

existují dvě možná vysvětlení. Sekvence původem z *N. tomentosiformis* mohou být přirozeně náchylnější ke změnám. Obecně častěji dochází ke změnám evolučně mladých sekvencí, jako jsou např. sekvence virového původu a druhově specifické repetitivní sekvence. Je možné, že právě genom *N. tomentosiformis* na rozdíl od *N. sylvestris* patří ke genomům, které se vyvíjejí rychleji, obsahují více evolučně mladých sekvencí a tím pádem jsou méně stabilní. Náchylnost otcovského genomu ke změnám může být také dána vlivem mateřské cytoplazmy, s níž přichází otcovský genom do kontaktu po splynutí rodičovských pohlavních buněk.

Syntetické hybridy aneb hra na stvořitele

V poslední době se věnuje značná pozornost analýze syntetických rostlinných hybridů, tedy hybridů uměle připravených člověkem. Syntetické druhy jsou vhodným modelem pro sledování změn, které nastávají během prvních okamžiků po vzniku alopolyploidie. Hlavní výhodou oproti přirozeným modelům je dostupnost a podrobná znalost výchozích rodičovských druhů, které mimo jiné nejsou přesně známy ani u tabáku. Na rozdíl od přirozených druhů můžeme u syntetických hybridů s jistotou určit, zda ke změnám rodičovských genomů opravdu došlo až během vzniku alopolyploidního jádra. V neposlední řadě mohou mít uměle připravené hybridy hospodářsky výhodné agronomické parametry a představovat tak alternativu ke geneticky modifikovaným rostlinám. Hybridní plodiny jsou totiž většinou sterilní, což výrazně snižuje riziko

jejich rozšíření do volné přírody. Intenzivně zkoumaným syntetickým modelem je skupina obilovin, u kterých dochází k bouřlivým změnám bezprostředně po splynutí rodičovských pohlavních buněk (generace F1). Pro tyto hybridy je charakteristická ztráta genetického materiálu, což vede k již zmíněnému zmenšování hybridních genomů.

Většina pokusů o rekonstrukci tabákového genomu skončila neúspěšně. Příčinou je patrně velká evoluční vzdálenost rodičovských druhů. Evoluční větve vedoucí k současnému druhům *N. sylvestris* a *N. tomentosiformis* se totiž oddělily asi před 10 miliony lety. I v naší laboratoři jsme se pokusili o přípravu vlastního syntetického tabáku a byli jsme úspěšní. Provedli jsme křížení moderních druhů *N. sylvestris* (donor mateřského genomu) a *N. tomentosiformis* (donor otcovského genomu) a získali jsme velké množství klíčivých semen. F1 generace tabákových kříženců i alotetraploidní rostliny, u kterých jsme dosáhli zdvojení chromozomových sad v podmínkách *in vitro* pomocí aplikace inhibitorů tvorby dělicího vřeténka, se celkovým vzrůstem, tvarem i barvou květů podobaly přirozenému tabáku. Všechny analyzované rostliny byly sterilní. Je třeba zdůraznit, že každá ze 150 rostlin, které jsme nechali vykvést, měla několik stovek květů a přesto nevzniklo ani jediné semeno. Sterilitu F1 hybridů vysvětlíme již výše zmíněnými poruchami párování chromozomů v meióze. Neschopnost alotetraploidů tvořit životně gamety však svědčí o tom, že k navození fertility nestačí jen prostá duplikace chromozomových sad. Klíčovou roli zde pravděpodobně hrají procesy „přízpůsobení“ rodičovských genomů, které mohou

zahrnovat rychlé a rozsáhlé genomické změny. Analýza repetitivních sekvencí, kterou jsme již dříve provedli u přirozeného tabáku, jednoznačně potvrdila absenci změn v rodičovských genomech.

Dále jsme sledovali osud repetitivních charakteristik pro rodičovské genomy u linie Th37. Tato linie syntetického tabáku byla připravena v 70. letech 20. stol. křížením *N. sylvestris* (donor mateřského genomu) a *N. tomentosiformis* (donor otcovského genomu) a jde o jednu z mála dostupných tabákových linií. U čtvrté generace této linie jsme k našemu překvapení genomické změny objevili. Otcovský genom byl v porovnání s mateřským genomem náchylný ke změnám, tedy stejně jak je tomu u přirozeného tabáku. Některé změny se shodovaly se změnami pozorovanými u přirozeného tabáku, zatímco jiné byly charakteristické jen pro syntetický tabák. To může souviset s tím, že do mezidruhového křížení vstupovaly moderní druhy *N. sylvestris* a *N. tomentosiformis*, které nejsou zcela shodné s rodičovskými druhy přirozeného tabáku.

Co říci závěrem? Výsledky intenzivního výzkumu na poli přirozených i syntetických rostlinných hybridů napovídají, že polyploidní genomy nejsou statické. Naopak se mohou během svého vývoje chovat jako dynamické a vnitřně nestabilní systémy, které jsou schopné rychle a citlivě reagovat na změny prostředí jak náhodnými, tak i částečně nenáhodnými změnami své struktury. Analýza repetitivních sekvencí u tabáku přispívá jen jedním střípkem do složité a ještě velmi neúplné mozaiky poznatků o chování polyploidů. Nám nezbyvá nic jiného, než se stále pokoušet tuto mozaiku doplňovat.

Viry a roztroušená skleróza

Kateřina Roubalová

Roztroušená skleróza (RS) je chronické zánětlivé onemocnění centrálního nervového systému (CNS), které postihuje převážně lidi v produktivním věku a často vede následkem trvalého postižení pohybového či smyslového aparátu k částečné, nebo úplně invaliditě pacientů. Tato choroba se stává závažným zdravotním problémem, neboť její výskyt se v mnoha zemích stále zvyšuje, postihuje hlavně mladé lidi, výrazně zhoršuje kvalitu jejich života a vyžaduje dlouhodobou a nákladnou zdravotní péči.

RS je rozšířena po celém světě. Průměrný výskyt nemoci je přibližně 7 případů/100 000 obyvatel/rok, průměrná četnost je 120 nemocných/100 000 obyvatel. Má řadu klinických forem lišících se průběhem nemoci i histopatologickým obrazem. Z hlediska průběhu onemocnění se rozlišují dva základní typy RS: primární progresivní RS, která je typická rychlým nástupem a akutním průběhem zánětu, a remitentní

forma, kdy jsou jednotlivé ataky zánětu střídány s obdobími remise, během nichž dochází k ústupu projevů a k částečné obnově poškozených nervů. Klinické nálezy u různých forem RS jsou natolik odlišné, že na ni v současné době neurologové pohlížejí spíše jako na skupinu několika onemocnění, majících možná i různé příčiny. Přestože byla v posledních letech vyvinuta řada nových léčebných přístupů, spolehlivou efektivní léčbu této choroby zatím neznáme.

Co víme o příčinách vzniku roztroušené sklerózy

Příčina vzniku RS pravděpodobně není jediná. Onemocnění se rozvine při spolupůsobení více faktorů, které zatím nejsou jednoznačně definovány. Důležité jsou genetické předpoklady, ale zřejmě i některé faktory vnějšího prostředí. Mohou to být faktory fyzikální (např. teplota, délka slu-

nečního svitu aj.), chemické (např. látky obsažené v potravě) nebo infekce. Význam genetické predispozice ukazují studie výskytu RS u jednovaječných dvojčat: Při onemocnění jednoho ze sourozenců je pravděpodobnost vzniku nemoci u druhého sourozence 30%, tj. 50 000× vyšší než v běžné populaci. Které geny jsou za to odpovědné, se zatím neví, ale předpokládá se, že to budou geny kódující některé z komponent imunitního systému. Byla např. prokázána spojitost RS s určitými typy histokompatibilních antigenů MHC II (proteiny na povrchu buněk, které ovlivňují rozpoznávání cizích bílkovin imunitním systémem).

Vliv faktorů vnějšího prostředí dokumentují epidemiologické studie. Ukazují např., že výskyt RS není ve všech oblastech světa stejný: vysoký výskyt RS je v severských státech (Skandinávie, Kanada), kdežto v jižních zemích (Afrika, Orient) je naopak tato nemoc vzácná. Výskyt RS u obyvatel, kteří se přestěhovali z oblastí vysokého výskytu do oblastí nízkého výskytu je zpočátku vyšší než u domorodců, během následujících generací se však snižuje. U lidí, kteří imigrovali v dospělosti, je vyšší než u těch, kteří se přestěhovali v dětství.

O možném úloze infekčních agens svědčí hromadný pseudoepidemický výskyt RS v některých lokalitách — např. na Islandu, Shetlandských či Faerských ostrovech. Je popsán též skupinový výskyt RS v rodinách, a to i u nepřímých příbuzných, např. u obou manželů.

Úloha imunitního systému v rozvoji onemocnění

Roztroušená skleróza patří mezi tzv. autoimunitní choroby, tj. onemocnění, v jejichž patogenезi má zásadní význam autoimunitní reakce organismu proti vlastním bílkovinám nervového systému. Tato reakce způsobuje vznik ložisek chronického zánětu v CNS, vedoucího k destrukci myelinové pochvy nervových výběžků (demyelinizaci axonů), jež je příčinou poruchy funkce a postupného zániku postižených neuronů. Dominantní složkou této reakce jsou autoreaktivní cytotoxické T lymfocyty, které v počáteční fázi onemocnění reagují zejména se zásaditým myelinovým proteinem, jenž je dominantní složkou myelinové pochvy. V průběhu progresu onemocnění se jejich repertoár rozšiřuje o další vlastní bílkoviny (autoantigeny) přítomné nejen na neuronech, ale i na podpůrných buňkách nervové tkáně — oligodendrocytech, astrocytech a mikroglíách. Reakce T lymfocytů s autoantigenem spouští kaskádu kroků vedoucích k vytvoření zánětlivého ložiska (plaku). Velkou roli zde hrají cytokiny — bílkoviny produkované hlavně buňkami imunitního systému, které mají regulační funkci při rozvoji imunitní reakce. Některé z nich vyvolávají specifické změny v buňkách stěn mozkových kapilár, jež mají za následek zvýšení propustnosti cév pro leukocyty a krevní bílkoviny. Dochází k porušení tzv. hematoencefalické bariéry, tj. fyziologického mechanismu, který normálně omezuje dostupnost nervového systému pro prvky imunitního systému. Cytokiny dále aktivují astrocyty a mikroglie, které získávají schopnost předkládat vlastní bílkoviny nervového systému dalším imunokompetentním buňkám, např. B lymfocytům. Ty pak produkují autoreaktivní protilátky, které se za přispění komplementu účastní destrukce nervové tkáně. Prozánětlivé cytokiny (např. tumor nekrosis faktor α , interleukin γ a interleukin 6), které jsou produkovány hlavně aktivovanými makrofágy, mají toxický účinek na buňky nervového systému, podporují vznik nebezpečných kyslíkových radikálů a vyvolávají apoptózu (programovanou smrt buněk).

Jakou úlohu zde mohou hrát viry

Viry mohou hrát významnou roli jak ve spuštění autoimunitní reakce, tak v jejím dalším rozvoji. Je známo, že nezralé T lymfocyty, potenciálně schopné reagovat proti vlastním bílkovinám nervového systému, se v organismu vyskytují i za normálních podmínek, nejsou však schopny vyvolat autoimunitní reakci. Naopak, jejich setkání s autoantigenem, pokud k němu vůbec dojde, vede ke ztrátě reaktivity nebo k apoptóze. K tomu, aby T lymfocyty mohly po kontaktu s vlastní bílkovinou vyvolat autoimunitní reakci vedoucí k onemocnění, je nutno, aby se tyto buňky aktivovaly, začaly se množit a diferencovat na buňky efektorové, schopné ničit jiné buňky obsahující zmíněnou bílkovinu — tj. aby daly vznik autoreaktivnímu buněčnému klonu. To se může stát, je-li jim autoantigen předložen spolu s dalšími aktivujícími signály (vzájemné interakce dalších povrchových molekul nebo působení cytokinů). Ty poskytují hlavně tzv. pomocné (helper) T lymfocyty. Za normálního fyziologického stavu tato situace nenastává, neboť díky existenci již zmíněné hematoencefalické bariéry je průnik buněk imunitního systému do nervové tkáně omezený. Dojde-li však k porušení této bariéry, např. v důsledku virové infekce probíhající v nervové tkáni nebo v endotelu mozkových kapilár, reakce může být spuštěna. Jedním z mechanismů, které se v této fázi mohou uplatňovat, je tzv. molekulární mimikry — jev, kdy bílkoviny některých infekčních agens svou strukturou napodobují vlastní bílkoviny hostitele. Přirozená imunitní reakce hostitele proti mikroorganismu nebo viru pak vede k aktivaci autoreaktivních klonů reagujících proti vlastním bílkovinám. (Bílkoviny strukturně podobné myelinu byly identifikovány např. u viru spalniček nebo viru herpes

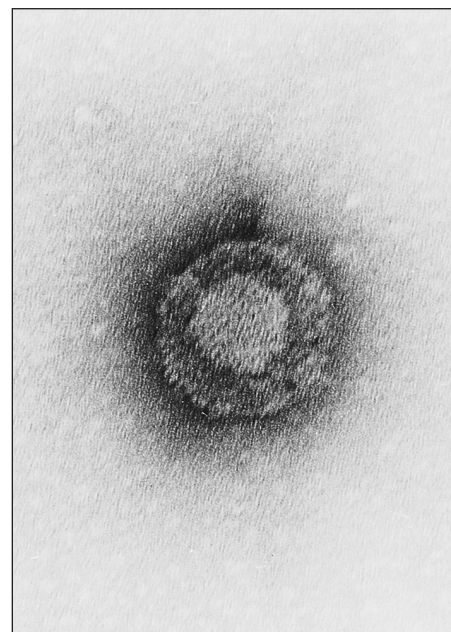
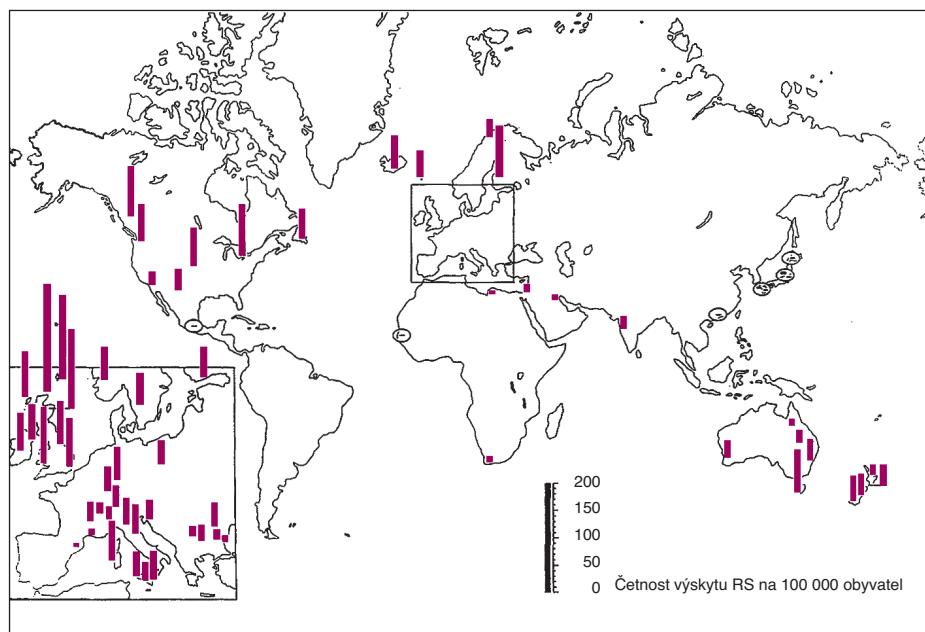
Četnost výskytu (prevalence) roztroušené sklerózy v různých částech světa (vlevo). Data získána z epidemiologických přehledů z r. 1991. Gal C. R. a Martyn C.: Migrant studies in multiple sclerosis. Progr. Neurol. 1995, 47: 425–448, převzato a upraveno ♦ Infekční částice herpetického viru z mozkomíšního moku (vpravo). Zvětšení 100 000×. Foto J. Schramlová

simplex, původce oparu). K aktivaci a šíření autoreaktivních buněk přispívá i prostředí zánětu v místě infekce, bohaté na řadu nespecifických aktivujících podnětů. Některé viry napadají přímo buňky imunitního systému, ovlivňují jejich funkci, a tím mohou porušit normální regulační mechanismy imunitní reakce. Progresivní fáze RS, spojená s destrukcí neuronů, může souviset i s degradací nebo dysfunkcí oligodendrocytů (podpůrných nervových buněk, které jsou hlavními producenty myelinu) buď v důsledku autoimunitní reakce, nebo přímé infekce viry.

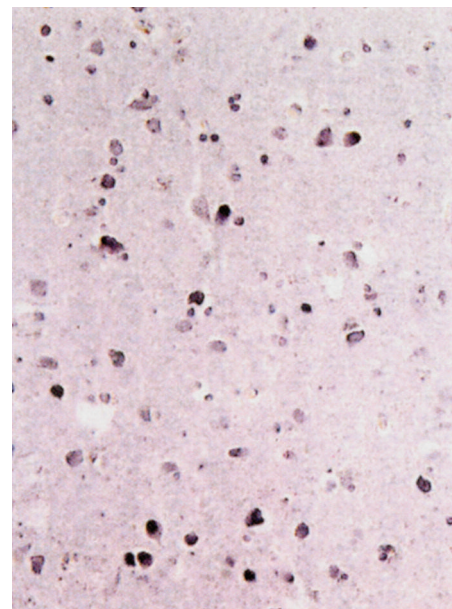
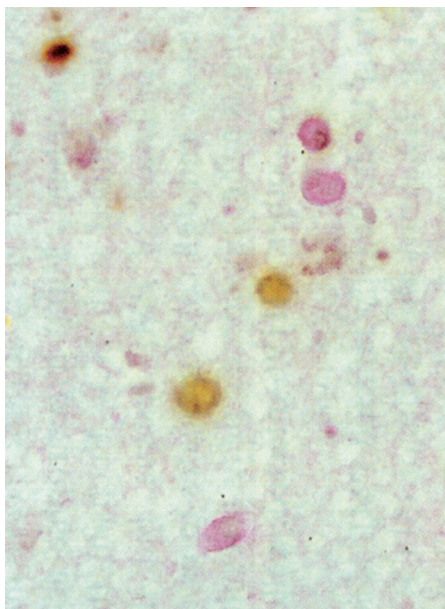
Máme důkazy pro teorii virového původu roztroušené sklerózy?

Nepřímých důkazů svědčících pro infekční hypotézu RS existuje mnoho. Závažným argumentem je skutečnost, že řada případů začíná prodělanou infekcí, nejčastěji virovou. Virozy také prokazatelně zhoršují průběh onemocnění a mohou vyvolávat jeho další ataky. Dalším důležitým argumentem je skutečnost, že mnohé viry jsou schopny u lidí vyvolat záněty CNS spojené s destrukcí myelinového obalu neuronů, v mnoha znacích velmi podobné RS: např. polyomavirus JC, celkem neškodný virus běžně se vyskytující v lymfatických uzlinách zdravých lidí, může u oslabených jedinců (např. pacientů s AIDS) vyvolat onemocnění zvané progresivní multifokální leukoencefalopatie, připomínající primární progresivní RS. Za podobných podmínek může chronický i akutní zánět mozku vyvolat i jiný běžný virus — lidský herpetický virus 6 (HHV6, viz dále). Rovněž virus spalniček může vyvolat chronický degenerativní zánět mozku provázený projevy autoimunitní reakce. Významné důkazy přinesly i některé experimentální zvířecí modely RS: Autoimunitní zánět CNS vyvolává visna virus u ovcí, canine distemper virus u psů, Semliki Forest virus a Theilerův virus u myší. U pacientů s RS se nalézá, v porovnání s normální populací, zvýšená hladina protilátek pro řadu virů, např. proti viru Epsteinova a Barrové, viru herpes simplex typu 2, lidskému cytomegaloviru, viru spalniček.

Protilátky proti některým virům napadajícím nervovou tkáň (např. viru spalniček,



Detekce DNA lidského herpesviru 6 (HHV6) v mozku pacientů s chronickou formou roztroušené sklerózy pomocí metody PCR in situ. DNA (tmavé tečky) je přítomna v oligodendrocytech, neuronech i v satelitních buňkách v okolí zánětlivých ložisek — plaků, vlevo nahoře. Převzato z B. M. Blumberga kol., J. Clin. Virology 2000, 16 ♦ Průkaz antigenů HHV6 (žlutohnědé struktury) v buňkách plaku pomocí imunohistochemického barvení, vpravo. Převzato z B. M. Blumberga kol., J. Clin. Virology 2000, 16 ♦ Zobrazení mozku pomocí magnetické rezonance. Dole vlevo mozek zdravého jedince, vpravo snímek mozku pacienta s projevy demyelinizačního onemocnění. Bílé skvrny v obou mozkových hemisférách jsou tzv. hyperintenzní ložiska odpovídající vícečetnému ložiskovému postižení při roztroušené skleróze mozkomíšni. Vyšetření provedla Klinika zobrazovacích metod 2. LF UK a FN Motol. Snímky z archivu M. Bojara



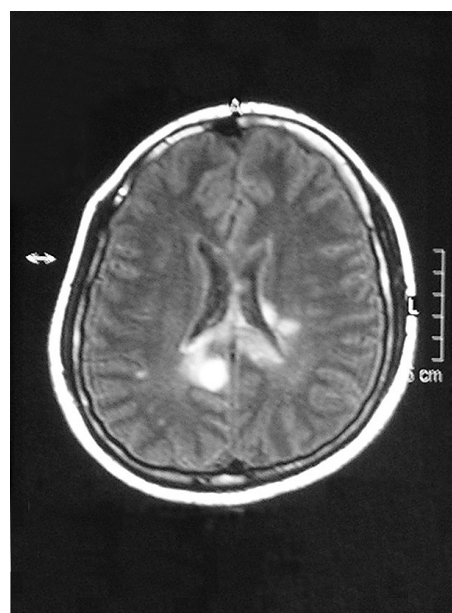
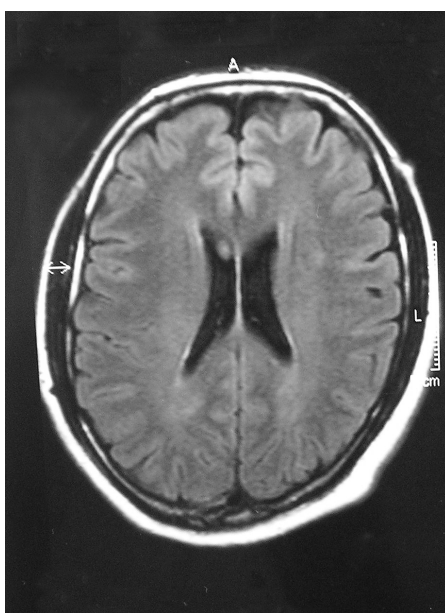
zarděnek nebo planých neštovic) se tvoří přímo v CNS a lze je prokázat v mozkomíšním moku již v počátečních fázích onemocnění. Vesměs však jde o viry, které běžně kolují v naší populaci, nebo se proti nim plošně očkuje. Nález zvýšených hladin protilátek nelze jednoznačně interpretovat jako důkaz příčinné souvislosti infekce s onemocněním. Může jít o vedlejší jev, který s vlastním onemocněním přímo nesouvisí a je spojený s celkovou aktivací imunitního systému u pacientů s chronickým zánětem, či o důsledek druhotné vyšší vnímavosti k infekcím (pacienti jsou často dlouhodobě léčeni léky potlačujícími imunitu).

Závažnější jsou nálezy z tzv. prospektivních studií, které prokazují, že znaky infekce skutečně předcházejí vzniku RS, těch však zatím není mnoho (viz dále). Výsledky studií, které se snažily prokázat virové antigeny přímo ve vzorcích postižené nervové tkáně, nejsou jednoznačné a jejich interpretace je navíc komplikována skutečností, že většina inkriminovaných virů běžně dlouhodobě přetrvává v CNS i u zdravých lidí. Tyto práce jsou často zatíženy technickými problémy, neboť se provádějí na vzorcích ze zemřelých pacientů, v nichž, jak je známo, velmi rychle probíhají autolytické procesy, které mohou virové bílkoviny nebo nukleové kyseliny ničit.

Nejvíce podezřelé jsou herpetické viry

Nejvíce indicií svědčících pro úlohu virů v patogenezi RS zatím máme pro herpetické viry (název je odvozen z latinského herpes = plíživý, tj. viry vyvolávající plíživé nebo skryté, latentní infekce), zejména pro virus Epstein a Barrové (EBV) a lidský herpetický virus 6 (HHV6).

Pro skupinu herpetických virů je typické, že po odeznění primární infekce přetrvávají v hostitelském organismu ve stavu latence po celý jeho další život. Za podmínek oslabené imunity se mohou reaktivovat, znovu přechodně začít množit a tak vyvolávat opakované (rekurentní) infekce. EBV vyvolává latentní infekci B lymfocytů v periferní krvi a lymfatické tkáni. Primární infekce EBV u starších dětí a dospělých někdy probíhá jako horečnatý zánět lymfatických uzlin, infekční mononukleóza. Epidemiologické studie dokázaly, že lidé, kteří prodělali infekční mononukleózu, mají až



4x vyšší riziko onemocnění RS. Studie provedená v 90. letech v USA ukázala, že ženy, které později onemocněly RS, měly již několik let před začátkem onemocnění významně zvýšené hladiny protilátek proti EBV. Celková chronická aktivace imunitního systému spojená se sníženou schopností organismu kontrolovat latentní infekci EBV, může přispět ke vzniku nebo rozvoji autoimunitního onemocnění. Význam může mít i skutečnost, že EBV infikuje B lymfocyty, buňky, které se v organismu podílejí na zpracování bílkovin (antigenů) při jejich nabídnutí imunitnímu systému, a výrazně ovlivňuje jejich funkci. Experimentálně bylo dokázáno, že B lymfocyty infikované EBV, jež dlouhodobě přetrvávají v periferní krvi hostitele, vystavují imunitnímu systému β -krystalin — stresový protein, který je jedním z cílů autoimunitní reakce při RS.

Lidský herpetický virus HHV6 latentně infikuje pomocné (helper) T lymfocyty, ale i řadu buněk nervového systému: astrocyty, mikroglie a především oligodendrocyty, které vyživují neurony a syntetizují myelin. Primární infekce HHV6 může u malých dětí probíhat jako horečnaté onemocnění, provázené vyrážkou a často i mírnými příznaky zánětu CNS (křeče, meningitidy). Závažněj-

ší neurologické komplikace, které může vyvolat u pacientů s oslabenou imunitou, jsme již zmínili. U pacientů s RS jsou častěji naleznány známky reaktive HHV6, a to nejen vysoké hladiny protilátek, ale i zvýšené množství viru v periferní krvi. Virové bílkoviny signalizující aktivní infekci byly opakovaně naleznány v zánětlivých placích pacientů s RS. Tyto bílkoviny byly prokázány zejména v oligodendrocytech v okrajové zóně plaků a naopak nebyly přítomny v jiných, zánětem nepostížených částech mozku. Studie prokazující příčinnou souvislost HHV6 s RS však zatím chybějí, a tak nelze vyloučit, že virus, který normálně přetrvává v mozku, se začne množit až v místech probíhajícího zánětu, protože toto prostředí je pro něj výhodné. Přesto však tím, že ničí infikované oligodendrocyty, může hrát významnou roli při demyelinizaci nervových výběžků.

Přestože se hromadí poznatky o spojitosti některých infekcí s autoimunitními chorobami u lidí, stále ještě nelze vyloučit, že jde pouze o koincidenci dvou jevů, majících příčinu v poruše regulace imunitního systému. Přímé důkazy o příčinném vztahu virových infekcí k RS možná získáme, až budou dostupné účinné metody prevence těchto infekcí.