BLT-humanized C57BL/6 Rag2-/-γc-/-CD47-/- mice are resistant to GVHD and develop B- and T-cell immunity to HIV infection

Lavender KJ, Pang WW, Messer RJ et al, Blood 2013, 122, 4013-4018

Úvod:

Výzkum HIV byl dosud výrazně limitován úzkým spektrem tropismu tohoto viru. Virus opičí imunodeficience (SIV), který se dosud nejvíce k tomuto účelu využíval, má celou řadu limitací – cena, dostupnost, etika a rovněž genomová odlišnost představuje značné překážky. Proto je vedeno úsilí o vytvoření co nejlepšího humanizovaného myšího modelu. Nejvhodnější humanizované myší modely současnosti jsou pravděpodobně tzv. TKO-BLT myši (*triple-knockout, bone marrow, liver, thymus* humanizovaná myš). Takto modifikované myši jsou schopny lidské trilineární hematopoézy a rovněž produkce HLA specifických T-lymfocytů.

Dosud se nejvíce používaly NOD/SCID myši *(non-obese diabetic/severe combined immunodeficient*) – ty však nedisponují dostatkem funčních B a T-lymfocytů a chybí jim funkční komplement. Výhodou Rag2- (*recombination activating gene*)/-γc/- myší – tzv . DKO (= *double knock-out*) by byla možnost studia řady transgenetických změn a inaktivací skupin genů u relativně rezistentních myší s funkčním komplementem. Rag2-/-γc-/- však neumožňoval transplantaci lidského hematopoetického systému – na základě předchozích studií se jako klíčová překážka jevila exprese signálního rozpoznávacího proteinu alfa (SIRPalfa), který nedokázal rozpoznat lidský CD47 a tedy vedl k fagocytóze lidských hematopoetických buněk. Tento protein NOD myši, na rozdíl od C57BL/6 myší, neprodukují. V této studii byly proto vytvořeny myši s inaktivovaným CD47 genem – tyto myši nedokáží rozpoznat exprimované CD47 znaky a tím bylo zabráněno fagocytóze lidských buněk. C57BL/6 Rag2-/-γc-/-CD47-/-, tedy TKO – tripple knock-out myši jsou schopny dlouhodobé plnohodnotné lidské hematopoézy prakticky bez známek GVHD a mohly by tedy být vhodnými modely pro studium řady lidských patogenů.

Materiály a metodika :

Po získání vhodné populace TKO myší, byly tyto drženy v přísných izolačních podmínkách, aby nemohlo dojít k setkání s patogenem. Šesti-10týdenní myši byly BLT humanizovány pomocí 17-22 týdenních gestačních lidských jater a thymu, které byly implantovány pod ledvinné pouzdro myší. Následně bylo provedeno celotělové ozáření (5-7,5 Gy) a intravenózně injektováno 1-2x 10^6 lidských CD34+ buněk. HIV infekce byla přenesena rektální sliznicí, kdy bylo aplikováno cca 1x10^5 TCIU (*tissue culture infectious units*) denně, po dobu 4 dní. Infekční nálož byla hodnocena pomocí anti-p24 ELISA testu.

Výsledky:

Rekonstituce TKO-BLT myši: k rozhodnutí, zda inaktivace CD47 genu povede k imunologické toleranci a umožní rekonstituci lidského hematopetického systému u imunokompromitované myši, byla porovnána rekonstituce u TKO a DKO myší. Oba typy byly BLT humanizovány a tvorba lidských hematopoetických buněk byla posuzována pomocí flow cytometrického hodnocení exprese lidského CD45 znaku v odstupu 12-21 týdnů. U TKO myší byla exprese 1x10^6/mL krve již po 12 týdnech a po celou dobu bylo v průměru více než 80% buněk v periferní krvi lidského původu. Naproti tomu u DKO nedosahovala exprese ani 0,3 a lidské buňky v průměru tvořily méně než 25%. U TKO rovněž došlo během 12 týdnů k poměrnému rozdělení T a B lymfocytů odpovídajícímu lidským parametrům. Při analýze hematopoetických orgánů bylo jasné, že pouze u TKO myší došlo k vytvoření humanizovaného mikroprostředí umožňující dostatečnou hematopoézu a správné vyzrávání humanizovaných buněk.

Slizniční přenos HIV: ke sledování HIV viru je důležitá stimulace slizničního imunitního systému, což TKO myši rovněž umožňují – histologicky byla potvrzena přítomnost HLA znaků I.třídy a lidských CD34+ ve sliznici tenkého i tlustého střeva, tyto byly u DKO přítomny jen velmi ojediněle. Vzhledem k tomu, že HIV je nejčastěji přeneseno sliznicemi, nebylo překvapením, že u kontrolních 8 DKO myší nedošlo sliznicí k infekci HIV, zatímco ze 48 TKO myší 26 (54%) bylo infikováno. U inifikovaných myší docházelo ke stejným změnu poměru CD4+ vs CD8+ jako u lidí.

GvHD u TKO myší: na rozdíl od NOD/SCIDγc-/-myší, kdy po 29.týdnu od transplantace zemřelo více než třetina studovaných myší, žádná ze sledovaných TKO myší nejevila známky GvHD ve 20. ani 29. týdnu sledování.

Imunitní systém u TKO-BLT myší: Naivní TKO-BLT myši disponují funkční komplement fixační aktivitou, tvorbou virově specifických IgG a IgM protilátek i specifickou T-buněčnou odpovědí.

Závěr:

S ohledem na uveřejněné výsledky se TKO-BLT myší model zdá být vhodný nejen pro studium HIV, ale např. i pro testování patogeneze, imunitních odpovědí, terapeutických a vakcinačních metod proti různým lidských patogenům.

Zpracovala : MUDr.Markéta Hadrabová, IHOK