Wiuf C, Pedersen FS. (2004) Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology*. 11;1:32.
- Walkowiak H, Zaba R. (2012) Epidemiologia zakażeń W: R. Żaba (red) *Opryszczka, półpasiec, ospa wietrzna* (wyd.1, s. 45-81). Poznań: Termedia Wydawnictwa Medyczne
- Wang-Johanning F, Frost AR, Jian B, Azerou R, Lu DW, Chen DT, Johanning GL. (2003) Detecting the expression of human endogenous retrovirus E envelope transcripts in human prostate adenocarcinoma. *Cancer*. 98(1):187-197.

- Wang-Johanning F, Frost AR, Jian B, Epp L, Lu DW, Johanning GL. (2003a) Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene*. 22(10):1528-1535.
- Wang-Johanning F, Liu J, Rycaj K, Huang M, Tsai K, Rosen DG, Chen DT, Lu DW, Barnhart KF, Johanning GL. (2007) Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *Int J Cancer*. 120(1):81-90.
- Weisenseel P, Laumbacher B, Besgen P, Ludolph-Hauser D, Herzinger T, Roecken M, Wank R, Prinz J. (2002). Streptococcal infection distinguishes different types of psoriasis. *J Med Genet*. 39(10):767-768.
- Werner B, Brenner FM, Böer A. (2008) Histopathologic study of scalp psoriasis: peculiar features including sebaceous gland atrophy. *Am J Dermatopathol*. 30(2):93-100.
- Wilkinson DA, Freeman JD, Goodchild NL, Kelleher CA, Mager DL. (1990) Autonomous expression of RTVL-H endogenous retroviruslike elements in human cells. *J Virol*. 64(5):2157-2167.
- Yang YW, Keller JJ, Lin HC. (2011) Medical comorbidity associated with psoriasis in adults: a population-based study. *Br J Dermatol*. 165(5):1037-1043.
- Yao Y, Schröder J, Nellåker C, Bottmer C, Bachmann S, Yolken RH, Karlsson H. (2008) Elevated levels of human endogenous retrovirus-W transcripts in blood cells from patients with first episode schizophrenia. *Genes Brain Behav*. 7(1):103-112.
- Yi JM, Kim HS. (2006) Molecular evolution of the HERV-E family in primates. *Arch Virol*. 151(6):1107-1116.
- Yi JM, Kim HS. (2007) Molecular phylogenetic analysis of the human endogenous retrovirus E (HERV-E) family in human tissues and human cancers. *Genes Genet Syst*. 82(1):89-98.
- Zainuddin A, Chua KH, Abdul Rahim N, Makpol S. (2010). Effect of experimental treatment on GAPDH mRNA expression as a housekeeping gene in human diploid fibroblasts. *BMC Mol Biol*. 14;11:59.
- Zhao J, Rycaj K, Geng S, Li M, Plummer JB, Yin B, Liu H, Xu X, Zhang Y, Yan Y, Glynn SA, Dorsey TH, Ambs S, Johanning GL, Gu L, Wang-Johanning F. (2011) Expression of Human Endogenous Retrovirus Type K Envelope Protein is a Novel Candidate Prognostic Marker for Human Breast Cancer. *Genes Cancer*. 2(9):914-922.
- Zwolińska K. (2006) Sekwencje pochodzenia retrowirusowego w genomie człowieka. Ludzkie endogenne retrowirusy (HERV). *Postepy Hig Med Dosw*. 60:637-652.

Media elektroniczne:

http://biomedicalgenomics.org/RNA_quality_control.html dostęp z 06.07.2012

Quality assessment of total RNA.

http://www.viomecum.ch/index.cfm?uuid=BA9FDDFD34F842109E54874B96166910&o_lang_id=2 dostęp z 06.07.2012

Interpretation: Infection - Herpes simplex virus (HSV)

STRESZCZENIE

Od lat dyskutowane są teorie nad potencjalną rolą ludzkich endogennych retrowirusów (HERV) w etiopatogenezie licznych schorzeń. Wyniki badań z zastosowaniem coraz to czulszych metod molekularnych dostarczają kolejnych argumentów na rzecz tej tezy. Równocześnie istnieje coraz więcej dowodów na możliwy udział infekcji wirusami egzogennymi w aktywacji sekwencji endogennych retrowirusów, potencjalnie skutkujących ich udziałem w procesach autoimmunizacyjnych.

Na podstawie powyższych przesłanek postawiono następującą hipotezę badawczą: Ludzkie endogenne retrowirusy mogą wpływać na funkcjonowanie organizmu oraz wykazują potencjalne właściwości inicjacji procesów immunizacyjnych, przez co mogą mieć udział w etiopatogenezie łuszczycy. Zakażenie wirusem *herpes simplex* może prowadzić do transaktywacji HERV.

Celem badawczym niniejszej pracy była odpowiedź na następujące pytania:

1. Jaki jest względny poziom transkryptów HERV u osób chorych na łuszczycę i osób zdrowych w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz w skórze?
2. Czy istnieje istotna statystycznie różnica we względnym poziomie transkryptów wybranych HERV pomiędzy skórą zmienioną chorobowo oraz pozornie zdrową osób chorych na łuszczycę?
3. Czy istnieje istotna statystycznie różnica we względnym poziomie transkryptów wybranych HERV pomiędzy osobami chorymi na łuszczycę a zdrowymi?
4. Czy istnieje istotna statystycznie różnica we względnym poziomie transkryptów wybranych HERV pomiędzy osobami w różnych stadiach zakażenia *herpes simplex*?
5. Czy istnieje istotna statystycznie różnica we względnym poziomie transkryptów wybranych HERV pomiędzy osobami o różnym przebiegu klinicznym łuszczycy?

Badaniem objęto 45 osób chorych na łuszczycę. Od 24 z nich pobrano krew obwodową oraz 2 biopaty: jeden ze skóry chorobowo zmienionej, a drugi ze skóry pozornie zdrowej. Od pozostałych 21 osób pobrano tylko krew obwodową. Wyróżniono także 2 grupy kontrolne:

- 45 zdrowych ochotników, od których pobrano krew obwodową
- 14 chorych na nowotwory nie wykazujących związków ze skórą. W trakcie zabiegów chirurgicznych, do których wskazaniem była choroba podstawowa pobrano wycinki skóry.

Izolację całkowitego RNA przeprowadzono według procedury opracowanej przez Chomczyńskiego i Sacchi, a następnie przepisano na komplementarny DNA (cDNA). Analizę względnego poziomu transkryptów wykonano techniką reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z użyciem funkcji absolutnej analizy ilościowej oraz krzywej standardowej. Wyniki wyrażano jako względny poziom transkryptów (RA) w badanej próbce w przeliczeniu na milion kopii transkryptów genu referencyjnego (GAPDH). Poziomy przeciwciał w klasie M, G oraz A przeciwko wirusowi *herpes simplex* typu I oraz II oznaczono w osoczach z zastosowaniem immunoenzymatycznych testów fazy stałej (ELISA), natomiast oceny stanu klinicznego dokonano z użyciem obserwacyjnej „Skali oceny nasilenia łuszczycy” (PASI).

Wykazano wyższy względny poziom transkryptów HERV-E pol, HERV-R pol env i HERV-K env w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej osób chorych. W skórze pozornie zdrowej w porównaniu do skóry zmienionej chorobowo odnotowano wyższy względny poziom transkryptów wszystkich analizowanych sekwencji. Wykazano także istotny statystycznie wyższy względny poziom transkryptów sekwencji HERV-E pol oraz HERV-K env, natomiast niższy HERV-R pol env oraz HERV-W env w skórze pozornie zdrowej osób chorych na łuszczycę w porównaniu z skórą zdrową pobraną od osób z grupy kontrolnej. Stwierdzono również istotnie statystycznie niższy RA transkryptów wszystkich badanych sekwencji z wyjątkiem HERV-K env w skórze zmienionej chorobowo w porównaniu do skóry zdrowej. Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost

względnej liczby transkryptów sekwencji HERV-E pol oraz HERV-H (env62) w grupie osób o łagodnym i umiarkowanym przebiegu łuszczycy w porównaniu do osób o przebiegu ciężkim. Nie wykazano różnic w RA analizowanych sekwencji pomiędzy osobami w poszczególnych stadiach infekcji HSV.

Na podstawie uzyskanych wyników wysunięto następujące wnioski:

1. Wyższy względny poziom transkryptów HERV-E pol, HERV-R pol env i HERV-K env w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej osób chorych, może świadczyć o ich udziale w procesach etiopatogenetycznych w łuszczycy.
2. W skórze pozornie zdrowej w porównaniu do skóry zmienionej chorobowo oraz zdrowej odnotowano wyższy względny poziom transkryptów sekwencji HERV-E pol oraz HERV-K env, co może stanowić argument na rzecz tezy o ich możliwej roli w zapoczątkowywaniu procesu autoimmunizacji.
3. Wydaje się, że wzmożona transkrypcja sekwencji HERV-H (env62) w grupie osób o łagodnym i umiarkowanym przebiegu łuszczycy w porównaniu do osób o przebiegu ciężkim jest raczej odpowiedzią na toczący się proces zapalny niż jego przyczyną.
4. Nie wydaje się, aby stadium zakażenia wirusem *herpes simplex* wpływało na poziom transkrypcji HERV.

ABSTRACT

Multiple theories concerning the potential influence of human endogenous retroviruses (HERV) have been debated for years. The results of studies with the use of increasingly sensitive molecular methods are concordant with these theses. At the same time, more pieces of evidence emerge that point to the influence of exogenous viral activation on endogenous retroviruses, leading to their role in autoimmunologic processes.

Based on this, the following hypothesis was formulated: Human endogenous retroviruses may influence functions of the body and potentially initiate autoimmunologic processes, hence might play a role in the etiopathogenesis of psoriasis.

Herpes simplex infection may lead to HERV transactivation.

The goal of the study was to answer the following questions:

1. What is the relative HERV transcript level of psoriatic patients and healthy people in peripheral blood mononuclear cell and skin?
2. Is there a statistically significant difference between the relative transcript levels of selected HERV comparing the affected and apparently healthy skin of psoriatic patients?
3. Is there a statistically significant difference between the relative transcript levels of selected HERV comparing psoriatic patients and healthy people?
4. Is there a statistically significant difference between the relative transcript levels of selected HERV comparing groups of patients with different stages of *herpes simplex* infection?
5. Is there a statistically significant difference between the relative transcript levels of selected HERV comparing groups of patients with different clinical stages of psoriasis?

The study involved 45 patients with psoriasis. In 24 cases peripheral blood and two skin samples were acquired: one from the affected and the other from the apparently healthy skin. The remaining 21 patients provided peripheral blood only. Additionally, there were two control groups:

- 45 healthy volunteers, who provided peripheral blood
- 14 patients with skin-independent neoplasms. Healthy skin samples were acquired during surgeries performed on these neoplasms.

The isolation of whole RNA was performed in accordance to the Chomczynski and Sacchi procedure, followed by reverse transcription to cDNA. The relative transcript levels were measured with the use of real-time polymerase chain reaction with absolute quantitative analysis and standard curves. The results were expressed as relative abundance (RA) of transcripts in a given sample, calculated by dividing the absolute value by million reference gene transcripts (GAPDH). The levels of anti-herpes simplex type I and II IgM, IgG and IgA antibodies in the sera were measured with the use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), while the clinical condition of patients was evaluated with the use of Psoriasis Area and Severity Index (PASI).

It was found that the levels of HERV-E pol, HERV-R pol env and HERV-K env is elevated in PBMC of psoriasis patients. The levels of all analyzed sequences was higher in apparently healthy compared to affected skin. Additionally, it was found that the levels of HERV-E pol and HERV-K env were statistically higher in apparently healthy skin of psoriatic patients compared to healthy skin, while their levels of HERV-R pol env and HERV-W were lowered. The RA of all transcripts, except HERV-K env, was statistically lowered in affected compared to healthy skin. The levels of HERV-E pol and HERV-H (env62) were statistically elevated in the group with mild and moderate psoriasis compared to the groups with severe symptoms. There were no statistically significant differences in the levels of selected HERV in respect to different stages of HSV infection.

Based on the aforementioned results the following conclusions were drawn:

1. The elevated transcript levels of HERV-E pol, HERV-R pol env and HERV-K env in PBMC may be an evidence for their influence in the etiopathogenesis of psoriasis.
2. The elevated transcript levels of HERV-E pol and HERV-K env in the apparently healthy skin, compared to both affected and healthy skin may suggest their possible role in the initiation of the autoimmunologic processes.
3. It seems that the higher HERV-H (env62) transcription in the group of mild and moderate psoriasis compared to the group with severe psoriasis is a response to the ongoing inflammation processes, rather than their cause.
4. It does not seem that the stage of HSV infection influences the transcription levels of the selected HERV.