

UNIVERZITETNI DOKTORSKI ŠTUDIJ BIOMEDICINA

SEMINAR pri predmetu Temeljna medicinska mikrobiologija

Lea Hošnjak, univ. dipl. mikr.

**Živalski modeli, ki se uporabljajo pri preučevanju okužb s človeškim
virusom imunske pomanjkljivosti**

MODERATOR SEMINARJA

Prof. dr. Srečko Koren, dr. med., spec. klin. mikrobiol.

LJUBLJANA, 12.3.2012

Izveček

Pandemija AIDSa predstavlja edinstvene izzive tako na znanstvenem področju kot tudi na področju javnega zdravja. Kljub napredkom v razvoju učinkovite antiretrovirusne terapije, pojav odpornosti na zdravila zahteva aktivno spremljanje trenutno dostopnih terapevtikov ter razvoj novih antiretrovirusnih zdravil. Ne glede na že 30 let vloženih v raziskave potencialnih cepiv, še vedno nimamo dovolj osnovnega znanja za razvoj varnih in učinkovitih cepiv proti HIV-1. Uporaba živalskih modelov za raziskave HIV/AIDS omogoča bolj invazivne raziskave poteka bolezni in predklinično testiranje zdravil in cepiv. Napredek v razvoju humaniziranih mišjih modelov, nova spoznanja na področju imunogenetike pri primatih in na področju rekombinantnih virusov so omogočili povečanje števila in izboljšanje dostopnih mišjih in opičjih modelov. Razumevanje prednosti in pomanjkljivosti vsakega izmed teh modelov je ključno za načrtovanje živalskih študij za razvoj cepiv in antiretrovirusne terapije za preprečevanje in zdravljenje okužbe s HIV-1.

Kazalo

Izvleček	2
Kazalo.....	3
1 Uvod.....	4
2 Majhne živali kot modeli.....	5
2.1 Scid- <i>hu-Thy/Liv</i> miške	6
2.2 Scid- <i>hu-PBL</i> miške	6
2.3 NOD scid in NOD scid $\text{Il2rg}^{-/-}$ miške	7
2.4 BLT miške.....	7
2.5 $\text{Rag2}^{-/-}\text{Il2rg}^{-/-}$ miške	8
3 Primati kot modeli.....	8
3.1 Naravni gostitelji SIV.....	9
3.2 Ne-naravni gostitelji SIV	9
3.2.1 Rhesus makaki.....	10
3.2.2 Pig-tailed makaki.....	11
3.2.3 <i>Cynomolgus</i> makaki.....	11
3.2.4 SIV in izzivi rekombinantnih sevov SHIV	12
3.2.5 Elitni kontrolerji	14
4 Zaključek	15
5 Literatura	17

1 Uvod

Človeški virus imunske pomanjkljivosti (angl. *Human immunodeficiency virus*; HIV), ki ga uvrščamo v družino *Retroviridae* in rod *Lentivirus*, povzroča sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti ali AIDS (angl. *acquired immunodeficiency syndrome*), ki so ga prvič opisali v ZDA leta 1981. HIV je med človeškimi virusi najbolj genetsko raznolik. Poznamo dva osnovna tipa virusa: HIV-1 in HIV-2, ki se pomembno morfološko in klinično razlikujeta, kljub temu da imata eno polovico genoma popolnoma enako (Poljak in sod., 2011). HIV-1, ki je odgovoren za svetovno pandemijo AIDS-a in HIV-2, ki povzroča AIDS v zahodni Afriki, se primarno prenašata spolno in se pomnožujeta v CD4+ celicah in makrofagih. Kadar okužbe ne zdravimo, pride do izčrpanja CD4+ celic, zmanjšane sposobnosti imunskega odziva in posledično do pojava smrtonosnih oportunističnih okužb. Ker je v zadnjih 30 letih zaradi okužbe s HIV-1 umrlo več kot 30 milijonov ljudi, je v razvoj učinkovitih antiretrovirusnih zdravil, preventivnih učinkovin in cepiv za preprečevanje in zdravljenje okužbe že bilo vloženo veliko truda in sredstev. Kljub zelo pomembnim napredkom na tem področju, znanstvenikom še vedno ni uspelo razviti učinkovitega cepiva ali uspešno odstraniti virusa iz telesa okuženih posameznikov, razen v primerih, ko so bolnikom z rakom presadili kostni mozeg z mutacijo CCR5 (Hütter in Ganepola, 2011 ; Hatzioannou in Evans, 2012).

Ker je potek okužbe s HIV-1 kompleksen proces uporaba celičnih ali tkivnih kultur za raziskave patogeneze tega virusa ni možna (Veazey in sod., 2012). Ena glavnih omejitev pri odkrivanju zdravil in cepiv proti HIV-1 je pomanjkanje živalskih modelov z lastnostmi, ki so ključne za posnemanje poteka okužbe pri ljudeh (García-Lerma in Heneine, 2012; Shapiro, 2013). HIV-1 je neposredni naslednik virusa SIVcpz, s katerim se najpogosteje okužijo šimpanzi v Centralni Afriki. Kljub temu, da SIVcpz lahko povzroča bolezen pri šimpanzih v naravnem okolju, se pri živalih v ujetništvu bolezen le redko razvije. Šimpanzi so neprimeren model za preučevanje AIDS-a tudi zaradi visokih stroškov vzdrževanja in njihovega statusa ogrožene vrste (Hatzioannou in Evans, 2012).

Pri iskanju modelov za preučevanje okužbe s HIV-1 je potrebno upoštevati, da mora model vsebovati celične beljakovine, ki omogočajo podvojevanje virusa. Med te beljakovine prištevamo predvsem receptorje in koreceptorje, ki sodelujejo pri vstopu virusa v celico (CD4 in 5. kemokinski receptor (CCR5) ali 4. kemokinski receptor (CXCR4)), transkripcijske dejavnike (ciklin T1), dejavnike, ki omogočajo prenos molekul iz jedra celice (CRM1 oz. EXP1) in beljakovine ESCRT (angl. *endosomal sorting complex required for transport*) poti, ki sodelujejo pri nastanku novih virusnih delcev. V zadnji letih so odkrili tudi celične

dejavnike, ki preprečujejo posamezne korake podvojevanja HIV-1 (npr. TRIM5). TRIM5 α vstopajoče virusne delce usmerja v proteasome, še preden se v celici sestavi novi virus (Poljak in sod., 2011). S procesom prilagoditve in uporabo kofaktojev, se HIV-1 pri ljudeh lahko izogne tem omejujočim dejavnikom in povzroči bolezen, kar pa ne velja za druge vrste, pri katerih le redko pride do podvojevanja virusa in povzročanja bolezni (Hatzioannou in Evans, 2012).

Za preučevanje okužbe s HIV-1 *in vivo* so bili razviti številni živalski modeli, ki se uporabljajo predvsem za predklinične študije razvoja cepiv in antiretrovirusne terapije. Majhne živali (npr. miške) so primerne za genetske manipulacije, zato so razvili imunsko oslABLJENE miške, ki so jim vstavili celice ali tkiva človeškega imunskega sistema in na ta način omogočili pomnoževanje virusa. Raziskave na velikih živalih (npr. primati) so osredotočene na uporabo opičjega virusa imunske pomanjkljivosti (angl. *simian immunodeficiency virus*; SIV) ali SHIV (angl. *simian-human immunodeficiency virus recombinants*). Izbira modela za preučevanje okužbe s HIV-1 je odvisna od namena raziskave (Hatzioannou in Evans, 2012).

2 Majhne živali kot modeli

Začetni poskusi okužbe majhnih živali, kot so miške, podgane in kunci, s HIV-1 so bili neuspešni (Morrow in sod., 1987). Kljub temu, da tudi mačke niso dovzetne za okužbo s HIV-1, okužba s FIV (angl. *feline immunodeficiency virus*) pri domačih mačkah lahko služi kot nadomestni model za HIV-1 okužbo pri ljudeh. Ta model sicer zaradi številnih pomanjkljivosti ni pogosto uporabljen. Z napredkom tehnologij, ki omogočajo transgene spremembe živali, je bil omogočen razvoj mišk, podgan in kuncev z izraženimi beljakovinami, ki so nujne za podvojevanje HIV-1 (predvsem CD4, CCR5 in CXCR4). Kljub temu noben od teh modelov ne omogoča preučevanja robustega virusnega podvojevanja ali razvoja bolezni. Celice teh živali ne izražajo nujno potrebnih kofaktorjev za podvojevanje virusa in lahko izražajo tudi beljakovine, ki preprečujejo okužbo s HIV-1. Majhne živali, ki so najboljši model za preučevanje HIV/AIDS-a so humanizirane miške- genetsko imunsko oslABLJENE miške, ki so jim vstavili človeška tkiva in tako vzpostavili človeški imunski sistem (Gorantla in sod., 2012; Hatzioannou in Evans, 2012; Pietzsch in sod., 2012).

Najpogostejši mišji modeli za raziskave HIV/AIDS:

2.1 Scid-*hu-Thy/Liv* miške

Do danes je bilo razvitih veliko humaniziranih mišk, pri katerih so genetsko povzročili hudo kombinirano imunsko pomanjkljivost (angl. *severe combined immunodeficiency*; scid). Te miške imajo mutacijo v genu, ki nosi zapis za katalitično podenoto od DNA-odvisne proteinske kinaze, kar se kaže z odsotnostjo funkcionalnih B in T celic. Scid-*hu-Thy/Liv* miške dobijo tako, da miškam presadijo priželjc in jetrne celice človeškega zarodka. Nastane združen organ, ki lahko proizvaja človeške krvotvorne (CD34+) progenitorske matične celice in zrele človeške limfocite. Te miške lahko okužijo s HIV-1 z neposrednim vbrizganjem virusa v vsadke človeškega izvora, kar vodi v padec CD4+ celic in povišanje virusnega bremena v človeškem tkivu. S pomočjo teh modelov lahko preučujejo mehanizme zmanjšanja števila CD4+ celic in učinkovitost antiretrovirusnih zdravil za zdravljenje akutne okužbe s HIV-1. Pomanjkljivost tega modela je, da nekatere starejše miške začnejo proizvajati svoje B in T celice ter ohranjanje prirojene imunosti (NK celice), kar privede do zavrnitve človeških organov. Ta model ni uporaben za študije sluzničnega prenosa HIV-1 (McCune in sod., 1988; Hatzioannou in Evans, 2012).

2.2 Scid-*hu-PBL* miške

Pri teh miškah se limfociti iz človeške periferne krvi, vbrizgani v trebušno votlino, prenesejo v limfne žleže, vranico, kostni mozeg in genitalno sluznico. Te miške izločajo človeška protitelesa in se na cepljenje odzovejo s človeškim imunskim odzivom. Intraperitonealnemu vbrizgnju HIV-1 ali okuženih celic sledi zmanjšanje števila CD4+ celic, virus pa je zaznaven tudi v tkivih z okuženimi celicami. Ta model je uporaben za preučevanje učinkov pasivnega cepljenja z monoklonskimi protitelesi specifičnimi za glikoprotein, ki je prisoten na ovojnici virusa (*Env*), testiranje cepiv, ki temeljijo na *Env*, in ugotavljanje zaščitne vloge dendritičnih celic, ki vsebujejo neaktiven HIV-1. Tudi ta model ni uporaben za študije sluzničnega prenosa HIV-1 (Mosier in sod., 1988; Hatzioannou in Evans, 2012).

2.3 NOD scid in NOD scid *Il2rg*^{-/-} miške

Da bi izboljšali učinkovitost presaditve človeških krvotvornih tkiv in organov so scid miške križali z miškami z dodatnimi mutacijami. NOD *scid* miške nastanejo s križanjem *scid* mišk z diabetičnimi miškami z normalno telesno težo (angl. *non-obese diabetic mice*; NOD), ki imajo številne genetske napake, ki se izražajo z nizko aktivnostjo NK celic in zmanjšano aktivacijo komplementa. Pomanjkljivost teh mišk je njihova kratka življenjska doba, saj pogosto dobijo limfom priželjca. NOD *scid* miške lahko križajo tudi z *Il2rg*^{-/-} miškami z mutacijo na receptorju interlevkina-2, ki je odgovoren za rast in razvoj imunskih celic. Obstajata dva tipa NOD scid *Il2rg* mišk^{-/-}: NOG miške in NOG *scid* gamma (NGS) miške, ki so popolnoma brez B in T celic, imajo izjemno nizko aktivnosti NK celic in pri katerih je presajanje človeških organov najbolj učinkovito ter imajo daljšo življenjsko dobo. NOD *scid*, NOG in NGS miškam z injekcijami v različna mesta vbrizgajo CD34⁺ celice, ki jih pridobijo iz popkovne krvi, jeter zarodka ali krvi odraslih. Te miške proizvajajo človeške imunske celice, ki se razširijo na številne lokacije: v periferno kri, jetra, pljuča, vagino in rektum. Ob okužbi s HIV-1 ali SHIV, lahko NOD miške razvijejo visoko viremijo in HIV-specifična protitelesa. NOG in NGS miške se uporabljajo za preučevanje številnih pristopov genske terapije za preprečevanje podvojevanja HIV-1, NGS miške pa še dodatno za preučevanje neuropatogeneze, ki je povzročena s HIV-1 (Ito in sod., 2002; Schultz in sod., 2005; Hatzioannou in Evans, 2012).

2.4 BLT miške

Kadar NOG *scid* in NGS miškam vsadijo priželjc človeškega zarodka in jetrne celice, jim uničijo imunski sistem in presadijo kostni mozeg, dobijo *BLT* (angl. *bone marrow-liver-thymus*) miške. Prednost teh mišk je, da se človeška protitelesa razvijejo v priželjcu in tako posnemajo nastanek T celic pri ljudeh. Intraperitonealno vbrizganje HIV-1 povzroči visoko viremijo, zmanjšanje števila CD4⁺ celic in pojav humoralnega in celičnega imunskega odziva. Druga prednost tega modela je možnost sluznične okužbe. *BLT* miške predstavljajo uporaben model za preučevanje antiretrovirusne terapije in so bile uporabljene za dokaz, da lahko antiretrovirusno terapijo učinkovito apliciramo tako intravenozno kot topično. *BLT* miške lahko okužijo preko sluznice in jih lahko uporabijo za študije sheme antiretrovirusne terapije (Mekus in sod., 2006).

2.5 Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-} miške

Rag2^{-/-} miškam manjkajo zrele B in T celice. Mutacije pri teh miškah ne povzročajo tumorjev. Križanje Rag2^{-/-} in Il2rg^{-/-} mišk privede do mišk, ki nimajo funkcionalnih limfocitov in NK celic. Vnosu človeških CD34⁺ celic sledi nastanek človeških imunskih celic, ki se razširijo predvsem v periferno kri, jetra, vranico, kostni mozeg, vagino in limfoidno tkivo črevesja. Temu modelu in modelu NOG in NGS mišk je skupno, da se T celice razvijejo v mišjem priželjcu, ne pa v presajenem človeškem. Intraperitonealnemu vnosu CD34⁺ celic v te miške sledi pojav viremije, ki lahko vztraja do 1 leta, prenos virusa do številnih organov in zmanjšanje števila CD4⁺ celic. Te modeli so uporabni za študije učinkovitosti antiretrovirusne terapije pri padajoči viremiji, za testiranje novih terapevtskih pristopov in za preučevanje učinkov virusnega podvojevanja na imunski sistem gostitelja (Goldman in sod., 1998; Hatzioannou in Evans, 2012).

Človeški krvotvorni sistem je kompleksen. Čeprav izvira iz pluripotentnih krvotvornih celic kostnega mozga, številne interakcije v telesu omogočajo diferenciacijo in maturacijo krvotvornih celic, kar se kaže v njihovi raznolikosti. Človeški imunski sistem lahko le delno prikažemo v različnih humaniziranih mišjih modelih, kar ima številne pomanjkljivosti. Interakcije med vstavljenimi človeškimi celicami in mišjimi celicami (komponente mišjega imunskega sistema in drugih tipi celic) ne pokažejo natančne slike razvoja limfoidnega tkiva pri ljudeh. V številnih laboratorijih poteka razvoj *BLT* mišk, katere bi lahko uporabljali tudi za tovrstne raziskave (Hatzioannou in Evans, 2012).

Humanizirane miške živijo v umetno sterilnem okolju in ne potrebujejo imunskega sistema, da bi preživele, zato niso uporabne za prikaz osnovnega principa HIV-1 patogeneze. Prav tako se ne morejo razmnoževati, zato jih morajo *de novo* pripraviti za vsak poskus, kar pa je tehnično zahtevno in drago (Hatzioannou in Evans, 2012).

3 Primati kot modeli

Številne vrste afriških opic in primatov so naravne gostiteljice SIV, vendar se pri njih bolezen kot posledica okužbe ponavadi ne razvije. Nasprotno se pri azijskih makakih, ki niso naravni gostitelji lentivirusov primatov, kot posledica okužbe z določenimi sevi SIV pojavijo visoko virusno breme, hiter padec števila CD4⁺ celic in oportunistične okužbe (Poljak in sod., 2011).

3.1 Naravni gostitelji SIV

Več kot 40 vrst afriških primatov je endemično okuženih s specifičnim sevom SIV. Zaradi tisočletij ko-evolucije z virusom, pri teh živalih ne pride do pojava bolezni, ki bi bila posledica okužbe z virusom. Te živali zato niso uporabne kot modeli virusne patogeneze. Kljub temu, je primerjava med ne-patogeno in patogeno okužbo s SIV pri afriških in azijskih opicah pripeljala do nekaterih pomembnih spoznanj na področju patogeneze SIV. Zaradi medvrstnega prenosa SIVsmm, kateremu je sledil pojav HIV-2 pri ljudeh in SIVmac pri makakih je sajasti mangabi (*Cercocebus atys*) zanimiv model. Podobno kot pri patogeni lentivirusni okužbi, okužbi s SIVsmm in SIVmac pri naravnih gostiteljih sledi visoka stopnja trajnega virusnega podvojevanja, hitra rast produktivno okuženih limfocitov (hiter padec sluzničnih CD4+ celic) med akutno okužbo ter aktivacija prirojenega in pridobljenega imunskega sistema. Kljub temu, ti virusi pri svojih naravnih gostiteljih ne povzročijo kronične aktivacije imunskega sistema, progresivnega zmanjšanja sluzničnih in perifernih CD4+ celic ali uničenja strukture limfnih žlez. Genetske razlike med patogenimi in ne-patogenimi gostitelji še niso bile opredeljene; kljub temu pa razlike v celičnem tropizmu SIV pri naravnih gostiteljih, pri katerih prizanesejo centralnim spominskim CD4+ celicam, lahko predstavljajo pomemben dejavnik, ki vpliva na manjšo stopnjo tako kronične imunske aktivacije kot tudi progresivne izgube CD4+ celic (Hatzioannou in Evans, 2012).

3.2 Ne-naravni gostitelji SIV

V nasprotju z okužbo pri afriških opicah, okužba azijskih opic z določenimi sevi SIV poteka zelo podobno kot okužba s HIV-1 pri ljudeh; skupaj z uporabo rekombinantnih SHIV virusov so azijski makaki postali najpogosteje uporabljen model za HIV/AIDS. Ti modeli so uporabni za študije prenosa virusa, patogeneze, latence, razvoja novih cepiv in profilakse. Kljub temu, da lahko večino vrst makakov okužimo s SIV, se v praksi največ uporabljajo: Rhesus makaki (*Macaca mulatta*), pig-tailed makaki (*Macaca nemestrina*) in cynomolgus makaki (*Macaca fascicularis*). Evolucija vsakega od teh modelov je potekala edinstveno, prav tako pa ima vsak svojo strukturo populacije, od katere so odvisne posledice okužbe s SIV (Hatzioannou in Evans, 2012).

3.2.1 Rhesus makaki

Rhesus makaki indijskega izvora so najbolj preučeni in daleč najpogosteje uporabljeni model primatov za AIDS. Dva znanstveno najbolj zanimiva seva SIV (SIVmac251 in SIVmac239) sta bila originalno osamljena iz te vrste primatov indijskega izvora in sta zato zelo dobro prilagojena tem živalim; posledica okužbe je visoka viremija, ki se med posameznimi živalmi minimalno razlikuje. Podobno kot pri podvojevanju HIV-1, pride pri konstantnem podvojevanju SIV do hitre izgube CD4⁺ T celic. Napredovanje okužbe do bolezni je pri živalih, okuženih s SIV, veliko hitrejše kot pri ljudeh okuženih s HIV. Pri indijskih Rhesus makakih pride do pojava AIDS-a v 1-2 letih po okužbi, medtem ko je ta čas pri ljudeh podaljšan na 8-10 let, če le-ti ne prejemajo antiretrovirusne terapije. Geni MHC (angl. *major histocompatibility complex*; MHC) Rhesus makikov so zelo polimorfni in nosijo zapis za molekule, ki se nahajajo na površini okuženih celic, na podlagi česa jih lahko T celice prepoznajo. Polimorfizmi vplivajo na repertoar peptidov, ki so prisotni na okuženih celicah in zato pomembno vplivajo na sposobnost imunskega sistema, da nadzira okužbo s SIV. Nukleotidna zaporedja in število kopij človeškega levkocitnega antigena (angl. *human leukocyte antigen*; HLA) in nukleotidna zaporedja MHC genov makakov in drugih opic se razlikujejo. Še vedno ni pojasnjeno kako razlike v številu kopij genov MHC pri ljudeh in makakih vplivajo na aktivacijo CD8⁺ celic. Podobno kot pri ljudeh so tudi pri primatih določeni aleli kompleksa MHC I povezani z večjo sposobnostjo nadziranja virusnega podvojevanja. Zaradi zaščitne narave teh alelov, lahko njihovo prekomerno izražanje v eksperimentalnih ali kontrolnih skupinah zavede raziskovalce pri postavljanju hipotez o posledicah SIV okužbe, zlasti pri študijah z manjšim številom živali. Pri raziskavah AIDS-a so včasih uporabljeni tudi Rhesus makaki, ki izvirajo iz Kitajske in Mjanmara, predvsem zaradi omejene dostopnosti živali indijskega izvora. Določeni sevi SIV so za kitajske in mjanmarske makake, v primerjavi z indijskimi makaki, manj patogeni. Kljub temu, da so razlike v najvišji doseženi viremiji med obema vrstama primatov majhne, so le-te v začetku okužbe večje. Razlike v viremiji se kažejo v večjem številu CD4⁺ celic in daljši življenjski dobi pri kitajskih in mjanmarskih primatih. Vzrok za te razlike je zaenkrat še nepojasnen, najverjetneje pa so razlike posledica različnega delovanja imunskega sistema (Daniel in sod., 1985; Hatzioannou in Evans, 2012).

Kadar Rhesus makaki dobijo kontracepcijo s progestinom (npr. Depo-Provera), se njihov vaginalni epitel stanjša, s čimer se poveča občutljivost za vaginalno okužbo z virusi. Ob prejemanju te oblike kontracepcije se pri Rhesus makakih pojavijo znaki podobni naravnemu

menstrualnemu ciklu- tako so tudi te živali uporabne kot model vaginalnega prenosa HIV-1 (Veazey in sod., 2012).

3.2.2 *Pig-tailed makaki*

Pig-tailed makaki so zraven Rhesus makakov najpogosteje uporabljen model za AIDS med primati. Kljub temu, da je virusno breme in padec CD⁺ celic podoben kot pri Rhesus makakih, pri pig-tailed makakih hitreje pride do razvoja bolezni. V povprečju se pri pig-tailed makakih AIDS razvije znotraj 42 tednov po okužbi s SIV; pri Rhesus makakih pa se to zgodi v 70 tednih. Vzroki za to še niso znani; najverjetneje pride pri pig-tailed makakih do padca koncentracije bazalnih limfocitov neodvisno od SIV okužbe. Zanimiva značilnost pig-tailed makakov je, da ne izražajo beljakovine, ki preprečuje razvoj okužbe s HIV-1 po vstopu virusa v celico, TRIM5 α , kot je značilno za ljudi in Rhesus makake. Odsotnost TRIM5 α je najverjetneje vzrok za razvoj prehodne okužbe v teh živalih (Poljak in sod., 2011; Hatzioannou in Evans, 2012).

Živalski modeli so uporabni tudi za ugotavljanje vpliva spolno prenosljivih okužb (npr. z bakterijo *Chlamydia trachomatis* ali parazitom *Trichomonas vaginalis*) na učinkovitost delovanja preventivne zaščite proti HIV. Spolno prenosljive okužbe povzročijo spremembe v vaginalnem in rektalnem epitelu ali pa sprožijo nastanek lokalnega vnetnega odziva, kar poveča tveganje za okužbo s HIV-1. Nedavno je bil razvit model Pig-tailed makaka, ki je bil sočasno okužen s SHIV, *C. trachomatis* in *T. vaginalis*. Ustrezni modeli so lahko uporabni tudi za preučevanje učinkov hormonske kontracepcije na preventivno zaščito proti HIV-1 (Garcia-Lerma in Heneine, 2011; Veazey in sod., 2012).

Ocenjevanje učinkovitosti preventivne zaščite, ki se uporablja vaginalno je bolj zahtevno kot, če je zaščita namenjena za rektalno uporabo. Za preklinične raziskave učinkovitosti vaginalne zaščite je potrebno izbrati model, ki natančno posnema fiziološke spremembe, ki so povezane z normalnim menstrualnim ciklom pri ženskah. Rhesus makaki, v nasprotju s Pig-tailed makaki, za te vrste raziskav niso primerni, ker imajo mladičke sezonsko, medtem ko imajo Pig-tailed makaki normalen menstrualni cikel in hormonske spremembe podobne kot pri ljudeh (Garcia-Lerma in Heneine, 2011).

3.2.3 *Cynomolgus makaki*

Cynomolgus makaki, ki izvirajo iz Indokine, Malezije oz. Indonezije, se v raziskavah HIV-a ne uporabljajo tako pogosto, delno zaradi slabšega razumevanja imunskega odziva pri teh živalih. Primerjava virusnega bremena in števila CD4⁺ celic pri teh živalih in rhesus makakih

indijskega in kitajskega izvora je pokazala, da so določeni sevi SIV manj patogeni za cynomolgus makake. Primerjava MHC genov cynomolgus makakov je razkrila veliko raznolikost med geografsko oddaljenimi populacijami, medtem ko raznolikost znotraj članov posamezne populacije ni velika; prav tako najdemo pri cynomolgus makakih številne polimorfizme v TRIM5 α genih (Hatzioannou in Evans, 2012).

3.2.4 SIV in izzivi rekombinantnih sevov SHIV

Nesposobnost podvojevanja HIV-1 v opicah starega sveta je vsaj delno posledica notranjih celičnih blokad, ki jih povzročajo restriksijski dejavniki (TRIM5 α), beljakovine APOBEC3 (angl. *apolipoprotein B-editing catalytic subunit-like 3*) in mogoče tudi tetherin. Zato poskusne živali za preučevanje AIDS-a okužijo s SIV, ne pa s HIV-1. Sevi SIV, ki so bili na začetku uporabljeni kot modeli patogeneze, so izvirali iz naključnih ali eksperimentalnih okužb makakov s SIVsmm. Posledično se ti sevi SIV od HIV-1 razlikujejo v številnih pogledih. SIVsmm in SIVmac imata namesto gena *vpu*, soroden gen *vpx*; HIV-1 in SIVsmm/SIVmac imajo le 53% enakih nukleotidnih zaporedij in se razlikujejo tudi v organizaciji prekrivajočih ORFjev. Zaradi razlik med virusi, lahko SIV oz. SHIV uporabimo le kot nadomesten model za okužbo s HIV-1 (Poljak in sod., 2011).

SIV so prvič osamili iz Rhesus makaka s številnimi oportunističnimi okužbami in tumorji, ki so bili posledica imunske pomanjkljivosti (Daniel in sod., 1985). Ugotovili so, da je do okužbe makaka z virusom SIV prišlo med transplantacijo okuženih tkiv iz zelenih mangabov med poskusi razvoja ne-človeškega modela za preučevanje prionske bolezni (Apetrei in sod., 2006).

SIVmac251 in SIVsmE660 sta neodvisna virusna izolata, ki se pogosto uporabljata neposredno, brez kloniranja. Prednost teh sevov je genetska variabilnost, ki je pomembna predvsem pri preučevanju sluznično-prenesenih različic *Env*, hkrati pa teh sevov ne moremo uporabiti, kadar želimo poskuse standardizirati. Z namenom pridobitve genetsko definiranih virusov in provirusne DNA, ki jo lahko uporabimo za genetske manipulacije, so bili razviti infektivni kloni SIV (Hatzioannou in Evans, 2012).

SIVmac239 in SIVsmE543-3 sta patogena molekularna klona, ki sta sorodna SIVmac251 in SIVsmE660. Kot večina naravno prenesenih HIV-1 izolatov, ta dva virusa uporabljata koreceptor CCR5, se podvojujeta večinoma v spominskih CD4⁺ celicah in izražata glikoproteine *Env*, ki so neobčutljivi na delovanje nevtralizirajočih protiteles (Hatzioannou in Evans, 2012).

SHIV

Imunogenov cepiv za HIV-1 ne moremo neposredno testirati na virusu SIV. SIV tudi ni občutljiv za številna zdravila, ki inhibirajo HIV-1 proteazo, reverzno transkriptazo ali integrazo. Virusi SHIV lahko uporabljajo, zraven CCR5, tudi druge koreceptorje, vendar le redko CXCR4. Razlike v uporabi koreceptorjev predstavljajo ovire pri testiranju številnih inhibitorjev vstopa virusa v celico na modelih makakih, ki so okuženi s SIV. S tem namenom so razvili SHIV, ki se lahko podvojujejo in povzročajo bolezen pri makakih (Hatzioannou in Evans, 2012).

SHIV, ki izražajo HIV-1 *Env*

Z namenom preučevanja Env-specifičnih cepiv in zdravil na primatih, je bilo razvitih veliko sevov SHIV, ki izražajo HIV-1 *Env* glikoproteine. Večina teh rekombinant je bila ustvarjenih tako, da so gene SIVmac239 (*rev, tat in env*) nadomestili z geni HIV-1 (*rev, tat, vpu in env*) (120). Kljub temu, da je v začetku bilo pomnoževanje teh himernih virusov v makakih oteženo, so virusi med prenosom med številnimi živalmi pridobili sposobnost učinkovitega podvojevanja in povzročanja bolezni, tudi v 3 mesecih po okužbi. Prototip te skupine je SHIV89.6P, ki pa se ne uporablja več za ocenjevanje učinkovitosti cepiv, ker med drugim primarno uporablja koreceptor CXCR4 (Reimann in sod., 1996; Hatzioannou in Evans, 2012).

Število virusov SHIV, ki primarno uporabljajo koreceptor CCR5 in so patogeni za makake je omejeno. SHIVSF162P3 je bil prvi patogeni virus, s tropizmom za CCR5, ki se podobno kot SIV primarno podvojuje v spominskih CD4+ celicah. Ta virus so uporabljali v raziskavah terapije, ki bi preprečevala prenos virusa, kot so mikrobicidi in pasivna zaščita z Env-specifičnimi protitelesi, dokler niso odkrili živali, pri katerih se virus spontano podvojuje. Raziskave na področju odkrivanja novih virusov s tropizmom za CCR5 še potekajo (Hatzioannou in Evans, 2012).

SHIV, ki izražajo HIV-1 *pol*

Z namenom, da bi pridobili viruse, ki bi bili občutljivi tudi na zdravila, ki so tarčna za druge encime HIV-1, poteka razvoj druge generacije sevov SHIV, pri katerih so gene za polimerazo SIV nadomestili z ustreznimi geni HIV-1. Številni od teh rekombinantnih virusov vsebujejo zaporedja, ki nosijo zapis za reverzno transkriptazo HIV-1. Ti virusi so občutljivi na nenukleozidne inhibitorje reverzne transkriptaze (angl. *non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors*; NNRTI), ki se pogosto uporabljajo za zdravljenje HIV-1. Na podlagi makakov

okuženih s RT-SHIV je bilo dokazano, da neoptimalna izbira zdravljenja vpliva na pojav rezistence pri ljudeh na antiretrovirusni terapiji. Ti modeli omogočajo natančnejše raziskave virusnega podvojevanja; nedavne raziskave na teh modelih so pokazale, da med HAART (angl. *highly active antiretroviral therapy*) virusno podvojevanje še vedno poteka v številnih tkivih (137,138). Razvijajo tudi SHIV, ki izražajo HIV-1 proteazo ali kombinacije HIV-1 RT in *Env* (Hatzioannou in Evans, 2012).

stHIV je ime za HIV-1 s tropizmom za opičje celice. Pig-tailed makaki predstavljajo še posebej privlačen model, ker nimajo beljakovin TRIM5, ki preprečujejo okužbo s HIV-1. stHIV-1, ki ga dobimo z zamenjavo HIV-1 *vif* gena s SIVmac *vif* genom, je odporen na APOBEC beljakovine makakov in se lahko podvojuje v pig-tailed makakih med akutno okužbo, pri čemer se pojavi viremija, ki je podobna kot pri človeški okužbi s HIV-1. Ta model je bil uporabljen za dokaz učinkovitosti profilakse pri zagotavljanju navidezne sterilne zaščite z mešanico zdravil, ki se pogosto daje ljudem. Razvoj novih stHIV sevov bo ščasoma mogoče lahko omogočal neposredno testiranje učinkovitosti imunogenov HIV-1 cepiv in antiretrovirusne terapije v makakih (Hatzioannou in Evans, 2012).

3.2.5 Elitni kontrolerji

5-15% okuženih oseb lahko zelo dolgo, tudi več kot 15 let ostane v klinično mirnem obdobju z dolgotrajno nespremenjeno koncentracijo celic T pomagalk in HIV-1 RNA v krvi. Te osebe imenujemo elitni kontrolerji (angl. *elite controllers/ long-term nonprogressors*) (Poljak in sod., 2011). V nedavno objavljeni raziskavi so se osredotočili na živalski model elitnih kontrol. V raziskavo so vključili 16 indijskih Rhesus makakov (8 v eksperimentalno skupino in 8 v kontrolno skupino), ki izražajo določen alel kompleksa MHC I, ki je podoben HLA-B*27, katerega koncentracija je povišana pri človeških elitnih kontrolerjih. Opice iz eksperimentalne skupine so cepili s cepivom, ki je vsebovalo 3 T-celične epitope (Vif RL8, Vif RL9 in Nef RL10), ki povzročajo več kot 50% CD8+ T-celičnega odgovora v živalskih elitnih kontrolerjih. Rezultati raziskave so pokazali, da učinkovito cepljenje s posameznimi celičnimi epitopi lahko povzroči nastanek CD8+ T-celičnega imunskega odgovora, ki nadzira podvojevanje virusa tako pri opicah, kot tudi pri ljudeh (Mudd in sod., 2012).

4 Zaključek

Kljub temu, da majhni modeli, kot so miške, kunci in mačke, ponujajo številne prednosti v smislu visoke stopnje reprodukcije, nizkih stroškov vzdrževanja in možnostjo zastavitve raziskav na podlagi pasemskih, genetsko identičnih živali, te živali z ljudmi veže le daljna sorodstvena vez. Zato rezultatov raziskav, ki jih dobimo s temi modeli, ne moremo neposredno povezati s predvidenimi učinki okužbe pri človeku. Napredek na področju razvoja transgenih mišk, ki so bile delno rekonstruirane s človeškim imunskim odzivom, je omogočil, da so ti majhni modeli bolj uporabni. S tem, da miške humaniziramo izgubimo nekaj njihovih osnovnih prednosti majhnih modelov, saj jih ne moremo gojiti in jim moramo zagotoviti boljše življenjsko okolje. HIV-1 je visoko specifičen za ljudi in mora prečkati številne ovire, da se lahko razmnožuje v večini drugih živali, zato najverjetneje v kratkem bolj ugoden model manjših živali še ne bo razvit. Trenutno se za začetne raziskave na področju odkrivanja novih terapij in cepiv še vedno pogosteje uporabljajo primati kot miške.

Uporaba primatov kot modelov ima številne prednosti pred uporabo modelov manjših živali. Okužba s SIV ali SHIV pri makakih je zelo podobna okužbi s HIV-1 pri ljudeh, v smislu tipov celic, ki so občutljive na virusno okužbo, padca števila CD4⁺ celic in razvoja oportunističnih okužb po razvoju AIDS-a. Prav tako imajo makaki podobno zgradbo tkiv reproduktivne in gastrointestinalne sluznice, kar nam omogoča testiranje cepiv in terapije, s katero bi preprečili sluznični prenos HIV-1. Zaradi tesne filogenetske povezave med ljudmi in primati, so številni geni, ki nadzirajo imunski sistem pri okužbi s SIV, podobni ali celo ortologni človeškemu genom, ki nadzirajo imunski sistem pri okužbi s HIV-1. Tako kot pri ljudeh, se tudi pri teh primatih posledice okužbe s SIV razlikujejo od živali do živali. Ta značilnost primatov ima svoje prednosti in slabosti. Genetska raznolikost med živalmi ponuja priložnost preučevanja specifičnih vidikov interakcij med gostiteljem in patogenom, kot je zaščitna vloga alelov MHC I pri nadziranju virusne okužbe. Hkrati pa ta genetska raznolikost onemogoča uporabo majhnega števila modelov za posamezno študijo, ker moramo vključiti približno enako število živali z zaščitnimi MHC I aleli in različnimi TRIM5 genotipi tako v eksperimentalno kot v kontrolno skupino.

Okužba makakov s SIV ali SHIV je že 20 let stalnica v raziskavah AIDS-a, kljub temu da sta SIV in HIV-1 različna virusa. Razvoj novih sevov stHIV, ki bi bolje posnemali značilnosti HIV-1, bi prinesli številne izboljšave na področju trenutnih modelov. Čeprav je razvoj stHIV sevov še vedno v povojih, ima ta pristop potencial spremembe modelov primatov za razvoj

terapije in cepiv proti HIV-1. Možno je, da noben model ne bo popolnoma zajel vseh značilnosti HIV-1 okužbe pri ljudeh. Kljub temu, na področju preklinične evaluacije zdravljenja in preventivnih strategij prihaja do številnih napredkov, tudi z izboljšavo obstoječih in razvojem novih modelov (Hatzioannou in Evans, 2012; Louz in sod., 2012).

5 Literatura

Apetrei C, Lerche NW, Pandrea I et al. Kuru experiments triggered the emergence of pathogenic SIVmac. *AIDS*. 2006;20:317-21.

Daniel MD, Letvin NL, King NW et al. Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science*. 1985;228:1201-4.

Goldman JP, Blundell MP, Lopes L et al. Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. *Br J Haematol*. 1998;103:335-42.

García-Lerma JG, Heneine W. Animal models of antiretroviral prophylaxis for HIV prevention. *Curr Opin HIV AIDS*. 2012;7:505-13.

Gorantla S, Poluektova L, Gendelman HE. Rodent models for HIV-associated neurocognitive disorders. *Trends Neurosci*. 2012;35:197-208.

Hatzioannou T, Evans DT. Animal models for HIV/AIDS research. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10:852-67.

Hütter G, Ganepola S. Eradication of HIV by transplantation of CCR5-deficient hematopoietic stem cells. *ScientificWorld Journal*. 2011;11:1068-76.

Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002;100:3175-82.

Louz D, Bergmans HE, Loos BP et al. Animal models in virus research: their utility and limitations. *Crit Rev Microbiol*. 2012 Sep 14. [Epub ahead of print]

McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H et al. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*. 1988 23;241:1632-9.

Melkus MW, Estes JD, Padgett-Thomas A et al. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nat Med*. 2006;12:1316-22.

Morrow WJ, Wharton M, Lau D et al. Small animals are not susceptible to human immunodeficiency virus infection. *J Gen Virol*. 1987;68:2253-57.

Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM et al. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature*. 1988;335:256-259.

Mudd PA, Martins MA, Ericson AJ et al. Vaccine-induced CD8+ T cells control AIDS virus replication. *Nature*. 2012;491:129-33.

Pietsch J, Gruell H, Bournazos S, et al. A mouse model for HIV-1 entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:15859-64.

Poljak M, Bogovac Ž, Seme K. Retrovirusi. 2011. V: Medicinska virologija. Poljak M, Petrovec M (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 219-50.

Shapiro S. HIV Vaccine Development: Strategies for preclinical and clinical investigation. AIDS Res Hum Retroviruses. 2013 Feb 4. [Epub ahead of print]

Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. J Immunol. 2005;174:6477-89.

Veazey RS, Shattock RJ, Klasse PJ et al. Animal models for microbicide studies. Curr HIV Res. 2012;10:79-87.