



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ (HUMANIZED
MOUSE MODELS)»**

**ΕΛΕΝΗ ΠΑΤΡΙΚΙΟΥ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**

**ΛΑΡΙΣΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ, 2014**

0

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Α. ΤΣΕΖΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΕΠ.ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Π.Θ.

Συνεπιβλέπουσα: ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Π.Θ.

Συνεπιβλέπουσα: ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Π.Θ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΑΛΛΩΝ ΖΩΩΝ.....	6
 ΕΞΕΛΙΞΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ.....	7
 ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ 2 ΚΑΙ ΛΟΓΟΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΗΣ.....	9
 ΠΩΣ ΚΑΙ ΓΙΑΤΙ ΧΡΗΣΗΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΤΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	11
 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ.....	13
 ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	14
ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΝΤΙΚΩΝ	
 NUDE ΠΟΝΤΙΚΟΙ.....	15
 SCID ΠΟΝΤΙΚΟΙ.....	17
 NSG ΠΟΝΤΙΚΟΙ.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗ.....	24
 1.1 ΠΑΛΙΑ ΚΑΙ ΝΕΑ ΜΟΝΤΕΛΑ.....	27
 1.2 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ Hu- ΠΟΝΤΙΚΩΝ.....	29
 1.3 ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ.....	33
 2.1 ΜΟΝΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΠΟ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ.....	37

2.2 ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΤΟΥ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 1 ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
2.3 ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΑΜΕ ΣΤΑ ΕΞΑΝΘΡΩΠΙΣΜΕΝΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ.....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΚΑΡΚΙΝΟΣ	
3.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	40
3.1.1 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΓΓΕΙΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ.....	43
3.1.2 ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗ.....	46
3.2 ΜΕΛΑΝΩΜΑ.....	50
3.2.1 ΘΕΩΡΙΑ ΤΩΝ CSC.....	50
3.2.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΛΕΞΙΝΗΣ.....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΜΙΤΡG ΚΑΙ ΜΙΣΤΡG.....	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ.....	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ερευνητές χρησιμοποιούν τα ζωικά μοντέλα στη βασική έρευνα, για επιτυχείς χειρουργικές επεμβάσεις και μεταμοσχεύσεις οργάνων, στις δοκιμασίες για ασφαλή καταναλωτικά προϊόντα, στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών και στην έρευνα για την ανακάλυψη φαρμάκων καθώς και σε προκλινικές μελέτες για την ασφάλεια του φαρμάκου και την αποτελεσματικότητά του. Τα ζώα που χρησιμοποιούνται είναι τα τρωκτικά, οι γάτες και μοντέλα που προκύπτουν από το εργαστήριο όπως το zebrafish.

Τα ποντίκια είναι αυτά που χρησιμοποιούνται σε μεγαλύτερο ποσοστό και αυτό οφείλεται στα πλεονεκτήματα του ποντικού σε σχέση με τα υπόλοιπα ζώα. Αυτά περιλαμβάνουν ομοιότητες μεταξύ της ανατομίας, του γονιδιώματος και γονιδίων πολύπλοκων ασθενειών.

Τα βασικά στελέχη ανοσοκατεσταλμένων ποντικών που χρησιμοποιούνται σήμερα στην έρευνα είναι τα SCID, NOG και NSG. Τα μοντέλα αυτά χρησιμοποιούνται συχνά ως δέκτες για ανθρώπινα κύτταρα ή ιστούς, επειδή μπορούν σχετικά εύκολα να δεχθούν ετερόλογα κύτταρα, λόγω της έλλειψης ανοσίας του ξενιστή. Τα εξανθρωπισμένα αυτά ποντίκια χρησιμοποιούνται συνήθως ως μικρά μοντέλα ζώων στην βιολογική και ιατρική έρευνα για την ανθρώπινη θεραπευτική και την κατανόηση της παθοφυσιολογίας των ασθενειών. Στις χρήσεις τους συμπεριλαμβάνονται, η έρευνα για τον διαβήτη τύπου 1 και διαφόρων τύπων καρκίνου με σκοπό την κατανόηση της εμφάνισης και εξέλιξης αυτών καθώς επίσης τις προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση και πρόληψη αυτών.

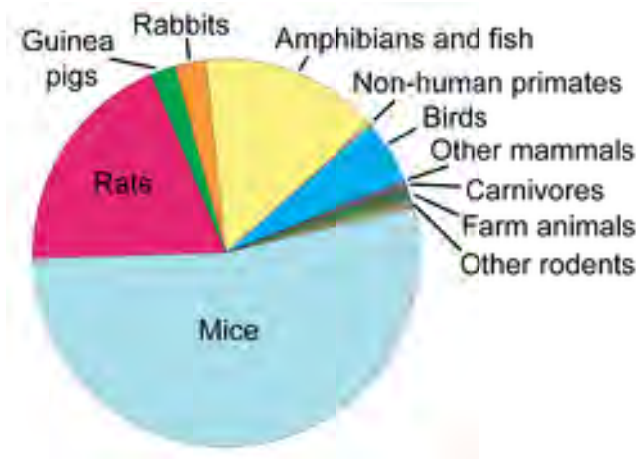
Τα νέα μοντέλα που έχουν περιγραφεί και χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της ανθρώπινης ανοσίας είναι μόνο η αρχή της επόμενης γενιάς των εξανθρωπισμένων ποντίκων που θα είναι σύντομα διαθέσιμα. Εναπομένουσες προκλήσεις είναι να δημιουργηθούν νέα στελέχη ποντικών που απαιτούνται για την περαιτέρω ενίσχυση της ανθρώπινης ανοσίας με μειωμένη την έμφυτη ανοσία του ποντικού. Τα εξανθρωπισμένα ποντίκια είναι ολοένα και περισσότερο σημαντικά εργαλεία στη μεταγραφική βιοϊατρική έρευνα, επιτρέποντας γνώσεις σχετικά με την κατανόηση μας για την ανθρώπινη αιμοποίηση, την έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία, την αυτοανοσία, την μολυσματική ασθένεια και την ανοσολογία του καρκίνου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ερευνητές χρησιμοποιούν ζωικά μοντέλα στη βασική έρευνα, για επιτυχείς χειρουργικές επεμβάσεις και μεταμοσχεύσεις οργάνων, στις δοκιμασίες για ασφαλή καταναλωτικά προϊόντα, στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών για τη θεραπεία ασθενειών του ανθρώπου, και στην έρευνα για την ανακάλυψη φαρμάκων (συμπεριλαμβανομένης της ταυτοποίησης του στόχου και επικύρωσης, τον έλεγχο των φαρμάκων που θα οδηγήσει στη βελτιστοποίηση στον έλεγχο της ασφάλειας και της τοξικότητας), καθώς και σε προκλινικές μελέτες για την ασφάλεια του φαρμάκου και την αποτελεσματικότητά του.

Η χρήση των ζωικών μοντέλων στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών για ασθένειες του ανθρώπου συμπίπτει με τη βασική έρευνα που χρησιμοποιεί ζωικά μοντέλα για την κατανόηση των φυσιολογικών και ασθενειών οδών. Αλλά ο στόχος της είναι να επιτευχθεί η γνώση των οδών και των στόχων μιας ασθένειας που οδηγεί στην ανάπτυξη και την ανακάλυψη νέων φαρμάκων ή άλλων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Τα οργανικά μοντέλα χρησιμοποιούνται εδώ και καιρό στη βασική και εφαρμοσμένη έρευνα στον τομέα των βιοεπιστημών. Μεταξύ των πρότυπων οργανισμών, τα ζωικά μοντέλα έχουν κεντρική θέση στην ιατρική έρευνα και στη φαρμακευτική και βιοτεχνολογική εταιρεία έρευνας, όπως η ανακάλυψη φαρμάκων, προκλινικές μελέτες και τοξικολογία. Παρόλο που οι φαρμακευτικές εταιρείες έχουν καιρό που χρησιμοποιούν ζωικά μοντέλα θηλαστικών όπως ποντικούς, χάμστερ, αρουραίους, σκύλους, γάτες, κουνέλια, βατράχια, πουλιά, χοίρους, και τα πρωτεύοντα θηλαστικά. Πιο πρόσφατα, η φαρμακευτική βιομηχανία ή βιοτεχνολογία έχει επίσης εγκρίνει αρκετά μοντέλα ασπόνδυλων και σπονδυλωτών ζώων που έχουν προκύψει από ακαδημαϊκά εργαστήρια. Αυτά τα ζωικά μοντέλα περιλαμβάνουν το νηματώδη *Caenorhabditis elegans*, τη μύγα των φρούτων *Drosophila*, και το zebrafish. Η υιοθέτηση των ασπόνδυλων και zebrafish ως ζωικά μοντέλα από τη βιομηχανία έχει οδηγηθεί από την έλευση της γονιδιωματικής, ιδίως από τη διαπίστωση ότι όχι μόνο γονίδια, αλλά επίσης και μονοπάτια, τείνουν να διατηρηθούν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης.



Τύποι σπονδυλωτών ζώων που χρησιμοποιούνται στην έρευνα

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΑΛΛΩΝ ΖΩΩΝ

Ανάμεσα στα πολλά πλεονεκτήματα για τη χρήση του ποντικιού ως οργανικό μοντέλο, το πιο σημαντικό είναι η εντυπωσιακή ομοιότητα τους με τον άνθρωπο στην ανατομία, τη φυσιολογία και τη γενετική. Πάνω από το 95% του γονιδιώματος του ποντικού είναι παρόμοιο με το δικό μας, καθιστώντας τη γενετική έρευνα του ποντικού ιδιαίτερα εφαρμόσιμη στις ανθρώπινες ασθένειες. Πρακτικά, τα ποντίκια είναι ένα αποδοτικό και αποτελεσματικό εργαλείο για την επιτάχυνση της έρευνας και της ανάπτυξης της φαρμακευτικής αγωγής. Η φυσική διακύμανση μεταξύ των καθαρών στελεχών παρέχει ένα ουσιαστικό σύστημα για τη μελέτη πολύπλοκων ασθενειών που αφορούν την αλληλεπίδραση πολλών γονιδίων, ένα κομβικό σημείο της βιοϊατρικής έρευνας και ενός ελέγχου της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου. Επειδή πολλά από τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τις πολύπλοκες ασθένειες όπως η αρτηριοσκλήρωση και η υπέρταση είναι κοινά μεταξύ ποντικών και ανθρώπων, η έρευνα σε ποντίκια είναι ζωτικής σημασίας για τον εντοπισμό των γενετικών παραγόντων κινδύνου στον ανθρώπινο πληθυσμό.

Επιπρόσθετα, η ικανότητά μας στον άμεσο χειρισμό του γονιδιώματος του ποντικού παρέχει ένα εξαιρετικά ισχυρό εργαλείο για τη διαμόρφωση συγκεκριμένων ασθενειών για τις οποίες είναι γνωστό το ευθυνόμενο γονίδιο. Για παράδειγμα, ο χειρισμός των γονιδίων που εμπλέκονται στον καρκίνο του ανθρώπου επέτρεψε τη δημιουργία εκατοντάδων μοντέλων ποντικών του

καρκίνου, ενισχύοντας σημαντικά την ικανότητά μας να βρούμε αποτελεσματικές θεραπείες για πολλούς διαφορετικούς τύπους νεοπλασίας (<http://research.jax.org/mousegenetics/advantages/advantages-of-mouse.html>).

Όπως στους ανθρώπους έτσι και στους ποντικούς, το γενετικό υπόβαθρο μπορεί να επηρεάσει έντονα τα κλινικά συμπτώματα ή τον φαινότυπο που προκαλούνται από τα γονίδια της νόσου. Γενετικές διαφορές μεταξύ των ανθρώπων είναι μία από τις αιτίες της διακύμανσης στη σοβαρότητα των πολύπλοκων ασθενειών όπως ο καρκίνος ή ο διαβήτης, από το ένα άτομο στο άλλο. Η ανάλυση της εν λόγω μεταβλητότητας στον ποντικό μπορεί να αποκαλύψει την υποκείμενη γενετική βάση στον άνθρωπο. Για παράδειγμα, έχουν ανακαλυφθεί πολλαπλά γονίδια που οδηγούν σε αθηροσκλήρωση στον ποντικό, πολλά από αυτά τα γονίδια στη συνέχεια προσδιορίζονται στον άνθρωπο.

Οι επιστήμονες πρέπει να είναι ενήμεροι για την πιθανή επίδραση των ρυθμιστικών γονιδίων κατά τη μεταφορά τους σε νέα στελέχη, αλλά η ανακάλυψή τους μπορεί επίσης να αποκαλύψει τεμνόμενες μεταβολικές οδούς και να εντοπίσει τα γονίδια που συμβάλλουν στη μεταβλητότητα των ασθενειών. (<http://research.jax.org/mousegenetics/advantages/genetic-background-effects.html>).

ΕΞΕΛΙΞΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Οι λειτουργίες των ανθρώπινων κυττάρων και ιστών σε ποντίκια ξενιστές έχουν διερευνηθεί από τις πρώτες περιγραφές σε ποντικούς που υπολείπονται θύμου αδένου (Flanagan et al., 1996). Η εξανθρώπιση των ανοσοκατεσταλμένων ποντικών έχει προχωρήσει σημαντικά με την ανακάλυψη της συνδυασμένης ανοσοανεπάρκειας και τον knockout ανασυνδυασμό (Mombaert et al., 1992). Ο επιπρόσθετος χειρισμός του γονιδιώματος του ποντικού από knockout και διαγονιδιακή τεχνολογία οδήγησε σε αυξημένη εμφύτευση των λειτουργικών ανθρώπινων κυττάρων και ιστών (Shultz et al., 2007). Η πρόσφατη περιγραφή των ανοσοκατεσταλμένων ποντικών που φέρουν μια μεταλλαγή στην αλυσίδα του γ-υποδοχέα της IL-2 διευκόλυνε σημαντικά την in vivo εμφύτευση και

λειτουργία των ανθρώπινων κυττάρων. Η ιστορία των εξανθρωπισμένων ποντικών στην βιοιατρική έρευνα και οι τεράστιες πρόοδοι σε αυτόν τον τομέα που προκύπτουν από την παραγωγή ανοσοκατεσταλμένων ποντικών που φέρουν μια μεταλλαγή στο γονίδιο IL-2 έχει αναθεωρηθεί πρόσφατα (Pearson et al., 2008). Υπάρχουν τρεις σημαντικοί πρόοδοι στην ανάπτυξη των μικρών ζωικών μοντέλων που μπορούν να δεχτούν μεταμόσχευση. Πρώτα, η ανακάλυψη του ανοσοκατεσταλμένου CB-17- Prkdc^{scid} ποντικού το 1983 (Bosma et al., 1983) που αποτελεί τη βάση για την μετέπειτα περιγραφή στην εμφύτευση ανθρώπινων αιμοποιητικών και ανοσοποιητικών κυττάρων το 1988 (Mosier et al., 1988). Αυτές οι αναφορές σύντομα οδήγησαν στη δημιουργία των πρώτων μικρών ζωικών μοντέλων για τη μελέτη της λοίμωξης από HIV (Mosier et al., 1991). Ωστόσο είναι πολύ χαμηλά τα επίπεδα των μεταμοσχευμένων ανθρώπινων αιμοποιητικών και ανοσοποιητικών κυττάρων που μπορούν να δημιουργηθούν στα CB17- scid ποντίκια, περιορίζοντας σοβαρά τη χρησιμότητά τους. Η επακόλουθη ανάπτυξη των NOD-SCID ποντικών στα μέσα του 1990 (Shultz et al., 1995), επέτρεψε σε μεγαλύτερα επίπεδα την εμφύτευση ανθρώπινων αιμοποιητικών και ανοσολογικών κυττάρων, ωστόσο δεν επιτεύχθηκε η πλήρης αποκατάσταση του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος και η ανάπτυξη ανθρώπινων T κυττάρων από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSC) (Shultz et al., 2012). Μια σημαντική ανακάλυψη στον τομέα ήρθε με την ανάπτυξη των ανοσοκατεσταλμένων scid ποντικών, Rag1^{null} ή Rag2^{null} στις αρχές του 2000, φάιροντας μια στοχευμένη μετάλλαξη στον υποδοχέα της γάμμα αλυσίδας της IL-2 (IL2rg^{null}) (Ito et al., 2002).

Τα IL2rg^{null} ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια έχουν πολλαπλές ελλείψεις στην έμφυτη ανοσία και παντελή έλλειψη NK κυττάρων. Τα NK κύτταρα αποτελούν έναν από τους πρωταρχικούς ανοσοποιητικούς παράγοντες του ξενιστή, που εμποδίζουν την εμφύτευση ανθρώπινων κυττάρων (Shultz et al., 2003). Τα ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια που φέρουν αυτή τη μεταλλαγή διευκολύνουν σημαντικά την εμφύτευση και τη λειτουργία των ανθρώπινων αιματολεμφικών και άλλων κυττάρων και ιστών. Αυτά τα ποντίκια επιτρέπουν την ανάπτυξη του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος συμπεριλαμβανομένων των T και B κυττάρων μετά από μεταμόσχευση HSC. Η λειτουργική μεταμόσχευση ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος είναι ικανή από τα T και B κύτταρα

που εξαρτώνται από ανοσολογικές αντιδράσεις, παραγωγή αντισωμάτων από αντιικές αντιδράσεις και αλλογραφικής απόρριψης. Τα ποντίκια αυτά υποστηρίζουν επίσης τον αυξανόμενο ενοφθαλμισμό των πρωτογενών ανθρώπινων καρκίνων και των προγονικών κακοηθών κυττάρων, επιτρέποντας την *in vivo* έρευνα της παθογένειας και λειτουργίας. Επιπρόσθετα ειδικοί ανθρώπινοι μολυσματικοί παράγοντες για τους οποίους ζωικά μοντέλα προηγουμένως ήταν δυσεύρετα, τώρα πια μπορούν να μελετηθούν *in vivo* χρησιμοποιώντας αυτή τη νέα γενιά εξανθρωπισμένων ποντικών (Brehm et al., 2010).

Ένα εξανθρωπισμένο ποντίκι, είναι ένα ποντίκι που φέρει λειτουργικά ανθρώπινα γονίδια, κύτταρα, ιστούς ή και όργανα. Εξανθρωπισμένα ποντίκια χρησιμοποιούνται συνήθως ως μικρά μοντέλα ζώων στην βιολογική και ιατρική έρευνα για την ανθρώπινη θεραπευτική. Ανοσοανεπαρκή ποντίκια χρησιμοποιούνται συχνά ως δέκτες για ανθρώπινα κύτταρα ή ιστούς, επειδή μπορούν σχετικά εύκολα να δεχθούν ετερόλογα κύτταρα, λόγω της έλλειψης ανοσίας του ξενιστή. Παραδοσιακά, τα Nude ποντίκια και τα ποντίκια με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID), έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό, αλλά πρόσφατα τα ποντίκια NOG (Shultz et al., 2007), και τα NSG ποντίκια (Shultz et al., 2005) έχουν αποδείξει ότι μπορούν να εμφυτευθούν ανθρώπινα κύτταρα και ιστοί πιο αποτελεσματικά από άλλα μοντέλα (Shultz et al., 1995; Greiner et al., 1998). Δύο στελέχη ποντικών, που ονομάζονται MITRG και MISTRG, στα οποία περιγράφηκε η ανθρώπινη έκδοση των τεσσάρων γονιδίων, που κωδικοποιούν κυτοκίνες σημαντικές για την έμφυτη ανάπτυξη ανοσοκυττάρων, αναπτύχθηκαν στοχευμένα ποντίκια σε αυτές τις θέσεις. Τέτοια εξανθρωπισμένα μοντέλα ποντικού μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη διαμορφώση του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος σε σενάρια της υγείας και της παθολογίας, και μπορεί να επιτρέψει την αξιολόγηση των θεραπευτικών υποψηφίων σε ένα *in vivo* καθορισμό σχετικών με την ανθρώπινη φυσιολογία (Rongvaux et al., 2014).

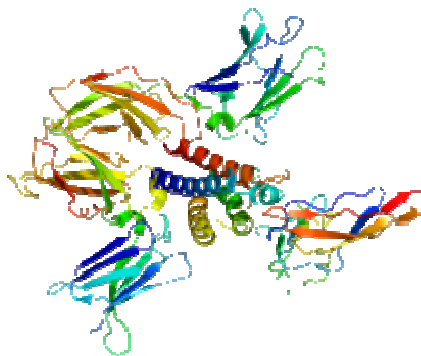
ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ 2 ΚΑΙ ΛΟΓΟΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΗΣ

Ο υποδοχέας της ιντερλευκίνης 2 (IL-2R) είναι μια ετεροτριμερής πρωτεΐνη που εκφράζεται στην επιφάνεια ορισμένων κυττάρων του ανοσοποιητικού, όπως τα λεμφοκύτταρα, όπου δεσμεύεται και αποκρίνεται σε μια κυτοκίνη που

καλείται IL-2. Ο IL-2R αποτελείται από τρεις υπομονάδες τις α , β και γ όπου συνδέονται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Οι α και β αλυσίδες εμπλέκονται στη σύνδεση της IL-2, ενώ η γ αλυσίδα μαζί με τη β υπομονάδα πραγματοποιεί τη μεταγωγή του σήματος μετά την αλληλεπίδραση της κυτοκίνης. Η υπομονάδα γ του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2 (IL2rg), είναι μια υπομονάδα του υποδοχέα της κυτοκίνης η οποία είναι κοινή για τα σύμπλοκα υποδοχέα σε τουλάχιστον έξι διαφορετικούς υποδοχείς ιντερλευκίνης : IL2, IL4 (Russell et al., 1993), IL7 (Noguchi et al., 1993), IL9, IL15 και IL21. Η γ γλυκοπρωτεΐνη είναι ένα μέλος της οικογένειας του υποδοχέα κυτοκίνης τύπου 1 που εκφράζεται στα περισσότερα είδη λεμφοκυττάρων και το γονίδιο της βρίσκεται στα θυλαστικά στο X χρωμόσωμα.

Αυτή η πρωτεΐνη βρίσκεται στην επιφάνεια των άωρων κυττάρων του αίματος του μυελού των οστών. Το ένα άκρο της πρωτεΐνης βρίσκεται εκτός του κυττάρου, όπου δεσμεύεται με κυτοκίνες και το άλλο άκρο αυτής βρίσκεται στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου μεταδίδει σήματα προς τον πυρήνα αυτού. Η γάμμα αλυσίδα μαζί με πρωτεΐνες κατευθύνουν τα κύτταρα του αίματος προς τον σχηματισμό λεμφοκυττάρων. Ο υποδοχέας διευθύνει την ανάπτυξη και την ωρίμανση των υποτύπων των λεμφοκυττάρων που είναι τα T, τα B και τα NK κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα δρουν εναντίον των ιών, παράγουν αντισώματα και βοηθούν στη ρύθμιση ολόκληρου του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τα λεμφοκύτταρα που εκφράζουν την γ αλυσίδα μπορούν να σχηματίσουν λειτουργικούς υποδοχείς γι' αυτές τις πρωτεΐνες κυτοκίνης, τα οποία μεταδίδουν σήματα από το ένα κύτταρο στο άλλο και προγράμματα άμεσης κυτταρικής διαφοροποίησης (Asao et al., 2001). Μια μη λειτουργική πρωτεΐνη ή η απουσία αυτής δεν επιτρέπει στα χημικά σήματα να αναμεταδίδονται προς τον πυρήνα και τα λεμφοκύτταρα δεν μπορούν να αναπτυχθούν κανονικά. Η έλλειψη λειτουργικά ώριμων λεμφοκυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα να μην υπάρχει καμία λειτουργική ανοσία, προωθώντας τον αυξημένο ενοφθαλμισμό των ανθρώπινων λειτουργικών κυττάρων. Χωρίς σημαντικά αναπτυξιακά σήματα από την IL7 και IL15, οι πληθυσμοί των T και NK κυττάρων αποτυγχάνουν να αναπτυχθούν (Henthorn et al., 1994).



ΕΙΚΟΝΑ: IL2R γ

(http://en.wikipedia.org/wiki/Common_gamma_chain)

ΠΩΣ ΚΑΙ ΓΙΑΤΙ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΤΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Καρκινικά μοντέλα ποντικών έχουν κατά 'επανάληψη χρησιμοποιηθεί στην πιστοποίηση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων στην ανάπτυξη των κλινικών δοκιμών σε ανθρώπους. Τρωκτικά μοντέλα όγκων που χρησιμοποιούνται σήμερα και τα οποία περιλαμβάνουν διαγονιδιακά μοντέλα όγκων, καθώς και εκείνα που παράγονται από την υποδόρια εμφύτευση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών όγκου σε ανοσοανεπαρκείς ποντικούς, δεν αντιπροσωπεύουν επαρκώς τα κλινικά χαρακτηριστικά του καρκίνου, ιδίως όσον αφορά την μετάσταση και την ευαισθησία στα φάρμακα. Όλο και περισσότερο χρησιμοποιούνται ανθρώπινοι καρκινικοί ιστοί ως μοντέλα ξενομοσχεύματος όπου εμφυτεύονται υποδόρια ή στην νεφρική κάψα σε ανοσοανεπαρκείς ποντικούς, όπως αθυμικά γυμνά ποντίκια ή με σοβαρή συνδυασμένη ανοσολογική ανεπάρκεια (SCID), όπου με αυτόν τον τρόπο να παρέχεται μια πιο ακριβής αντανάκλαση των βιολογικών χαρακτηριστικών του ανθρώπινου όγκου σε σχέση με κυτταρικές σειρές του όγκου. Η ικανότητα να περνούν ιστοί όγκων ασθενών, σε μεγάλους αριθμούς, σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια παρέχει δυνατότητες για καλύτερες προκλινικές δοκιμές νέων θεραπευτικών στόχων για τη θεραπεία και το καλύτερο αποτέλεσμα στον καρκίνο (Katao et al., 2010).

Η πρόοδος στον τομέα της ογκολογίας για την ανάπτυξη φαρμάκων έχει παρεμποδιστεί από την έλλειψη προκλινικών μοντέλων που μπορούν να προβλέψουν αξιόπιστα την κλινική δραστηριότητα των νέων ενώσεων σε

ασθενείς με καρκίνο. Σε μια προσπάθεια για την αντιμετώπιση των ελλείψεων αυτών, έχει υπάρξει μια πρόσφατη αύξηση στη χρήση των μοσχευμάτων όγκων (PDX) που προέρχονται από ασθενείς και μεταμοσχεύονται σε ανοσοκατασταλμένους ποντικούς όπως αθυμικά γυμνά ή NOD / SCID ποντίκια για προκλινική μοντελοποίηση. Πολλά ογκοειδικά μοντέλα PDX έχουν συσταθεί και το σημαντικότερο, είναι ότι πέρασαν σε ποντίκια που είναι βιολογικά σταθερά από την άποψη των παγκόσμιων προτύπων γονιδιακής έκφρασης, την κατάσταση μεταλλάξεων, το μεταστατικό δυναμικό, την ανταπόκριση των φαρμάκων και την αρχιτεκτονική του όγκου. Αυτά τα χαρακτηριστικά θα μπορούσαν να παρέχουν σημαντικές βελτιώσεις σε σχέση με τα συνήθη μοντέλα ξενομοσχεύματος κυτταρικών σειρών (Tentler et al., 2012).

Ένας από τους πιο συχνά αναφερόμενους λόγους των υψηλών ποσοστών αποτυχίας των νέων συντελεστών στην ογκολογία είναι η έλλειψη των προκλινικών μοντέλων που επαναλαμβάνουν την ετερογένεια των όγκων των ασθενών (Johnson et al., 2001). Αν και η έλευση του καρκίνου σε τεχνικές καλλιέργειας κυτταρικών σειρών τροφοδοτούν την επιτάχυνση και την επέκταση στην ανακάλυψη της βιολογίας του καρκίνου που συνεχίζεται μέχρι σήμερα, η σκληρή πραγματικότητα είναι ότι η ικανότητά μας να μετουσιώσουμε αυτά τα ευρήματα στην κλινική πράξη έχει παρεμποδιστεί από τα ίδια τα μοντέλα που έδωσαν αυτές τις πολύτιμες πληροφορίες. Πολλές εξηγήσεις έχουν προταθεί για αυτή την ασυνέπεια, συμπεριλαμβανομένου του γεγονότος ότι οι κυτταρικές σειρές, ακόμη και όταν πολλαπλασιάζονται *in vivo*, προέρχονται από τα καρκινικά κύτταρα που έχουν προσαρμοστεί στην ανάπτυξη έξω από το μικροπεριβάλλον του φυσικού όγκου, με αποτέλεσμα να προκαλούν γενετικές αλλαγές που είναι διακριτές από το γενετικό στρες που επιβλήθηκε σε όγκους ασθενών (Daniel et al., 2009). Ομοίως, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι υπάρχει μεγαλύτερη γενετική απόκλιση μεταξύ ενός πρωτογενούς όγκου και της αντίστοιχης κυτταρικής σειράς που προέρχεται από αυτόν τον όγκο, σε σχέση με ένα άμεσο ξενομόσχευμα, ακόμα και μετά από αρκετές γενεές. Έτσι, αν και η ικανότητα για την επιτυχή χειρουργική εμφύτευση όγκων που προέρχονται από ασθενείς με καρκίνο έχει καθιερωθεί εδώ και δεκαετίες, τα προκλινικά μοντέλα μόλις τώρα χαρακτηρίζονται

απαρέγκλιτα και εφαρμόζονται για την ανάπτυξη φαρμάκων στην ογκολογία (Giovannella et al.,1989).

Οι ερευνητές έχουν μελετήσει εργαστηριακά ποντίκια ως μοντέλα καρκίνου στον άνθρωπο για έναν αιώνα, πολύ πριν από την απόδειξη ότι το DNA είναι το μόριο της κληρονομικότητας ή πως το DNA οργανώνεται σε διακριτά γονίδια. Το 1907, ένας προπτυχιακός φοιτητής του Χάρβαρντ, ο Clarence T. Little, ο οποίος συνεργάστηκε με τον William Castle, μελετούσε το χρώμα του τριχώματος των ποντικών, και ανακάλυψε ότι η κληρονομικότητα του χρώματος δεν ακολουθείται από τους κανόνες του Mendel. Η εμπειρία του με αυτό το ερευνητικό ενδιαφέρον τον οδήγησε να αναπτύξει ένα είδος μοντέλου ποντικού που ονομάζεται αμιγές στέλεχος για το έργο του. Στη διάρκεια των μεταπτυχιακών του ερευνών, μελέτησε τη γενετική προδιάθεση του καρκίνου και της αντίστασης, και έδειξε ότι οι συγγενείς ποντικοί ήταν το κλειδί για την κατανόηση της ανοσολογίας του μεταμοσχευμένου όγκου. Οι σημερινοί ερευνητές έχουν επωφεληθεί τα μέγιστα από πρωτοπόρους όπως ο Clarence Little, ο οποίος ήταν και ο ιδρυτής του The Jackson Laboratory, ένα διεθνούς φήμης κέντρο για την έρευνα στον τομέα της γενετικής των θηλαστικών.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Οι ερευνητές της ιατρικής χρησιμοποιούν τα ποντίκια για πολλούς λόγους. Τα ποντίκια είναι μικρά, απαιτούν λίγη τροφή ή χώρο στέγασης, έχουν συνεπή εκδηλώσεις της νόσου, έχουν γέννες με πολλούς απογόνους, έχουν βραχύ χρόνο παραγωγής και επιτάχυνση ζωής (ένα έτος ποντικού ισούται με περίπου 30 ανθρώπινα χρόνια), διατηρώντας το κόστος, τον χώρο και το χρόνο που απαιτείται έτσι ώστε η έρευνα να είναι διαχειρίσιμη, είναι εύκολα στο χειρισμό, και μπορούν να μεταφερθούν εύκολα από εγκαταστάσεις εκτροφής σε περιοχές για έρευνα. Η χρήση τους ως μοντέλα καρκίνου έχει παράσχει εξαιρετική διορατικότητα στη βιολογία των ανθρώπινων καρκίνων, και, πιο πρόσφατα, στη γενετική τους.

Ακόμη ένας σημαντικός λόγος στη χρήση των ποντικών είναι η ομοιότητα της γενετικής του ποντικού με αυτή του ανθρώπου. Το ποντίκι ήταν το πρώτο θηλαστικό του οποίου το γονιδίωμα αλληλουχήθηκε όταν η αλληλουχία του

ανθρώπινου γονιδιώματος είχε σχεδόν ολοκληρωθεί. Η αλληλουχία του γονιδιώματος των ποντικών και πολλών άλλων θηλαστικών αποκαλύπτει την έκταση της γονιδιωματικής ομοιότητας των διασταυρούμενων ειδών. Αυτό αύξησε σημαντικά την αξία των ζωικών μοντέλων για την έρευνα για τον καρκίνο και πολλών άλλων ανθρώπινων διαταραχών.

Η μακρά ιστορία της έρευνας του ποντικίου, με την ενίσχυση υποδομών, επέτρεψε πολλές μεθόδους, τις στρατηγικές, τις τεχνικές, τα στοιχεία και τους πόρους του αντιδραστηρίου που θα καθοριστούν. Αυτές περιλαμβάνουν:

- Γενετικά μοντέλα ποντικών (GEM)
- Συγγενείς ποντικοί
- Μοντέλα μεταμόσχευσης
- Προκαλούμενη καρκινογένεση σε μοντέλα ζώων,

τα οποία χρησιμοποιούνται με διάφορους τρόπους για τη διερεύνηση των βιοϊατρικών χαρακτηριστικών του καρκίνου του σήμερα. Υπάρχουν πλεονεκτήματα και προκλήσεις για οποιοδήποτε δεδομένο σύστημα (<http://emice.nci.nih.gov/aam/mouse/how-and-why-mouse-cancer-models-are-used>).

ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα συστήματα μοντέλων για τη μελέτη των καρκίνων είναι το ποντίκι. Δεκαετίες αναπαραγωγής για την ανάπτυξη και τον εντοπισμό χαρακτηριστικών στελεχών, σε συνδυασμό με τις πιο πρόσφατες τεχνολογικές ανακαλύψεις για να αλλάξει η δομή του γονιδιώματος ή μεμονωμένα γονίδια, θα επιτρέψει στους ερευνητές να στοχεύουν ακριβώς γονίδια και τα μονοπάτια του ενδιαφέροντος για την έρευνα.

Για παράδειγμα, μία από τις πρώτες εφαρμογές των γενετικών τροποποιήσεων στα ποντίκια ήταν η δημιουργία ογκοποντικών που προορίζονται να αναπτύξουν καρκίνο. Δείχθηκε πρώτα ότι η εισαγωγή και έκφραση των ογκογονιδίων σε φυσιολογικούς ιστούς ξεκίνησε την ανάπτυξη του όγκου. Αργότερα, η δημιουργία knockout ποντικών που στερούνται ογκοκατασταλτικών γονιδίων έδειξαν επίσης ότι αναπτύχθηκε ο καρκίνος. Οι στρατηγικές αυτές εδραίωσαν τους ποντικούς ως μέσο για τη δημιουργία ενός

μοντέλου συστήματος για τη μελέτη του καρκίνου, και επόμενες γενεές ποντικών, την τεχνολογία, και οι επιστήμονες συνεχίζουν να σημειώνουν πρόοδο στην κατανόηση των μηχανισμών του καρκίνου (<http://emice.nci.nih.gov/generating-models/mouse-cancer-models-1>).

Μεταμοσχεύσεις κυττάρων ή ιστών παρέχουν επίσης ένα μέσο για την κατανόηση της βιολογίας των όγκων, και θα παρέχουν για δεκαετίες. Πρόωρη χρήση αυτών των τύπων των μοντέλων σε ποντίκια που επιδιώκεται από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου σε πρωτοποριακή έρευνα που περιλαμβάνουν 60 είδη μεταμοσχεύσεων όγκων. Όταν προσδιορισθεί ότι η μεταμόσχευση ανθρώπινων όγκων σε διάφορους ανοσοκατασταλμένους ποντικούς (τεχνικές ξενομοσχεύματος) θα μπορεί να είναι πολύτιμη και αποτελεσματική, πολλές έρευνες θα διερευνηθούν προς αυτό το μονοπάτι. Οι ερευνητές χρησιμοποιούν επίσης καθορισμένους όγκους ποντικών σε μοντέλα ποντικών, καθώς επίσης και μερικές φορές όγκους άλλων ειδών.

Πολλά στελέχη συγγενών ποντικών είναι επίσης διαθέσιμα για τη μελέτη της βιολογίας του καρκίνου. Ορισμένα στελέχη έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να αναπτύξουν καρκίνους χαρακτηριστικούς σε ορισμένους ιστούς ή στάδια, ενώ άλλα έχουν χρησιμοποιηθεί ως ένα καθορισμένο υπόβαθρο για την έκθεση σε καρκινογόνους παράγοντες.

Πολλά υπάρχοντα μοντέλα θα μπορούσαν να παρέχουν ένα κατάλληλο θεμέλιο για τη μελέτη εμφάνισης καρκίνου, πτυχές της βιολογίας των όγκων, ή θεραπευτικές παρεμβάσεις.

Για την κατανόηση της προόδου στη χρήση των εξανθρωπισμένων ποντικών είναι απαραίτητο να αναγνωρήσουμε την ποικιλία και την πολυπλοκότητα των μοντέλων που θα χρησιμοποιηθούν για συγκεκριμένη μελέτη ώστε να ερμηνευθούν σωστά αποτελέσματα. Υπάρχουν πολλά στελέχη ανοσοκατεσταλμένων ποντικών με μεταλλαγή στο γονίδιο της ιντερλευκίνης 2 που έχουν αναπτυχθεί. Κάθε ένα μοντέλο θα πρέπει να είναι κατάλληλο και καινοτόμο για κάθε μελέτη έτσι ώστε να παρέχει έγκυρα δεδομένα που μπορούν να ερμηνευθούν με τη χρήση των επιμέρους μοντέλων.

ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

NUDE ποντικοί

Ένα ποντίκι NUDE είναι ένα εργαστηριακό ποντίκι προερχόμενο από ένα στέλεχος που φέρει μια γενετική μετάλλαξη η οποία προκαλεί δυσλειτουργία ή απουσία θύμου αδένου, με αποτέλεσμα την αναστολή του ανοσοποιητικού συστήματος που οφείλεται στη μεγάλη μείωση των Τ κυττάρων. Ο φαινότυπος είναι η έλλειψη τριχών του σώματος, η οποία του δίνει και το όνομα NUDE (γυμνό). Αυτός ο ποντικός είναι πολύτιμος για την έρευνα, διότι μπορεί να λάβει πολλά διαφορετικά είδη ιστών και μοσχεύματα όγκου, καθώς μεταμοσχεύονται χωρίς καμία απάντηση απόρριψης. Αυτά τα ξενομοσχεύματα χρησιμοποιούνται συνήθως στον τομέα της έρευνας για τη δοκιμή νέων μεθόδων απεικόνισης και για την θεραπεία των όγκων. Η γενετική βάση της μετάλλαξης ενός ποντικού NUDE είναι μια διαταραχή του γονιδίου FOXN1.

ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Η ονοματολογία των NUDE ποντικών έχει αλλάξει πολλές φορές από την ανακάλυψή τους. Αρχικά είχαν περιγραφεί ως nu, αργότερα ενημερώθηκε σε Hfh11nu όταν αναγνωρίστηκε το μεταλλαγμένο γονίδιο ως μια μετάλλαξη στο HNF-3/forkhead ομόλογο γονίδιο 11. Στη συνέχεια, το 2000, το γονίδιο που ευθύνεται για τη μετάλλαξη αναγνωρίστηκε ως μέλος της οικογένειας γονιδίων FOX και η ονοματολογία ενημερώθηκε σε FOXN1nu.

ΙΣΤΟΡΙΑ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ

Οι NUDE ποντικοί ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά το 1962 από τον Dr NR Grist στο εργαστήριο ιολογίας του νοσοκομείου Ruchill Brownlee στη Γλασκόβη. Λόγω του ότι στερούνται θύμο αδένου δεν μπορούν να δημιουργήσουν ώριμα Τ λεμφοκύτταρα. Ως εκ τούτου, δεν είναι σε θέση να δεχτούν τους περισσότερους τύπους ανοσοαποκρίσεων συμπεριλαμβανομένων :

1. Σχηματισμός αντισωμάτων που απαιτεί CD4+ των βοηθητικών Τ κυττάρων
2. Μεσολάβηση κυττάρων ανοσολογικής απόκρισης, οι οποίες απαιτούν CD4+ κύτταρα ή και CD8+ Τ κύτταρα

3. Αποκρίσεις υπερευαισθησίας καθυστερημένου τύπου (απαιτούν CD4+ T κύτταρα)
4. Καταστροφή του μολυσματικού ιού ή κακοηθών κυττάρων (απαιτεί CD8+ κυτταροτοξικά T κύτταρα)
5. Απόρριψη μοσχεύατος (απαιτεί τόσο CD4+ και CD8+ T κύτταρα).

Λόγω των παραπάνω χαρακτηριστικών οι NUDE ποντικοί εξυπηρετούν το εργαστήριο στην απόκτηση γνώσεων σχετικά με το ανοσοποιητικό σύστημα, τη λευχαιμία, τους συμπαγείς όγκους, το AIDS και άλλες μορφές ανοσολογικής ανεπάρκειας καθώς και τη λέπρα. Επιπρόσθετα, η έλλειψη λειτουργικών T κυττάρων εμποδίζει την απόρριψη όχι μόνο μοσχευμάτων αλλά και ξеноμοσχευμάτων, δηλαδή μοσχεύματα ιστού από άλλο είδος. Τα περισσότερα στελέχη αυτών των ποντικών αποκτούν μερικά T κύτταρα καθώς γερνούν, για το λόγω αυτό είναι λιγότερο δημοφιλή δεδομένου ότι έχουν κατασκευαστεί knock-out ποντικοί με μεγαλύτερη ανοσοανεπάρκεια (π.χ RAG1 και RAG2).

ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Οι NUDE ποντικοί έχουν μια αυθόρμητη απαλοιφή στο γονίδιο FOXP1 (οι άνθρωποι με μεταλλάξεις σ' αυτό το γονίδιο είναι επίσης αθυμικοί και ανοσοκατεσταλμένοι). Τα θηλυκά έχουν υποανάπτυκτους μαστικούς αδένες και δεν είναι σε θέση να θηλάσουν αποτελεσματικά τα μικρά τους, τα αρσενικά εκτρέφονται με ετερόζυγα θηλυκά.

ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ

Η διάρκεια ζωής τους είναι συνήθως από 6 μήνες έως 1 έτος. Σε ελεγχόμενες συνθήκες, αντιμικροβιακό περιβάλλον και με αντιβιοτικές θεραπείες βρέθηκε ότι μπορούν να ζούν όσο και τα κανονικά ποντίκια (18 μήνες έως 2 έτη).

SCID ποντικοί

Τα ποντίκια SCID χρησιμοποιούνται συνήθως ως μοντέλα οργανισμού για την έρευνα στην βασική βιολογία του ανοσοποιητικού συστήματος, τις

στρατηγικές μεταμόσχευσης κυττάρων, και τις επιπτώσεις των ασθενιών στα θηλαστικά. Έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως ξενιστές για την μεταμοσχεύση κανονικών και κακοηθών ιστών. Επιπλέον, αυτά είναι χρήσιμα για τη δοκιμή της ασφάλειας των νέων εμβολίων ή θεραπευτικών παραγόντων σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα.

Η κατάσταση αυτή οφείλεται σε μια σπάνια εκφυλιστική μετάλλαξη στο χρωμόσωμα 16 υπεύθυνο για την ανεπάρκεια δραστηριότητας ενός ενζύμου που εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA (Prkdc ή πρωτεΐνη κινάση). Επειδή V (D) J ανασυνδυασμό δεν συμβαίνουν, τα χυμικά και κυτταρικά ανοσολογικά συστήματα αποτυγχάνουν να ωριμάσουν. Τα SCID ποντίκια, ως εκ τούτου, παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα να παράγουν λεμφοκύτταρα T ή B, ή να ενεργοποιήσουν ορισμένες συνιστώσες του συστήματος του συμπληρώματος, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να δράσει αποτελεσματικά ενάντια στις λοιμώξεις, να απορρίψει τους όγκους και τις μεταμοσχεύσεις.

Διασταυρώνοντας SCID ποντικούς με ποντίκια που φέρουν μεταλλάξεις σε συναφή γονίδια, όπως η ιντερλευκίνη-2R gamma, μπορούν να δημιουργηθούν πιο αποτελεσματικά ανοσοκατεσταλμένα στελέχη για την ενίσχυση της περαιτέρω έρευνας. Ο βαθμός στον οποίο οι διάφορες συνιστώσες του ανοσοποιητικού συστήματος βρίσκονται σε κίνδυνο ποικίλλει ανάλογα με το τι άλλες μεταλλάξεις φέρουν οι ποντικοί μαζί με την SCID μετάλλαξη (Ito et al., 2002).

Για την κατανόηση της προόδου στη χρήση των εξανθρωπισμένων ποντικών είναι απαραίτητο να αναγνωρήσουμε την ποικιλία και την πολυπλοκότητα των μοντέλων που θα χρησιμοποιηθούν για συγκεκριμένη μελέτη ώστε να ερμηνευθούν σωστά αποτελέσματα. Υπάρχουν πολλά στελέχη ανοσοκατεσταλμένων ποντικών με μεταλλαγή στο γονίδιο της ιντερλευκίνης 2 που έχουν αναπτυχθεί. Κάθε ένα μοντέλο θα πρέπει να είναι κατάλληλο και καινοτόμο για κάθε μελέτη έτσι ώστε να παρέχει έγκυρα δεδομένα που μπορούν να ερμηνευθούν με τη χρήση των επιμέρους μοντέλων.

ΕΙΔΗ ΑΝΟΣΟΚΑΤΕΣΤΑΛΜΕΝΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ	ΚΟΙΝΗ ΣΥΝΤΜΗΣΗ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
NOD.Cg-Prkdc ^{scid} IL2rg ^{tm1wjf}	NSG	Στοχευμένη μετάλλαξη με πλήρη απενεργοποίηση της IL2rg, δεν εκφράζουν και δεν δεσμεύουν κυτοκίνες.
NOD.Cg-Prkdc ^{scid} IL2rg ^{tm1sug}	NOG	Στερείται την ενδοπλασματική περιοχή της αλυσίδας της IL2rg. Έκφραση και δέσμευση κυτοκινών, χωρίς σήμανση.
C ₁₂₉ S ₄ -Rag ₂ ^{tm1.1flu}	BRG	BALB/C ₁₂₉ Rag ₂ ^{null} πλήρως απενεργοποιημένη IL2, δεν δεσμεύει και δεν εκφράζει κυτοκίνες.

Τα πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι αυτά τα μοντέλα διαφέρουν στην ικανότητα υποστήριξης του μεταμοσχευμένου ανθρώπινου λειτουργικού ανοσοποιητικού συστήματος. Για παράδειγμα, τα NSG υποστηρίζουν σε μεγαλύτερο βαθμό τη μεταμόσχευση των ανθρώπινων αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και την ανάπτυξη των Τ κυττάρων σε σχέση με τα BRG (Brehm et al., 2010). Τα NSG υποστηρίζουν καλύτερα την εμφύτευση των ανθρώπινων αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων στο μυελό των οστών σε σχέση με τα NOG (McDermott et al., 2010). Η επιλογή του συγκεκριμένου στελέχους θα επηρεάσει τα επίπεδα εμφύτευσης του μεταμοσχευμένου ανθρώπινου αιμοποιητικού και ανοσοποιητικού συστήματος, τα είδη των κυττάρων που μπορούν επιτυχώς να μεταμοσχευθούν και τις λειτουργικές δυνατότητες των ειδικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος.

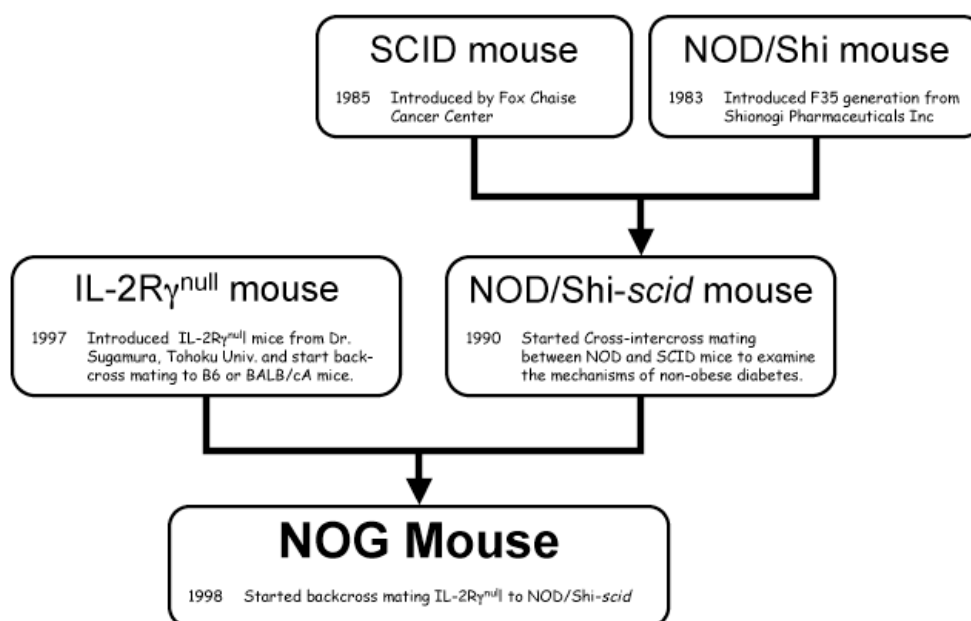
NOG ποντικοί

Ένας ποντικός NOG (NOD/Shi-scid/IL-2Rg^{null}) είναι μια νέα γενιά σοβαρά ανοσοανεπαρκούς ποντικού, που αναπτύχθηκε από το CIEA το 2000. Οι NOG ποντικοί δέχονται ετερόλογα κύτταρα πολύ πιο εύκολα σε σύγκριση με οποιοδήποτε άλλο τύπο μοντέλου ανοσοανεπαρκών ποντικών όπως, τα ποντίκια nude και NOD/scid. Έτσι, τα ποντίκια μπορούν και αποτελούν το καλύτερο μοντέλο ως ένας εξαιρετικά αποτελεσματικός αποδέκτης ανθρώπινων κυττάρων για εμφύτευση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση (Ito et al., 2002). Αυτό το μοναδικό χαρακτηριστικό προσφέρει μια μεγάλη ευκαιρία για την ενίσχυση στις έρευνες για τη θεραπεία του καρκίνου, της λευχαιμίας, σε ασθένειες των σπλάχνων, το AIDS και άλλες ανθρώπινες ασθένειες. Προβλέπει επίσης εφαρμογές για τον καρκίνο, τη μόλυνση, την αναγέννηση και έρευνες πάνω στην αιματολογία.

ΚΑΤΑΓΩΓΗ

Ο NOG ποντικός δημιουργήθηκε στην CIEA το 2000, από back-cross ζευγάρι του C57BL/6J- IL-2Rg^{null} ποντικού που αναπτύχθηκε αρχικά από τον Kazuo Sugamura, καθηγητή του Tohoku University, στο NOD/Shi-scid που αναπτύχθηκε στην CIEA.

Origin of NOG mouse



ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

- Καμία δραστηριότητα Τ-κυττάρων, Β-κυττάρων και ΝΚ κυττάρων
- Μειωμένες συμπληρωματικές δραστηριότητες
- Δυσλειτουργία μακροφάγων
- Δυσλειτουργία δενδριτικών κυττάρων
- Καμία διαρροή: καμία συχνότητα εμφάνισης Τ και Β κυττάρων με τη γύραση
- Καμία συχνότητα εμφάνισης λεμφώματος

Ο ποντικός NOG έχει πολλαπλές ανοσοανεπάρκειες που προέρχονται κυρίως από 3 στελέχη ποντικών: 1) NOD/Shi όμοιο στέλεχος, 2) SCID, 3) IL-2Rg^{null}.

Αυτές περιλαμβάνουν:

- Μειωμένη έμφυτη ανοσία που προέρχεται από ένα αμιγές στέλεχος NOD, το οποίο περιλαμβάνει μια δυσλειτουργία των μακροφάγων, έλλειψη συμπληρώματος με αιμολυτική δράση και μειωμένη δραστηριότητα ΝΚ κυττάρων (Shultz et al., 1995). Το αμιγές στέλεχος NOD/Shi, ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από

τον Makino et al ως αυτοάνοσο σε μη παχύσαρκο τύπο διαβητικών ποντικών (Kikutani et al., 1992; Makino et al., 1980).

- Έλλειψη λειτουργικών T και B κυττάρων προερχόμενη από μια μετάλλαξη της πρωτεϊνικής κινάσης (Prkdc: πρωτεϊνική κινάση, ενεργοποιημένο DNA, καταλυτικό πολυπρωτεΐδιο), το οποίο είναι το αιτιολογικό γονίδιο της scid μετάλλαξης (Bosma et al., 1983; Kirchgessner et al., 1995).
- Έλλειψη NK κυττάρων, δυσλειτουργία δενδριτικών κυττάρων και άλλες άγνωστες ανεπάρκειες λόγω της αδρανοποίησης του γονιδίου IL-2Rg (Ikebe et al., 1997).

NSG ποντικοί

Τα NSG ή NOD SCID γάμμα (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ), είναι ένα στέλεχος καθαρών εργαστηριακών ποντικών, που παρουσιάζουν την μεγαλύτερη ανοσοανεπάρκεια μέχρι σήμερα, (Shultz et al., 2007). Οι NSG ποντικοί στερούνται ώριμων T κυττάρων, B κυττάρων, και NK κυττάρων, (Shultz et al., 2005). Οι NSG ποντικοί παρουσιάζουν επίσης ανεπάρκεια σε πολλαπλές οδούς σηματοδότησης κυτοκίνης με αποτέλεσμα να έχουν πολλά ελαττώματα στην έμφυτη ανοσία (Shultz et al., 2005,1995). Η σύνθετη ανοσοανεπάρκεια στους ποντικούς NSG επιτρέπει την εμφύτευση ενός ευρέως φάσματος πρωτογενών ανθρώπινων κυττάρων. Τα ποντίκια NSG αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο του Dr Leonard Shultz στο The Jackson Laboratory.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το γενετικό υπόβαθρο , που προέρχεται από αμιγές στέλεχος ποντικού NOD / ShiLtJ , συμβάλλει στη μείωση της έμφυτης ανοσίας που περιλαμβάνει την απουσία δράσης του συστήματος συμπληρώματος, την μειωμένη λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων, και την ελαττωματική δραστηριότητα των μακροφάγων (Shultz et al.,1995). Το υπόβαθρο NOD / ShiLtJ συμβάλλει επίσης στο ένα αλληλίο του Sipra γονιδίου που καθιστά το μυελό των οστών πολύ ανεκτικό στον αποικισμό από ανθρώπινα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα.

Η μετάλλαξη Prkdc^{scid}, κοινώς γνωστή ως «SCID» ή «σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια», ουσιαστικά εξαλείφει την προσαρμοστική ανοσία (Greiner et al., 1998). Η Prkdc^{scid} είναι μία μετάλλαξη με απώλεια λειτουργίας στον ποντικό, ομόλογο με το ανθρώπινο γονίδιο PRKDC, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που επιδιορθώνει τα σπασίματα στον κλώνο του DNA που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του V (D) J ανασυνδυασμού κατά την ανάπτυξη των T και B λεμφοκυττάρων. Ποντίκια ομόζυγα για την μετάλλαξη έχουν σημαντικά μειωμένο αριθμό των ώριμων T και B κυττάρων (Shultz et al., 1995; Greiner et al., 1998). Η φαινοτυπική διεισδυτικότητα Prkdc^{scid} ποικίλλει ανάλογα με το υπόβαθρο των καθαρών στελέχων, αλλά η μετάλλαξη είναι πιο αποτελεσματική στην εξάλειψη της προσαρμοστικής ανοσίας στο γενετικό υπόβαθρο των NOD ποντικών (Shultz et al., 1995).

Η στοχευμένη μετάλλαξη IL2rgtm1Wjl είναι μια πλήρης μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την αλυσίδα της ιντερλευκίνης 2 του γάμμα υποδοχέα (IL2Rγ, ομόλογη προς IL2RG σε ανθρώπους) (Cao et al., 1995). Ο IL2Rγ είναι ένα κοινό συστατικό της επιφάνειας των υποδοχέων των κυττάρων που δεσμεύουν και μετάγουν σήματα από έξι διακριτές ιντερλευκίνες. Η σηματοδότηση μέσω IL2Rγ απαιτείται για την διαφοροποίηση και την λειτουργία πολλών αιμοποιητικών κυττάρων. Κυρίως, η απουσία της IL2Rγ εμποδίζει την κυτταρική διαφοροποίηση των NK, και με τον τρόπο αυτό απομακρύνει ένα σημαντικό εμπόδιο προλαμβάνοντας την αποτελεσματική εμφύτευση πρωτογενών ανθρώπινων κυττάρων (Shultz et al., 2005; Greiner et al., 1998). Τα NSG ποντίκια είναι βίσιμα, γόνιμα, κανονικά σε μέγεθος και δεν παρουσιάζουν ανωμαλίες συμπεριφοράς. Η ιστολογική εξέταση των λεμφοειδών ιστών αποκαλύπτει απουσία λεμφοειδών κυττάρων και ορισμένες κυστικές δομές στον θύμο αδένα καθώς επίσης, απουσία ωοθυλακίων στον σπλήνα και αξιωσμημεία μειωμένη κυτταροβρίθεια των λεμφαδένων. Αυτού του είδους οι ποντικοί, έχουν δείξει ότι υποστηρίζουν άμεσα τη μεταμόσχευση ανθρώπινων αιμοποιητικών CD34+ βλαστοκυττάρων και αντιπροσωπεύουν ένα ανώτερο και μακροβιότερο μοντέλο, κατάλληλο για μελέτες που χρησιμοποιούν στρατηγικές ξενομοσχεύματος.

ΚΑΤΑΓΩΓΗ

Αυτά τα διπλά μεταλλαγμένα ποντίκια έχουν παραχθεί από την αναπαραγωγή των θηλυκών NOD.CB17-Prkdcscid/J ποντικών, με αρσενικά ποντίκια που φέρουν το X συνδεδεμένο αλληλόμορφο B6.129S4-IL2rgtm1wjl/J. Τα προκύπτοντα ετεροζυγωτικά αρσενικά ποντίκια για το αλληλόμορφο Prkdcscid και ημιζυγωτικά για το αλληλόμορφο IL2rgtm1wjl διασταυρώθηκαν σε θηλυκά NOD.CB17-Prkdcscid/K για 8 γενιές. Οι ετεροζυγώτες διασταυρώθηκαν ώστε να παραχθούν ομόζυγα ποντίκια για το αλληλόμορφο Prkdcscid και θηλυκά ομόζυγα ή αρσενικά ημίζυγα για το αλληλόμορφο IL2rgtm1wjl (<http://jaxmice.jax.org/strain/005557.html>)

Αυτού του είδους ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια έχουν ποικίλες εφαρμογές στην έρευνα για την ανοσοποίηση, την αιμοποίηση, τον διαβήτη τύπου 1 και τον καρκίνο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

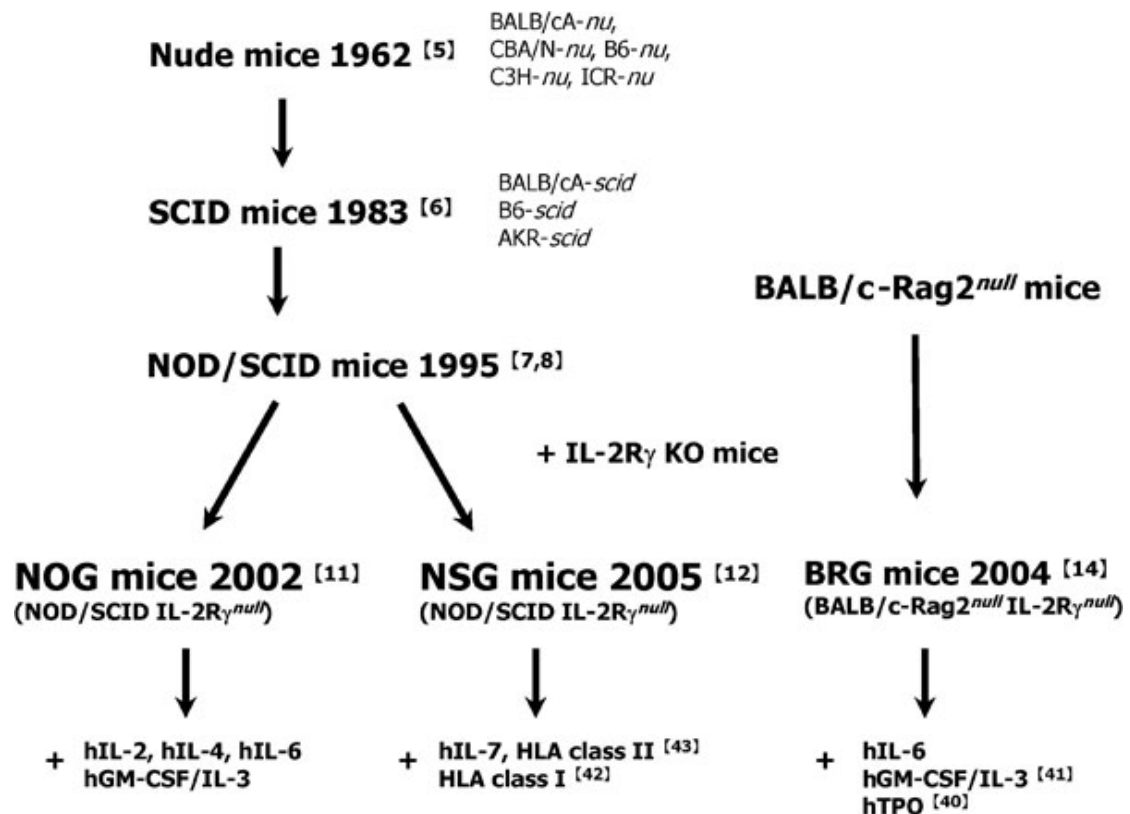
ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗ

Το πιο ελκυστικό χαρακτηριστικό αυτών των ανθρωποποιημένων ποντικών είναι η ανάπτυξη πολλαπλών αιμοποιητικών κυττάρων σειρών από μεταμόσχευση ανθρώπινων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Ειδικότερα, υποπληθυσμοί T-κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των CD4 και CD8 ενιαία θετικών κυττάρων, τα οποία δεν θα μπορούσαν να διαφοροποιηθούν σε NOD / SCID ποντίκια, αναπτύχθηκαν με επιτυχία σε αυτά τα ποντίκια (Traggiai et al., 2004; Hiramatsu et al., 2003; Ishikawa et al., 2005). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν τη χρησιμότητα των εξανθρωπισμένων ποντικών για τη διερεύνηση των απαντήσεων του ανθρώπινου ανοσοποιητικού. Πράγματι, η χρησιμότητα αυτών των εξανθρωπισμένων ποντικών είναι καλά αποδεκτή από τους ερευνητές σε όλο τον κόσμο. Ωστόσο, αυτά τα εξανθρωπισμένα ποντίκια είναι ανεπαρκή, δεδομένου ότι τα ανθρώπινα κύτταρα δεν είναι πλήρως λειτουργικά. Για παράδειγμα, η παραγωγή αντιγόνο-ειδικών IgG συντελείται μετά από πολλαπλές ενέσεις των αντιγόνων (Watanabe et al., 2009).

Για να ξεπεραστεί αυτό το ζήτημα, διάφορα βελτιωμένα στελέχη που βασίζονται σε αυτά τα ανοσοανεπαρκή ποντίκια έχουν αναπτυχθεί ή αναπτύσσονται από διάφορες ομάδες (Okada et al., 2008; Sato et al., 2010).

Αυτά τα ποντίκια έχουν συσταθεί σε NOG / NSG ή BRG υπόβαθρα. Η επιλογή του στελέχους είναι ζωτικής σημασίας για τη βελτίωση των ανοσοανεπαρκών ποντικών. Πρόσφατα δημιουργήθηκαν ποντίκια hGM-CSF/IL-3 Tg NOG από τη μετατροπή του στελέχους B6 NOG από επαναδιασταύρωση. Υψηλά ποσοστά εμφύτευσης ανθρώπινων κυττάρων παρατηρήθηκαν σε ποντίκια hGM-CSF/IL-3 Tg NOG. Επίσης, σε σύγκριση με μεταμόσχευση HSCs στα NOG, BRG και B6RG ποντίκια. Ανώτατα ποσοστά εμφύτευσης ελήφθησαν σε NOG και BRG, αλλά όχι σε B6RG ποντικούς. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν (Traggiai et al., 2004), υποδεικνύοντας ότι ανοσοανεπαρκείς ποντικοί σε ένα υπόβαθρο B6 δεν επαρκούν για την παραγωγή εξανθρωπισμένων ποντικών. Πρόσφατες εκθέσεις σχετικά με τη σηματοδοτική ρυθμιστική πρωτεΐνη (Sirpa) προτείνεται ότι τα ποντίκια NOD είναι ανώτερα από άλλα στελέχη, επειδή Sirpa σε στελέχη NOD είναι περισσότερο παρόμοια με εκείνη σε ανθρώπους, σε σύγκριση με Sirpa σε άλλα στελέχη ποντικών (Takenaka et al., 2007; Takizawa et al., 2007). Ως εκ τούτου, BRG διαγονιδιακά ποντίκια με ανθρώπινο Sirpa έχουν δημιουργηθεί για να ενισχυθεί αποτελεσματικότητα της μεταμόσχευσης ανθρώπινων κυττάρων (Willinger et al., 2011).

Βελτιωμένα στελέχη που παράγονται από την έγχυση ανθρώπινου DNA σε έμβρυα προπυρηνικού σταδίου, την έγχυση γενετικά τροποποιημένων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε βλαστοκύστες (knock-in (KI)), ή να εισάγουν τα ανθρώπινα γονίδια με επαναδιασταύρωση με τα καθιερωμένα διαγονιδιακά ποντίκια. Διαφοροποίηση συγκεκριμένα, ανθρώπινων κυττάρων από HSCs στη βελτίωση ποντικών παράγονται με τη χρήση της στρατηγικής KI έχει αναλυθεί από την ομάδα Flavell του πανεπιστημίου Yale (Willinger et al., 2011). Αναπτύχθηκαν επίσης διαγονιδιακά ποντίκια NOG που εκκρίνουν ανθρώπινη IL-2 ή IL-4, με την έγχυση DNA σε έμβρυα NOG. Η καταστολή του μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GVHD) και η κυρίαρχη μετατροπή σε Th2 κύτταρα σε ποντίκια hIL-4 Tb NOG και η αξιοσημείωτη διαφοροποίηση των ανθρώπινων κυττάρων NK σε ποντικούς hIL-2 Tb NOG, αντίστοιχα, παρατηρήθηκαν. Αντιγόνο-ειδικής IgG παράχθηκε σε HLA τάξης II διαγονιδιακά NSG ποντίκια (Danner et al., 2011).



Η ιστορία της ανάπτυξης από ανοσοανεπαρκή ποντίκια σε εξανθρωπησμένα μοντέλα ποντικών. Ποντίκια *Nude* ή ποντίκια *SCID* ήταν τα πρώτα στελέχη με ανοσοανεπάρκεια. Στη συνέχεια, συγγενή στελέχη τους δημιουργήθηκαν για να βελτιώσουν τις ικανότητες της μεταμόσχευσης. Τα *NOD / SCID* ποντίκια που δημιουργήθηκαν το 1995 ήταν ένα ορόσημο στον τομέα αυτό, λόγω του αυστηρότερου φαινοτύπου από ό, τι των *Nude* και *SCID* ποντικών. Στις αρχές της δεκαετίας του 2000, τα *NOG*, *NSG* και *BRG* ποντίκια δημιουργήθηκαν με την εισαγωγή του αλληλόμορφου *IL-2Rγ^{null}* σε *NOD / SCID* ή *BALB / cA RAG2^{null}* ποντίκια. Λόγω της πλήρους απώλειας του ανοσοποιητικού συστήματος του ποντικού, η ανθρώπινη αιματοποίηση υπήρξε πολύ αυξημένη σε αυτά τα ποντίκια. Επί του παρόντος, αυτά τα στελέχη βελτιώθηκαν περαιτέρω με την εισαγωγή ανθρώπινων γονιδίων για διάφορες κυτοκίνες ή *HLA* τάξης *I* και *II*, ούτως ώστε να ανακεφαλαιώσουμε την ανθρώπινη αιματοποίηση και το ανοσοποιητικό σύστημα. Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις αντίστοιχες αναφορές. *BRG*, *BALB/cA-Rag2^{null}Il2rg^{null}*, *HLA*, το αντιγόνο ιστοσυμβατότητας λευκοκυττάρων, *NOD*, μη παχύσαρκους διαβητικούς *NSG*, *NOD / LtSz-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl / J SCID*, σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια.

1.1 ΠΑΛΙΑ ΚΑΙ ΝΕΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΕΞΑΝΘΡΩΠΙΣΜΕΝΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Μια ποικιλία από εξανθρωπισμένα ποντίκια απασχολούνται αυτή τη στιγμή στον τομέα της έρευνας του ιού με βάση στην έρευνα πάνω στην συγκεκριμένη παθογόνο δράση, τις πειραματικές ανάγκες και την ευκολία της παρασκευής (Berges and Rowan, 2011; Nischang et al., 2012). Σε διαφορετικά στελέχη ποντικού με ανοσοανεπάρκεια έχουν μεταμοσχευτεί τα διάφορα ανθρώπινα κύτταρα και ιστοί, το καθένα με τα δικά του πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Μια σημαντική εξέλιξη με τα νέα μοντέλα hu-ποντικών πάνω από τις παλαιότερες εκδόσεις είναι η ικανότητά τους για παραγωγή πρωτογενούς απάντησης ανθρώπινου ανοσοποιητικού. Μία ευρεία περιγραφή των μοντέλων αυτών παρέχεται παρακάτω.

hu-PBL mice

Αυτά δημιουργούνται από ανασύσταση με ανθρώπινα ώριμα μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) από την ενδοπεριτοναϊκή οδό σε ποντικούς SCID (Mosier, 2000). Οι τρέχουσες εκδόσεις χρησιμοποιούν είτε NSG ή RG ποντίκια, χάρη στην πιο αποτελεσματική εμφύτευση. Η παθητική μεταφορά ανθρώπινων ανοσοκυττάρων συνεχίζεται για αρκετές εβδομάδες και είναι ικανά να τελούν λειτουργίες σε έναν ορισμένο βαθμό. Μπορούν να έχουν μολυνθεί με αιμοποιητικά κύτταρα τροπικών ιών όπως ο HIV-1. Τα ανθρώπινα κύτταρα μνήμης B συνεχίζουν να παράγουν αντισώματα από προηγούμενη έκθεση του αντιγόνου. Ωστόσο, δεν υπάρχει καμία *de novo* ανθρώπινη αιματοποίηση, και, κατά συνέπεια, καμία πρωτογενή ανοσολογική απόκριση. Νόσος μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GVHD) από τα T κύτταρα με ένεση είναι ένα μειονέκτημα. Αυτό το μοντέλο είναι κατάλληλο για τη μελέτη ξeno-GVHD (Shultz et al., 2011).

SCID-hu mice

Χειρουργική εμφύτευση ανθρώπινων θραυσμάτων εμβρυϊκού θύμου και ήπατος (που περιέχει αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα) κάτω από τη νεφρική κάψα του SCID ποντικού εκτελείται για τη δημιουργία ποντικών που φιλοξενούν ένα λειτουργικό ανθρώπινο θύμο (McCune, 1996). Υπάρχει

έντονη θυμοποίηση με παραγωγή ανθρώπινων θυμοκυττάρων και παρθένα T κύτταρα. Ωστόσο, τα ώριμα T κύτταρα περιορίζονται κυρίως στο όργανο που είναι ειδικά με κακή περιφερική κυκλοφορία. Αυτοί οι ποντικοί δεν είναι σε θέση να δημιουργήσουν μια ανθρώπινη ανοσολογική αντίδραση λόγω της έλλειψης ενός πλήρους φάσματος των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Παρ' όλα αυτά, τα μοντέλα αυτά έχουν συμβάλει στη μελέτη των βασικών πτυχών της ιογενούς παθογένειας με ιούς όπως ο HIV-1 και HTLV-1 και έθεσαν τα θεμέλια για τη δημιουργία και τη συνεχή βελτίωση των σημερινών εξανθρωπισμένων μοντέλων ποντικών (Jamieson and Zack, 1999).

hu-HSC mice

Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSC) σε μια ποικιλία από ανοσοανεπαρκείς ποντικούς από διάφορες οδούς χρησιμοποιείται για να δημιουργήσει ποντίκια hu-HSC. Το μοντέλο αυτό έχει εξελιχθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια (Legrand et al., 2009). Πρώρες εκδόσεις εμπλέκουν έγχυση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (CD34 + HSC, ονομάζονται επίσης κύτταρα SCID ανακατάληψης ή SRC) σε ενήλικα NOD-SCID από την ενδοφλέβια ή ενδομηριαία οδό. Ενώ υπάρχει de novo λεμφοποίηση, η ανάπτυξη των κυττάρων T είναι κακή. Η χρήση της νέας γενιάς IL-2 γc-/- ποντικών, όπως RG, NOG ή NSG οδήγησε σε καλύτερη μεταμόσχευση ανθρώπινων κυττάρων. Υπάρχουν επί του παρόντος δύο εκδόσεις των hu-HSC ποντικών με διαφορετικά σκευάσματα, αν και με σημαντικές διαφορές. Η πρώτη έκδοση απαιτεί ένεση HSC σε ενήλικα ακτινοβολημένα ποντίκια NSG / NOG. Μολονότι τα κύτταρα των πολλαπλών συγγενικών αιμοποιητικών σειρών που δημιουργούνται, η απόδοση των κυττάρων T είναι κακή. Η δεύτερη, βελτιωμένη έκδοση είναι ενδοηπατική ένεση HSC σε νεογέννητα RG, NSG ή NOG ποντίκια με αποτέλεσμα πολύ καλύτερο ενοφθαλμισμό ανθρώπινων κυττάρων με παραγωγή ενός πλήρους συμπληρώματος των T, B και NK κυττάρων, μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων (Berges and Rowan, 2011; Shultz et al., 2011). Μόλυνση της κάθε έκδοσης αυτών των ποντικών με διαφορετικά παθογόνα ή ανοσοποίηση με διαφορετικά αντιγόνα οδηγεί σε ανθρώπινες ανοσοαποκρίσεις (Berges et al., 2008).

BLT mice

Αυτό το μοντέλο είναι μια μικρή τροποποίηση του προγενέστερου SCID-hu μοντέλου ποντικού με μια αξιοσημείωτη βελτίωση. Το ακρωνύμιο προέρχεται από μεταμόσχευση BLT (bone marrow-liver-thymus), η κύρια διαφορά με το SCID-hu μοντέλο ποντικού είναι η πρόσθετη ανασύσταση με αυτόλογα HSC καθαρίζεται από την ίδια πηγή εμβρυϊκού ήπατος (Melkus et al., 2006). Η αρχική έκδοση BLT χρησιμοποιείται σε NOD-SCID ενώ οι νεότερες βελτιωμένες εκδόσεις χρησιμοποιούν NSG, NOG ή RG ποντίκια (Biswas et al., 2011; Stoddart et al., 2011).

hu-Liver-HSC mice

Τα ανωτέρω μοντέλα hu-ποντικών περιορίζονται στην ανθρώπινη ανοσοποιητική ανασύσταση των κυττάρων / ιστών με *de novo* παραγωγή ή τη διατήρηση των ανθρώπινων υποσυνόλων των ανοσοκυττάρων. Hu Ποντικοί που φέρουν άλλους ανθρώπινους ιστούς μπορούν να παραχθούν ώστε να επιτρέπεται η μόλυνση από άλλα ανθρώπινα ειδικά παθογόνα, με μια προτίμηση να μολύνονται τα συστήματα οργάνων: όπως το ήπαρ (uPA/SCID and RG Fah^{-/-} mice) (Zhou et al., 2012). Αυτό διεύρυνε περαιτέρω την εφαρμογή τους σε μολυσματικές έρευνες της νόσου. Διαγονιδιακά ποντίκια που επιτρέπουν την ταυτόχρονη εμφύτευση ανθρώπινων ηπατικών κυττάρων και HSC αναπτύχθηκαν πρόσφατα. Αυτοί οι ποντικοί είναι ευαίσθητοι στη μόλυνση με HCV και δημιουργούν ειδική ανθρώπινη ανοσολογική αντίδραση (Washburn et al., 2011).

Τα μοντέλα αυτά αντιπροσωπεύουν εξανθρωπισμένα ποντίκια μεταμοσχευμένα με λειτουργικό ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα. Ανοσοεπαρκή ποντίκια που εκφράζουν ανθρώπινα γονίδια επίσης μπορούν να παρέχουν γνώσεις σχετικά με την ανθρώπινη βιολογία (King et al., 2007).

1.2 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΗΥ-ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Με βάση τις πειραματικές ανάγκες και τους ιούς που χρησιμοποιούνται υπάρχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα με τα νέα χρησιμοποιούμενα

μοντέλα ποντικών hu-HSC και BLT. Ένα μειονέκτημα των hu-HSC μοντέλων είναι η έλλειψη των κατάλληλων ανθρώπινων T κυττάρων περιορισμού, λόγω της απουσίας ενός ανθρώπινου θύμου αδένου. Η συν-έκφραση των γονιδίων HLA των τάξεων I και II, θα καλύψει αυτό το κενό.

Τα μειονεκτήματα των BLT ποντικών περιλαμβάνουν, την ανάγκη για πολύπλοκη χειρουργική επέμβαση για την εμφύτευση ανθρώπινων εμβρυϊκών ιστών κάτω από την κάψα του νεφρού, και ότι ο αριθμός των ποντικών που μπορούν να παραχθούν από ένα μόνο εμβρυϊκό ιστό δότη είναι περιορισμένος. Η κλιμάκωση της παραγωγής τους για μεγάλης κλίμακας πειραματισμούς και δοκιμές, θέτει επίσης προκλήσεις, λόγω της απαίτησής τους για εμβρυϊκούς ιστούς που είναι συχνά δύσκολο να προμηθευτούν σε επαρκείς ποσότητες καθώς επίσης ανάπτυξη αυτοανοσίας στα BLT, μη πλήρη ανάπτυξη ανθρώπινου ανοσοποιητικού και μικρό χρόνο ζωής (Akkina, 2014).

1.3 ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs) μεταφέρθηκαν σε εξανθρωπισμένα ποντίκια για την ανάπτυξη ανθρώπινων λεμφοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των T και B κυττάρων. Ως εκ τούτου, ενδείκνυνται ως κατάλληλα μοντέλα για ιούς που μολύνουν ειδικά λεμφοκύτταρα ώστε να εκφράσουν την παθολογία τους, όπως ο HIV-1, HTLV-1 και EBV. Τα HIV-1 μολυσμένα μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανάλυση των μηχανισμών της νόσου και την ανάπτυξη των φάρμακα (Zhang et al., 2010), ως HIV-1 μολύνει τα ανθρώπινα T κύτταρα σε SCID-hu ποντίκια (McCune et al., 1991; Namikawa et al., 1988; Mosier et al., 1988). Αυτή η έρευνα επιταχύνεται με τη χρήση των HSC-μεταμοσχευμένων ανοσοανεπαρκών ποντικών, στα οποία τα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν (Koyanagi et al., 2008; Sato et al., 2010). Στο πεδίο αυτό, ένα μοναδικό μοντέλο για τον ιό HIV-168-70 που αναφέρθηκε από την Ομάδα Γκαρσία στο Πανεπιστήμιο της Βόρειας Καρολίνας και ονομάζεται BLT (bone marrow-liver-thymus) ποντίκι, έχει προσελκύσει την προσοχή. Όπως υποδηλώνει και η ονομασία, αυτό το μοντέλο παράγεται από τη μεταμόσχευση εμβρυϊκού μυελού των οστών, ήπατος και θύμου σε μία

υποδόρια περιοχή του νεφρού. Το πιο ελκυστικό χαρακτηριστικό των ποντικών BLT είναι η ανασύσταση της ανθρώπινης ανοσίας του βλεννογόνου, το οποίο δεν έχει επιτευχθεί από άλλα μοντέλα, με ανθρώπινο ανοσοποιητικό που αναπτύχθηκε μετά από μεταμόσχευση με αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Τα ανθρώπινα λεμφοειδικά συστήματα του βλεννογόνου συμπεριλαμβανομένων των κηλίδων του Peyer και το λεμφοειδή ιστό του εντέρου, έχει ανασυσταθεί με επιτυχία σε ποντίκια BLT, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη της βλεννογονικής ανοσίας. Ανέφεραν ότι το IL-2RC γονίδιο ήταν απαραίτητο για την ανάπτυξη των λεμφοειδών του συστήματος του βλεννογόνου, υποδεικνύοντας ότι η βλεννογονική ανοσία δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε NOG / NSG και BRG ποντίκια που περιέχουν ένα μεταλλαγμένο γονίδιο *Il2rc*. Αυτό το ποντίκι εμφανίζεται για να παρέχει ένα καλύτερο HIV-1 μοντέλο σε σύγκριση με τα συμβατικά εξανθρωπισμένα ποντίκια που είναι μεταμοσχευμένα με αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Ωστόσο, αυτό το μοντέλο δεν μπορεί να διερευνηθεί από την πλευρά της χυμική ανοσία που περιλαμβάνει B κύτταρα, και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ορισμένες χώρες, όπως Ιαπωνία λόγω των ηθικών ζητημάτων. Πρόσθετες γενετικές τροποποιήσεις σε ποντικούς με ανοσοανεπάρκεια μπορεί να είναι αναγκαία για να ξεπεραστεί αυτό το μειονέκτημα.

Ο EBV παρουσιάζεται συνήθως σε υγιή άτομα ως λανθάνουσα μόλυνση ωστόσο, εκφράζει μια ποικιλία παθολογικών χαρακτηριστικών στον υγιή, που ονομάζονται συνδεδεμένη με EBV λοιμώδης μονοπυρήνωση, λεμφοϋπερπλαστική νόσο, λέμφωμα Burkitt και τη νόσου του Hodgkin σε άτομα με ανοσοκαταστολή, λόγω HIV-1 λοίμωξης ή BM μεταφορά (Rickinson et al., 2011). Από την έκθεση του Traggiai et al χρησιμοποιώντας εξανθρωπισμένα ποντίκια BRG προκύπτει ότι ο EBV σχετίζεται με την λεμφοϋπερπλαστική νόσο (Traggiai et al., 2004), όπου αυτές οι παθολογικές καταστάσεις έχουν αναφερθεί σε διάφορα μοντέλα εξανθρωπισμένων ποντικών (Yajima et al., 2008; Sato et al., 2011; Imadome et al., 2011).

Σε εξανθρωπισμένα μοντέλα ποντικών έχουν διερευνηθεί ασθένειες όπως η φυματίωση, η σαλμονέλλωση, ο κίτρινος πυρετός και ο δάγκειος πυρετός (Song et al., 2010).

Λόγω του ότι η ελονοσία είναι μία από τις πιο κοινές μολυσματικές ασθένειες παγκοσμίως, είναι απαραίτητα ζωικά μοντέλα που να είναι κατάλληλα για την ανάπτυξη ενός εμβολίου κατά της ελονοσίας (Sauerwein et al., 2011), ένα ενδιαφέρον μοντέλο για αυτό το σκοπό είναι ένα ανοσοανεπαρκές ποντίκι μεταμοσχευμένο με ανθρώπινο ήπαρ. Με την έγχυση ανθρώπινων ηπατοκυττάρων σε κατεστραμμένο ήπαρ ποντικών με ανοσοανεπάρκεια (Azuma et al., 2007; Hasegawa et al., 2011), ανθρώπινα ηπατοκύτταρα αντικατέστησαν τα ηπατοκύτταρα του ποντικού. Σε αυτά τα hu ηπατικά ποντίκια, έχει παρατηρηθεί ενδοηπατικός πολλαπλασιασμός του *Plasmodium falciparum* (Mikolajczak et al., 2011). Ωστόσο, τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα από ανθρώπινο αίμα πρέπει να έχουν εγχυθεί με ένεση στα ποντίκια ενδοπεριτοναϊκώς, επειδή ανθρώπινα ερυθροκύτταρα δεν μπορούν να αναπτυχθούν από τα HSCs (Jimenez-Diaz et al., 2009). Για να διαπιστωθεί ο πλήρης κύκλος ζωής της ελονοσίας σε μοντέλα ποντικού, είναι αναγκαίο να αναπτυχθεί σε ποντικούς που εμμένουν ανθρώπινα ερυθροκύτταρα και ρέουν σε περιφερικό αίμα ποντικού. Hu-ηπατικά ποντίκια παρέχουν ένα καλό μοντέλο μόλυνσης για ιούς ειδικούς στα ηπατοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της ηπατίτιδας C και B ιών (Bissig et al., 2010; Haridass et al., 2009). Τα μοντέλα αυτά παρέχουν ανεκτίμητα εργαλεία για την ανάλυση των μηχανισμών της μόλυνσης του ανθρώπου και για την ανάπτυξη των χημειοθεραπευτικών παραγόντων όπως τα αντισώματα.

Η νόσος μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GVHD) είναι μια σοβαρή επιπλοκή με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας που συχνά αναπτύσσεται σε ασθενείς που λαμβάνουν αλλογενή μεταμόσχευση BM για την θεραπεία της οξείας ή της χρόνιας λευχαιμίας, της απλαστικής αναιμίας ή της εκ γενετής ανοσοανεπάρκειας. Περίπου 20 χρόνια πριν (Mosier et al., 1988), δείχτηκε ότι η επαγωγή της GVHD ξενογονιδιακά ήταν δυνατή σε ποντίκια με ανοσοανεπάρκεια (CB-17-SCID), με τη μεταμόσχευση hPBMCs. Σε αυτό το μοντέλο, τα μεταμοσχευμένα ανθρώπινα T κύτταρα μπορούν να ενεργοποιούνται και να επιτίθενται στον ιστό του αποδέκτη ποντικού, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη των αλλογενών GVHD-όπως τα συμπτώματα.

Αν και τα CB-17-SCID ή ποντίκια NOD / SCID υπήρξαν χρήσιμα στην έρευνα για την GVHD, υπάρχουν αρκετά προβλήματα. Για παράδειγμα, η ανθρώπινη κυτταρική εμφύτευση είναι σχετικά χαμηλή, λόγω του ενδογενούς έμφυτου

ανοσοποιητικού συστήματος του ποντικού. Επίσης, απαιτεί φονική δόση συνολικής ακτινοβολίας σώματος, η οποία οδηγεί σε μεγάλες διακυμάνσεις στην έναρξη της νόσου. Επιπλέον, ένας σχετικά μεγάλος αριθμός hPBMCs πρέπει να χορηγηθούν ενδοπεριτοναϊκώς, αλλά όχι ενδοφλεβίως, για να προκληθεί η ασθένεια (Martino et al., 1993). Αυτό δεν αντικατοπτρίζει την μεταμόσχευση μυελού, όπου τα κύτταρα εγχέονται ενδοφλεβίως (van Rijn et al., 2003). Έχουν χρησιμοποιηθεί ποντίκια H-2d-RAG2null IL2rcnull στην οποία ξένο-GVHD επαγόταν με ενδοφλέβια ένεση hPBMCs, ωστόσο, το μοντέλο αυτό εξακολουθεί να εξαρτάται από την έγχυση μεγάλων αριθμών hPBMCs και την ολική σωματική ακτινοβολία. Ξένο-GVHD μοντέλο ποντικού NOG μας έχει δείξει σημαντικές βελτιώσεις σε σχέση με άλλα μοντέλα, όπως η ταχεία έναρξη της νόσου και την ίδια εξέλιξη στη νόσο των παραληπτών. Επιπλέον, με την ενδοφλέβια ένεση ένας μικρότερος αριθμός των κυττάρων του δότη είναι επαρκής, και η ακτινοβολία του σώματος δεν είναι πάντα απαραίτητη (Ito et al., 2009). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν από άλλες μελέτες που χρησιμοποιούν NSG ποντίκια (King et al., 2009). Συλλογικά, τα NOG ή NSG ποντίκια είναι οι πιο κατάλληλες πλατφόρμες για βασική και προκλινική έρευνα για GVHD αυτή τη στιγμή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Ο διαβήτης περιλαμβάνει μια ομάδα ασθενειών που έχουν κοινά υψηλά επίπεδα γλυκόζης που οφείλεται σε μια απόλυτη ή σχετική ανεπάρκεια στην παραγωγή ινσουλίνης ή και τη δράση της ινσουλίνης. Ο διαβήτης έχει ταξινομηθεί ως τύπος 1, την απόλυτη ανεπάρκεια της ινσουλίνης, που απαιτεί χορήγηση εξωγενούς ινσουλίνης, ή τύπου 2, μια σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης και ελάττωμα στη δράση της ινσουλίνης. Ο διαβήτης στις ΗΠΑ πλήττει το 8,3% του πληθυσμού που εκπροσωπεί 26 εκατομμύρια Αμερικανούς με ετήσιο κόστος ~ 200 δισεκατομμυρίων δολαρίων το χρόνο. (<http://www.unitedhealthgroup.com>). 347 εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο πάσχουν από διαβήτη. Περισσότερο από το 80% των ατόμων με διαβήτη ζουν σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος (Greiner et al.,

2012). Ο WHO προβλέπει ότι οι θάνατοι από διαβήτη θα διπλασιαστούν μεταξύ 2005 και 2030 (<http://www.who.int/diabetes/en/>). Γι' αυτό το λόγο διεξάγονται μελέτες για την αντιμετώπιση της νόσου αυτής.

Παρά τις δεκαετίες, μελετώντας μοντέλα τρωκτικών του διαβήτη τύπου 1, καμία ικανή θεραπεία για την πρόληψη ή την θεραπεία του διαβήτη τύπου 1 δεν έχει μεταφραστεί από τα τρωκτικά στους ανθρώπους. Αυτή η αδυναμία ενδέχεται να οφείλεται, σε ένα σημαντικό βαθμό, από το είδος και τις συγκεκριμένες διαφορές μεταξύ ανοσοποιητικού συστήματος των τρωκτικών και του ανθρώπου, καθώς και με τις διακυμάνσεις στις νησίδες από άποψη, κυτταρικής σύνθεσης, λειτουργίας και γονιδιακής έκφρασης. Πράγματι, λαμβάνοντας συλλογικά, τις διαφορές αυτές, υπογραμμίζεται η ανάγκη να καθοριστούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος με τα ανθρώπινα β κύτταρα. Ανοσοανεπαρκή ποντίκια με εμφυτευμένο ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα και τα ανθρώπινα β κύτταρα αντιπροσωπεύουν μια ενδιαφέρουσα και πολλά υποσχόμενη ευκαιρία για να μελετηθούν αυτά τα συστατικά *in vivo*. Για να ικανοποιηθεί αυτή η ανάγκη, οι προσπάθειες έχουν επεκταθεί για να αναπτύξουν ποντίκια που θα τους υπολοίπονται αυτά τα ανεπιθύμητα συστατικά, ενώ την ίδια στιγμή, θα επιτρέπουν την εισαγωγή των στοιχείων που απαιτούνται για να κάνουν τις φυσιολογικές ρυθμίσεις να είναι όσο το δυνατόν πλησιέστερα στον ανθρώπινο διαβήτη τύπου 1. Με αυτό, αυτά τα λεγόμενα "εξανθρωπισμένα ποντίκια" χρησιμοποιούνται ως προκλινικές γέφυρες για να διευκολύνουν την αναγνώριση και τη μετάφραση των νέων ανακαλύψεων σε κλινικές ρυθμίσεις (Brehm et al., 2012).

Η κατανόησή μας για τον διαβήτη τύπου 1 έχει επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό από μελέτες που έχουν διεξαχθεί χρησιμοποιώντας μοντέλα τρωκτικών. Τα δύο μοντέλα τρωκτικών που έχουν μελετηθεί πιο εκτεταμένα είναι τα μη παχύσαρκα διαβητικά ποντίκια (NOD) και οι *biobreeding* (BB) αρουραίοι (Greiner et al., 2001). Αυτά τα δύο μοντέλα τρωκτικών έχουν βοηθήσει στο να καθοριστεί ότι η αυτοάνοση απάντηση είναι αυτή που οδηγεί στην καταστροφή των β κυττάρων και να παρέχει ενδείξεις στην παθογένεση του διαβήτη τύπου 1. Αυτά τα μοντέλα έχουν δείξει ότι ο διαβήτης τύπου 1 χαρακτηρίζεται από T-κυτταρική ανοσολογική απόκριση έναντι αυτοαντιγόνων των νησιδίων, και ότι η αυτοανοσία επιμένει πολύ μετά την

απώλεια των β κυττάρων, εμφανίζοντας επαναλαμβανόμενες ανοσοαπαντήσεις όταν μεταμοσχεύονται συγγενικές νησίδες (Von and Nerom, 2009). Έχουν παρόμοια πρότυπα της παθογένεσης όπως αυτά που έχουν παρατηρηθεί σε ανθρώπους, ειδικότερα σε σχέση με υποτροπιάζουσα αυτοανοσία. Μια βασική παρατήρηση έδειξε ότι τα άτομα με διαβήτη τύπου 1 που μεταμοσχεύονται με τα νεφρά και το πάγκρεας από πανομοιότυπα δίδυμα διατηρούν το μόσχευμα του νεφρού, αλλά απορρίπτουν το μόσχευμα των νησίδων του παγκρέατος. Επαναλαμβανόμενη αυτοανοσία έχει επίσης παρατηρηθεί μετά τη μεταμόσχευση αλλογενών νησιδίων (Vendrame et al., 2010).

Πέραν των μελετών της παθογένεσης του διαβήτη τύπου 1, έχουν χρησιμοποιηθεί μοντέλα τρωκτικών για τη διερεύνηση πιθανών θεραπευτικών στόχων για τη θεραπεία και την αντιμετώπιση αυτής της ασθένειας (Staeva-Vieira et al., 2007). Στον ποντικό NOD, έχουν αποδειχθεί 200 θεραπείες για την πρόληψη του διαβήτη (Atkinson and Leiter, 1999). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι τα ποντίκια NOD είναι ανθεκτικά στην επαγωγή ανοχής ακόμη και σε μη νησιδιακούς ιστούς και μοσχεύματα (Pearson et al., 2003) και συνεπώς, το ανοσοποιητικό τους σύστημα φαίνεται να διαφέρει από πολλές απόψεις από αυτό των μη-αυτοάνοσων ποντικών. Στον αρουραίο BB, έχουν δειχθεί πολύ λιγότερες θεραπείες για την πρόληψη του διαβήτη (Greiner et al., 2001). Ωστόσο, μελέτες με αρουραίους καθώς και μοντέλα ποντικών του διαβήτη τύπου 1, μας δείχνουν ότι έχουμε ακόμα να μεταφράσουμε με επιτυχία θεραπείες που εμποδίζουν, καθυστερούν, ή θεραπεύουν τον διαβήτη τύπου 1 στον άνθρωπο (Roep, 2007; Staeva-Vieira et al., 2007; Couzin-Frankel, 2011).

Πίσω από αυτήν την αποτυχία είναι η αυξανόμενη συνειδητοποίηση ότι το ποντίκι και το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς και οι νησίδες, διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά τη σύνθεση των κυττάρων τους, τη λειτουργία και την έκφραση των γονιδίων. Αυτά τα διακριτικά χαρακτηριστικά του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος και των νησιδίων, σε συνδυασμό με την ανάγκη να μεταφραστούν τα αναδυόμενα ευρήματα από τη βιολογία των τρωκτικών για την ανθρώπινη θεραπευτική αποτελεσματικότητα, έχουν σχηματιστεί οδοφράγματα για τη μετάφραση των ανακαλύψεων σε

τρωκτικά για νέες προσεγγίσεις στην πρόληψη ή την καθυστέρηση του διαβήτη τύπου 1 στον άνθρωπο.

Έχει δειχθεί ότι τα NSG ποντίκια (Shultz et al., 2007), είναι ανώτερα από όλες τις άλλες ποικιλίες ποντικών IL2γnull στην ικανότητά τους να υποστηρίξουν τον ενοφθαλμισμό με ένα λειτουργικό ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα (Shultz et al., 2007; Pearson et al., 2008). Λόγω της ικανότητας των ποντικών NSG να μπορούν να εμφυτευθούν σε υψηλά επίπεδα με ώριμα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και HSC, τα ποντίκια NSG είναι ιδανικοί ξενιστές για τη διερεύνηση της in vivo λειτουργίας του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος και των αυτοάνοσων συστημάτων. Αυτά τα προκλινικά μοντέλα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό των μηχανισμών με τους οποίους θεραπευτικές παρεμβάσεις διαμεσολαβούν για τα αποτελέσματά.

ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΝΗΣΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΛΛΟ-ΚΑΙ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ

NSG normoglycemic ποντικοί. Ένα απλό μοντέλο για τη μελέτη της λειτουργίας των ανθρώπινων νησιδίων απουσία πιθανών επιπτώσεων της τοξικότητας της γλυκόζης που ακολουθείται μετά τη μεταμόσχευση των ανθρώπινων νησιδίων σε υπεργλυκαιμικά ποντίκια αφορά τη μεταμόσχευση των ανθρώπινων νησιδίων σε normoglycemic ποντίκια NSG. Έχει παρατηρηθεί ότι μπορούμε να αξιολογήσουμε τη λειτουργία των ανθρώπινων νησιδίων από την ικανότητά τους να εκκρίνουν ανθρώπινη ινσουλίνη και C-πεπτιδίου μετά τη χορήγηση γλυκόζης (Pearson et al., 2008a).

Οι ποντικοί NSG έχουν γίνει υπεργλυκαιμικοί μετά από ένεση με στρεπτοζοτοκίνη (STZ) (King et al., 2008; Pearson et al., 2008b). Μεταμόσχευση ανθρώπινου ή προερχομενα από ποντικό νησίδα ή με ινσουλίνο-θετικά κύτταρα των νησιδίων του ποντικίου μπορεί να αποκατασταθεί η φυσιολογική γλυκαιμία. Αυτά τα ποντίκια μπορούν επίσης να εμφυτευθούν με λειτουργικό ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα μετά από ένεση με ανθρώπινα μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC, ή Hu-PBL-SCID μοντέλο) (King et al., 2009), ή ανθρώπινα HSC (Hu-SRC-SCID

μοντέλο) (Shultz et al., 2005). Έχουν δημοσιευθεί δεδομένα επικύρωσης της ικανότητας του μοντέλου ποντικού NSG να χρησιμεύσουν ως αποδέκτες των ανθρώπινων νησιδίων και του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος, (Shultz et al., 2007). Τα πλεονεκτήματα στη χρήση αυτού του μοντέλου του συστήματος περιλαμβάνουν (1) άμεσα διαθέσιμα ποντίκια NSG ουσιαστικά σε απεριόριστους αριθμούς, (2) την ικανότητα να επάγουν την υπεργλυκαιμία κατά βούληση, (3) ανθρώπινα νησιδία και νησιδία ποντικού καθώς και διαχωρισμένα κύτταρα νησιδίων ποντικού (εναιωρήματα μονού κυττάρου των ινσουλίνη-θετικά κύτταρα) μπορεί να αποκαταστήσει τη φυσιολογική γλυκαιμία, και (4) οι ποντικοί NSG μπορούν να εμφυτευθούν με ένα λειτουργικό ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα μειονεκτήματα αυτού του μοντέλου είναι (1) η ασυνέπεια στην επαγωγή της υπεργλυκαιμίας σε STZ-ποντικούς που υπέστησαν αγωγή, (2) το δυναμικό για "αναστροφή" της υπεργλυκαιμίας με την ανάκτηση των ενδογενών νησιδίων του ποντικού, και (3) η τοξικότητα της STZ.

2.1 ΜΟΝΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΠΟ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ

Η χρήση των χημικών τοξινών για την επαγωγή της υπεργλυκαιμίας έχει έναν αριθμό μειονεκτημάτων, όπως περιγράφεται παραπάνω. Για την αντιμετώπιση αυτών, έχει περιγραφεί ένας αριθμός μονογονιδιακών μοντέλων ποντικού της υπεργλυκαιμίας. Αυτά περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, το *Ins2^{Akita}* (Akita), το *Eif2ak3* (PERK), το *Fxn* (φραταξίνη), και το *Ncb5or* (NCB5OR) κnockout στελέχη. Οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη χρήση του μοντέλου *Ins2Akita* του αυθόρμητου διαβήτη ως ένα θεμέλιο στέλεχος για την παραγωγή ενός μονογονιδιακού μοντέλου γενετικά επαγόμενης αυθόρμητης υπεργλυκαιμίας.

2.2 ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΤΟΥ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 1 ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Hu-PBL-SCID

Μία προσέγγιση για τη μελέτη του ανθρώπινου διαβήτη τύπου 1 σε ανοσοανεπαρκείς ποντικούς είναι η χρήση του *Hu-PBL-SCID* μοντέλου. Αυτό το μοντέλο έχει χρησιμοποιηθεί ιστορικά για τη μελέτη πολλαπλών τύπων

αυτοανοσίας (Tighe et al.,1990; Martin et al., 1992; Davis et al.,2002), συμπεριλαμβανομένου τον διαβήτη τύπου 1 (Petersen et al., 1993). Μολονότι τα αυτοαντισώματα των συστατικών των νησιδίων ανιχνεύθηκαν μετά τη μεταφορά PBL από άτομα με διαβήτη τύπου 1, δεν παρατηρήθηκε διήθηση ή καταστροφή των β-κυττάρων (Petersen et al.,1993). Πιο πρόσφατα, η ανάπτυξη των ανθρώπινων T-κυτταρικών κλώνων με ειδικότητες για αυτοαντιγόνα νησιδίων επέτρεψε τη μελέτη της υιοθετούμενης μεταφοράς του διαβήτη σε NOD-SCID ποντικούς. Πρόσφατα χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια NSG-HLA-A2 ως αποδέκτες των HLA-A2 PBMC από δότες διαβήτη τύπου 1 και μη, και αναφέρθηκε ότι, στο Hu-PBL-SCID πρότυπο σύστημα, τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος από ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 διεισδύουν κατά προτίμηση στις νησίδες των NSG-HLA-A2 αποδεκτών (Whitfield-Larry et al., 2011).

Hu-SRC-SCID Model

Μολονότι το Hu-PBL-SCID μοντέλο επιτρέπει τις in vivo αναλύσεις των λειτουργικών ώριμων ανθρώπινων T κυττάρων , άλλες κυτταρικές σειρές αποτυγχάνουν να εμφυτευθούν αποτελεσματικά μετά την ένεση των PBMC (Shultz et al., 2007). Σε μοντέλα τρωκτικών διαβήτη τύπου 1, υπάρχουν άλλες ανοσοποιητικές κυτταρικές γενεές, συμπεριλαμβανομένων μακροφάγων, NK κυττάρων, δενδριτικών κυττάρων, και B κύτταρων που έχουν ενοχοποιηθεί στην παθογένεση του διαβήτη τύπου 1 (Von and Nerom, 2009). Αυτά τα πρόσθετα ανθρώπινα κύτταρα μπορούν να παραχθούν σε ανοσοανεπαρκείς ποντικούς με την μεταμόσχευση HSC. Πάντως, για να εμφυτευθούν HSC από δότη με γενετική προδιάθεση για διαβήτη τύπου 1 απαιτείται η ανάκτηση των HSC από δότες με διαβήτη τύπου 1 μέσω βιοψίας μυελού των οστών ή κινητοποίησης των HSC στο περιφερικό αίμα μετά από θεραπεία με G-CSF (Kitchen et al., 2009). Ένας μεγάλος αριθμός επιτόπων σε ανθρώπινα αυτοαντιγόνα των νησιδίων έχουν πλέον ταυτοποιηθεί (Di Lorenzo et al., 2007).

Παρά τις πολλές δεκαετίες μελετώντας μοντέλα τρωκτικών του διαβήτη τύπου 1, έχουν ακόμα να μεταφραστούν θεραπείες που αποτρέπουν ή που θεραπεύουν τον διαβήτη τύπου 1 σε τρωκτικά για την επιτυχή πρόληψη ή τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 1 στον άνθρωπο. Αυτό εν μέρει οφείλεται στο

γεγονός ότι τρωκτικών και ανθρώπου ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς επίσης και νησίδες τους, διαφέρουν σημαντικά από την άποψη της σύνθεσης των κυττάρων, τη λειτουργία και τη γονιδιακή έκφραση. Οι διαφορές αυτές αποτελούν τη βάση για την ανάγκη να κατανοηθούν οι αλληλεπιδράσεις των ανθρώπινων αυτοάνοσων συστημάτων με ανθρώπινα β κύτταρα για να επιτραπεί η επιτυχής μετάφραση των αναδυόμενων ευρημάτων από τη βιολογία των τρωκτικών στους ανθρώπους. Η χρήση των νέων μοντέλων ποντικών με ανοσοανεπάρκεια με εμφυτευμένο λειτουργικό ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα και νησίδες τώρα παρέχει τα εργαλεία για τη διερεύνηση συγκεκριμένων μηχανισμών με τους οποίους τα διαβητογόνα ανθρώπινα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος επιτίθενται στα ανθρώπινα β κύτταρα και πώς τα β κύτταρα ανταποκρίνονται σε ανοσολογική επίθεση. Ευρήματα από αυτή την προσέγγιση μπορεί να καθοδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών για την πρόληψη και τη θεραπεία διαβήτη τύπου 1. Οι πληροφορίες αυτές, επειδή βασίζονται στα ανθρώπινα κύτταρα, τους ιστούς, και το ανοσοποιητικό σύστημα, έχουν τη δυνατότητα να μεταφράζονται άμεσα σε πληροφορίες που θα προσδιορίσουν τους στόχους για θεραπευτική παρέμβαση, καθοδήγηση των κλινικών δοκιμών, και τελικά θα οδηγήσουν στην κατανόηση του ανθρώπινου διαβήτη τύπου 1.

2.3 ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΑ ΕΞΑΝΘΡΩΠΙΣΜΕΝΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ

Μια ποικιλία ανθρώπινων παθογόνων, ιδιαίτερα ιών, έχουν μελετηθεί στη νέα γενιά hu ποντικών. Από αυτά ο HIV-1, EBV, ο δάγκειος πυρετός και ο HCV είναι μακράν αυτά που έχουν μελετηθεί (Yamamoto et al., 2010; Villaudy et al., 2011). Ένας αριθμός μελετών επικεντρώθηκε στη δάγκειου ιογενή λοίμωξη και έδειξε ιαιμία με ταυτόχρονες χυμικές και κυτταρικές αποκρίσεις (Kuruvilla et al., 2007; Cox et al., 2012; Jaiswal et al., 2012). Hu- ποντίκια με ανθρώπινη ανασύσταση ηπατοκυττάρων επιτρέπουν τη μόλυνση με ηπατοτρόπους ιούς όπως ο HCV και ο HBV επάγοντας παθολογία και ανοσοαποκρίσεις (He et al., 2010; Washburn et al., 2011). Μια ποικιλία ερπητοϊών του ανθρώπου έχουν επίσης μελετηθεί. Οι εκθέσεις αυτές τεκμηριώνουν HLA-περιορισμένα T κυττάρων προσαρμοστικές ανοσοαποκρίσεις σε EBV, CMV με επανενεργοποίηση από την λανθάνουσα

κατάσταση, προστατευτική έμφυτη και προσαρμοστική ανοσολογική αποκρίση έναντι ενδοκοιλιακή HSV-2, και δημιουργώντας ένα αντι-KSHV-αντίσωμα ανοσοαπόκρισης (Melkus et al., 2006; Parsons et al., 2006; Kwant-Mitchell et al., 2009; Strowig et al., 2009; Smith et al., 2010). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν επεκτείνει τη χρήση των hu-Ποντικών σε άλλα μη ιικά παθογόνων. Αυτές περιλαμβάνουν την εργασία με τα ανθεκτικά στα φάρμακα *Salmonella typhi* (Libby et al., 2010; Firoz Mian et al., 2011), επίμονη μόλυνση με το παράσιτο της ελονοσίας *P. Falciparum* (Arnold et al., 2011) και την ανίχνευση των προσαρμοστικών και έμφυτων ανοσοαποκρίσεων έναντι της *Leishmania* στα hu-Mouse (Wege et al., 2012). Επιπλέον ένας αριθμός αντιγόνων και παρασκευασμάτων ανθρώπινων εμβολίων έχουν επίσης δοκιμαστεί για την αξιολόγηση των Hu-Ποντικών σε αποκρίσεις του ανθρώπινου ανοσοποιητικού. Ανοσοποίηση με DNP (23)-KLH αντιγόνο παράγει πολλαπλασιασμό ανθρώπινων T κυττάρων και IgG αποκρίσεις του ανθρώπου (Tonomura et al., 2008). Στο Τοξικό σύνδρομο σοκ η τοξίνη 1 προκάλεσε μια επέκταση των ανθρώπινων T κυττάρων και την ενεργοποίηση των ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων (Melkus et al., 2006). Χορήγηση μίας ποικιλίας εμβολίων αποδεικνύει προσαρμοστικές άνοσες αποκρίσεις συμπεριλαμβανομένης της γρίπης-ειδικά ανθρώπινα CD8 + T κύτταρα, ανθρώπινες αποκρίσεις αντισωμάτων IgM σε τοξοειδές του τετάνου και του HBV (Yu et al., 2008; Becker et al., 2010). Η βιβλιογραφία, οποία αναμένεται να αυξηθεί καθώς η χρήση αυτών των μοντέλων του ποντικίου γίνεται όλο και πιο διαδεδομένη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3⁰

ΚΑΡΚΙΝΟΣ

3.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η πρώτη επιτυχής μεταμόσχευση ανθρώπινου όγκου σε ποντίκια ομόζυγα για την SCID (*Prkdc^{scid}*) μετάλλαξη έχει αναφερθεί πριν από περίπου 20 χρόνια (Reddy et al., 1987). Δεδομένου αυτής της αρχικής έκθεσης, υπήρξαν αρκετές χιλιάδες εκθέσεις για την εμφύτευση σε ποντικούς SCID από μια ποικιλία διαφορετικών φυσιολογικών καθώς και νεοπλασματικών ανθρώπινων

κυττάρων και ιστών. Οι μελέτες αυτές έχουν οδηγήσει σε πολλές και σημαντικές προόδους στην κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου στον άνθρωπο, την αυτοανοσία και τις μολυσματικές ασθένειες (Shultz et al., 2007).

Η εμφύτευση ακεραίων τμημάτων πρωτογενών ανθρώπινων όγκων σε SCID ποντίκια έχει χρησιμεύσει ως ένα χρήσιμο μοντέλο για την αξιολόγηση των αντικαρκινικών θεραπειών. Μια τέτοια εμφύτευση διατηρεί το μικροπεριβάλλον του όγκου, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του όγκου, τα διηθητικά λευκοκύτταρα, τους ινοβλάστες, την εξωκυτταρική μήτρα και την αγγείωση (Bankert et al., 2001; 2002). Η εμφύτευση των ακεραίων τμημάτων του όγκου αντί των εναιωρημάτων μονών κυττάρων, κατέστησε δυνατή τη μελέτη πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων όγκου - στρώματος που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση και τη μετανάστευση αμφοτέρων καρκινικών κυττάρων και κυττάρων που σχετίζονται με όγκους (Ibe et al., 2001; McCawley and Matrisian, 2001; Tlsty, 2001).

Πειράματα με τη χρήση του SCID μοντέλου έχουν αποδείξει ότι στην εμφύτευση ενός πλήρους ανθρώπινου όγκου μπορεί να διατηρηθεί το μικροπεριβάλλον για ένα περιορισμένο χρονικό διάστημα (Bankert et al., 2002; Williams et al., 1996). Επιπλέον, ορισμένα λεμφοκύτταρα που σχετίζονται με όγκους διατηρούν τη λειτουργικότητά τους, όπως υποδεικνύεται από την παρουσία της ανθρώπινης Ig στον ορό ποντικού, και η παραγωγή της ανθρώπινης IFN- γ σε απόκριση προς την ενδοογκική διέγερση της κυτοκίνης IL-12 (Sugiyama et al., 2001; Hess et al., 2003; Broderick et al., 2005).

Αναφέρουμε εδώ τη χρήση του NOD-SCID IL2R γ null ποντικού για την εμφύτευση των ακεραίων τμημάτων ανθρώπινου πρωτογενούς όγκου του πνεύμονα. Χρησιμοποιώντας το μοντέλο ποντικού NOD-SCID IL2R γ null είναι δυνατόν να εμφυτευθούν επιτυχώς αυτά τα ακέραια τμήματα του ανθρώπινου όγκου του πνεύμονα και να διατηρηθεί το μικροπεριβάλλον του όγκου. Αυτά τα ξενομοσχεύματα επιβίωσαν μέχρι και 9 εβδομάδες μετά την εμφύτευση. Οι όγκοι και τα στρωματικά κύτταρα που σχετίζονται με όγκους παρέμειναν βιώσιμα και λειτουργικά, απουσία των υψηλών επιπέδων των κυττάρων του ποντικού που διηθούν τον εμφυτευμένο ιστό. Τα T κύτταρα μνήμης τα οποία βρίσκονται εντός του μικροπεριβάλλοντος του ξενομοσχεύματος βρέθηκαν να

παράγουν ιντερφερόνη - γ (IFN-γ) σε απόκριση της εξωγενούς IL-12, και ένα τμήμα αυτών των T κυττάρων μετανάστευσαν από το ξενομόσχευμα στον σπλήνα του ποντικού, τον πνεύμονα και το ήπαρ. Έχει προσδιοριστεί επίσης ότι τα T κύτταρα που σχετίζονται με τους όγκους που ανακτήθηκαν από τους σπλήνες των ποντικών που φέρουν ξενομοσχεύματα όγκου θα μπορούσαν να διατηρηθούν και να επεκταθούν μετά από μεταφορά σε ποντίκια NOD-SCID IL2Rγnull χωρίς όγκο.

Αναφέρεται ότι το μικροπεριβάλλον ανθρώπινου μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα μπορεί να εμφυτευθεί με επιτυχία σε NOD-SCID IL2Rγnull, και τα προκύπτοντα ξενομοσχεύματα να διατηρηθούν τόσο δομικά όσο και λειτουργικά για μέχρι και 9 εβδομάδες. Αυτό το νέο μοντέλο κατέστησε δυνατή τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων του όγκου και των στρωματικών κυττάρων για παρατεταμένες περιόδους *in situ* με ελάχιστη διείσδυση των κυττάρων σε φυσιολογικό ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή μέσα στο ανθρώπινο ξενομόσχευμα. Αυτό το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ενισχύσει και να τυποποιήσει το πρωτόκολλο για την εμφύτευση ανθρώπινων όγκων στην οποία υπάρχει μια παρατεταμένη παρουσία ενός λειτουργικού μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Η πλήρης απουσία μιας προσαρμοστικής ανοσοαπόκρισης και η πολύ μειωμένη έμφυτη ανοσοαπόκριση των NOD - SCID IL2Rγnull είναι πιθανό να συμβάλει πλέον σημαντικά στην παρατεταμένη επιβίωση των ξενομοσχευμάτων και την παρατεταμένη παρουσία και επέκταση των T κυττάρων που σχετίζονται με όγκους.

Η ικανότητα να καθιερώσουν και να διατηρήσουν τα ανθρώπινα μικροπεριβάλλοντα του όγκου με χειρουργική εμφύτευση ακεραίων τμημάτων ιστού πνευμονικού όγκου σε NOD-SCID IL2Rγnull ποντίκια παρέχει ένα μοναδικό μοντέλο με το οποίο μπορεί να μελετηθούν πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις *in vivo*, που συμβαίνουν μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και στρώματος, το οποίο περιλαμβάνει τα φλεγμονώδη λευκοκύτταρα, τους ινοβλάστες, και την εξωκυτταρική μήτρα. Αυτό το μοντέλο αναμένεται να είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων με τον καρκίνο που στοχεύουν τον όγκο, το στρώμα του όγκου, ή αμφοτέρων των φυσιολογικών και νεοπλασματικών κυττάρων μέσα στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Simpson-Abelson et al., 2008).

Με βάση τα παραπάνω προκύπτει ότι το συγκεκριμένο στέλεχος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως στην έρευνα για την αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα. Παρακάτω αναλύονται ενδεικτικά δύο παραδείγματα αυτών των μελετών για στοχευμένη θεραπεία και την κατανόηση του μηχανισμού της μετάστασης σε αυτόν τον τύπο καρκίνου.

3.1.1 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΓΓΕΙΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ

Αγγειοποιητίνη-2 (Ang2), είναι ένας συνδέτης για ενδοθηλιακά ΤΕΚ (Tie2) υποδοχέα κινάσης της τυροσίνης, επάγεται σε υποξικά ενδοθηλιακά κύτταρα των όγκων, όπου προάγει την αγγειογένεση και την ανάπτυξη όγκων. Ωστόσο, οι επιδράσεις της Ang2 σχετικά με την λεμφαγγειογένεση του όγκου και τη μετάσταση είναι κακώς χαρακτηρισμένη.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η Ang2 αυξάνει την μετάσταση του όγκου τουλάχιστον εν μέρει, προωθώντας τη διάσπαση των ενδοθηλιακών και την αυξανόμενη ματατόπηση των κυττάρων του όγκου. Για τον προσδιορισμό της λειτουργίας της Ang2 σε μετάσταση όγκου, έχουν χρησιμοποιηθεί συστηματικά και ενδοθηλιακά κύτταρα – με ειδική υπερέκφραση της Ang2, καθώς και Ang2 –αντισώματα μπλοκαρίσματος σε διάφορα μοντέλα όγκων. Τα αποτελέσματά δείχνουν ότι η συστηματική υπερέκφραση της Ang2 προωθεί τη λεμφαγγειογένεση του όγκου όπως επίσης και τους λεμφαδένες και τη μετάσταση του πνεύμονα εκτός από την ανάπτυξη του όγκου και την αγγειογένεση. Η Ang2 ενίσχυσε επίσης τη δημιουργία των μεταστατικών αποικιών στους πνεύμονες μετά από ενδοφλέβιο εμβολιασμό των καρκινικών κυττάρων. Σημαντικότερο, με τη χρήση διαγονιδιακών ποντικών, VEC-tTA/Tet-OS-Ang2, στα οποία η Ang2 επάγεται ειδικά μόνο στο αγγειακό ενδοθήλιο, έχει αποδειχθεί ότι η ενδοθηλιακή υπερέκφραση της Ang2 αυξάνει τις μεταστάσεις του πνεύμονα.

Η στοχευμένη διαγραφή της οδηγεί σε ελλατωματική ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων στο μάτι και στην ανάπτυξη των λεμφικών αγγείων στο μεσεντέριο και το δέρμα. Αντισώματα μπλοκαρίσματος της Ang2 επάγουν σημαντική αναστολή στις φάσεις του όγκου.

Στόχος της έρευνας ήταν η αντιμετώπιση της επίδρασης της Ang2 επί της εξέλιξης των όγκων και της μετάστασης με τη χρήση συστημικής

υπερέκφρασης της Ang2 σε ποντίκια που φέρουν ξενομοσχεύματα όγκου, υπερέκφραση της Ang2 στο ενδοθήλιο σε VEC-tTA/Tet-OS-Ang2 διαγονιδιακά ποντίκια με εμφύτευση ισογονιδιακών όγκων, και τη χορήγηση Ang2 αντισώματα μπλοκαρίσματος σε ποντικούς με ανοσοανεπάρκεια που φέρουν όγκο.

Τα ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν θηλυκοί ποντικοί με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID) και nu / nu ποντικοί BALB / c , ηλικίας έξι έως οκτώ εβδομάδων καθώς και NOD SCID γάμμα (NSG) ποντικοί ηλικίας 8 έως 12 εβδομάδων. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν VEC-tTA/Tet-OS-Ang2 διαγονιδιακά ποντίκια και ένα μέλος του ζεύγους ή ομάδα ζώων που γεννήθηκαν στην ίδια γέννα. Για να ξεπεραστεί η εμβρυϊκή θνησιμότητα που αποδίδεται σε υπερέκφραση ενδοθηλιακής Ang2 σε διπλά διαγονιδιακά έμβρυα, η έκφραση της Ang2 καταστέλλεται κατά τη διάρκεια ολόκληρης της εγκυμοσύνης. Τετρακυκλίνη (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) σε 2,0 mg / mL σε 5% σακχαρόζη προστέθηκε στο πόσιμο νερό των εγκύων θηλυκών, ξεκινώντας κατά τη στιγμή του ζευγαρώματος και μέχρι την γέννηση, η έκφραση της Ang2 προκλήθηκε με διακοπή της χορήγησης της τετρακυκλίνης. Ενιαία διαγονιδιακά ή άγριου-τύπου νεογνά χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για διπλά διαγονιδιακά ποντίκια.

SCID ή NSG ποντικοί εγχύθηκαν ενδοφλεβίως με αδενοϊούς που κωδικοποιούν αγγειοποιητίνη-2 (AdAng2) ή β-γαλακτοσιδάση (AdLacZ), 2 ημέρες πριν τον ενοφθαλμισμό, συστημικά με επισημασμένα LNM35 κύτταρα με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), και ο αποικισμός των πνευμόνων αναλύθηκε 4 ημέρες μετά με μικροσκόπιο φθορισμού. Για να αξιολογήθει η μεταστατική ανάπτυξη σε μεταγενέστερα χρονικά σημεία, κύτταρα LNM35 εμφυτεύθηκαν και ενδοφλεβίως σε AdAng2 και AdLacZ ποντικούς που υπέστησαν αγωγή και οι πνεύμονες αποκόπηκαν μετά από 3 εβδομάδες, όπου ζυγίστηκαν, απεικονίστηκαν υπό ένα μικροσκόπιο, και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για ιστολογική εξέταση.

Η αδενοϊϊκή έκφραση της Ang2 αυξάνει τη μετάσταση στους λεμφαδένες και στους πνεύμονες σε ξενομοσχεύματα όγκου. Το μεταστατικό φορτίο στους πνεύμονες αυξήθηκε σε διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία η έκφραση της Ang2 επάχθηκε ειδικά στο αγγειακό ενδοθήλιο. Τα αντισώματα αποκλεισμού της Ang2 έδωσαν μειωμένη μετάσταση στους λεμφαδένες και στους πνεύμονες,

καθώς και λεμφαγγειογένεση όγκου, μετά από ενδοφλέβια ένεση. Σε μετάσταση του πνεύμονα, η υπερέκφραση της Ang2 μειώνει την ενδοθηλιακή ακεραιότητα, ενώ τα αντισώματα αποκλεισμού της Ang2 βελτιώνουν τις ενδοθηλιακές συνδέσεις κυττάρου-κυττάρου και τις επαφές της βασικής μεμβράνης των τριχοειδών του πνεύμονα που σχετίζονται με τη μετάσταση.

Τα αποτελέσματά των μελετών δείχνουν ότι καθορίστηκαν λιγότερες αποικίες του κυττάρου του όγκου στους πνεύμονες των ποντικών που έλαβαν θεραπεία με το αντίσωμα μπλοκαρίσματος της Ang2, σε σύγκριση με τα ποντίκια που έλαβαν το αντίσωμα ελέγχου στα σχετικώς πρώιμα χρονικά σημεία, όταν η αγγειογένεση δεν είχε ακόμη ανιχνευθεί στις μεταστατικές εστίες. Έχει προηγουμένως δειχθεί ότι τα κύτταρα του όγκου που σχετίζονται με τα τριχοειδή του πνεύμονα εκφράζουν αυξημένες ποσότητες Ang2, Holash et al. (1999). Στα πνευμονικά αγγεία που συνδέονται με τις μεταστάσεις στους πνεύμονες, το αντίσωμα μπλοκαρίσματος της Ang2 φάνηκε να εξουδετερώνει την διατάραξη των ενδοθηλιακών συνδέσεων κυττάρου-κυττάρου και την αγγειακή ακεραιότητα, γεγονός που υποδηλώνει ότι με την μείωση της προσκόλλησης κυττάρου-κυττάρου και ενδοθηλιακής ακεραιότητας, η ενδογενής Ang2 μπορεί να διευκολύνει το στάδιο της εξαγγείωσης στις ενδοθηλιακές συνδέσεις κυττάρου-κυττάρου (Huang et al., 2011).

Παρόλο που δείχθηκε ότι τα αντισώματα μπλοκαρίσματος της Ang2 αναστέλλουν τη μετάσταση σε ανοσοανεπαρκείς ποντικούς σε απουσία συνεισφοράς φλεγμονωδών κυττάρων, η Ang2 επηρεάζει επίσης τις φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αποκρίσεις σε όγκους (Coffelt et al., 2011; Mazziери et al., 2011). Σε φέροντα όγκο ανοσοεπαρκών ποντικών, Ang2-αντισώματα αποκλεισμού παρενέβησαν με την έκφραση του Tie2 σε έναν υποπληθυσμό μακροφάγων, μειώνοντας την αγγειογένεση, με αποτέλεσμα την αναστολή της μετάστασης (Mazziери et al., 2011). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η Ang2 επάγει αγγειακή αποσταθεροποίηση κατά τη διάρκεια της μετάστασης του όγκου υποδηλώνοντας ότι κατά τη διάρκεια αποκλεισμού του VEGF, η προκαλούμενη αγγειακή αποσταθεροποίηση εξαιτίας της Ang2. θα μπορούσαν να συνδέονται με αυξημένη μετάσταση. Έτσι, συνδυαστική θεραπεία αποκλεισμού τόσο του VEGF και της Ang2 μπορούν να παρέχουν πιο αποτελεσματική αναστολή στην ανάπτυξη του όγκου και της μετάστασης.

Συμπερασματικά, η Ang2 συμβάλλει ουσιαστικά στην εξέλιξη του όγκου και η παρεμπόδιση της αναστέλλει την ενδοθηλιακή αποσταθεροποίηση και αποτελεί μια αποτελεσματική στρατηγική για την αναστολή της ανάπτυξης του όγκου και των μεταστάσεων. Έτσι τα δεδομένα μας παρέχουν σημαντικές νέες γνώσεις για τη σηματοδότηση του μονοπατιού Ang2/Tie2 ως ένα ελκυστικό στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου (Holopainen et al., 2012).

3.1.2 ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗ

Κάθε χρόνο, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι υπεύθυνος για πάνω από 200.000 θανάτους στις ΗΠΑ (Jemal et al., 2009). Ως πρότυπο θεραπειών περιλαμβάνουν τη χειρουργική εκτομή, την ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία. Αν και οι ασθενείς παρουσιάζουν μια αρχική ανταπόκριση στη θεραπεία, οι όγκοι συχνά υποτροπιάζουν οδηγώντας σε ένα ποσοστό 5ετούς επιβίωσης περίπου 15%. Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα στοχεύουν πιο αποτελεσματικά το μεγαλύτερο μέρος του όγκου, αλλά ένα μικρότερο κλάσμα των κυττάρων τείνουν να επιδεικνύουν ισχυρή αντίσταση, η οποία έχει αποδοθεί στην παρουσία βλαστικών κυττάρων του καρκίνου (CSCs) (Dallas et al., 2009). Η υπόθεση CSC έχει λάβει πρόσφατα μαζική προσοχή, ιδίως επειδή ορίζει τα CSC ως την εισαγωγή των καρκινικών κυττάρων (Bortolomai et al., 2010), με την ικανότητα να επιβιώνουν της αρχικής θεραπείας και να οδηγούν σε υποτροπή του όγκου και στην προώθηση της μετάστασης (Shafee et al., 2008).

Τα τελομερή προστατεύουν τα χρωμοσώματα από αποικοδόμηση, με ακανόνιστο ανασυνδυασμό και με συνδέσεις από άκρο σε άκρο (Bailey and Murnane, 2006). Τα τελομερή μειώνονται σε μήκος με κάθε κυτταρική διαίρεση (Harley, 1991), μέχρι να φτάσουν σε ένα κρίσιμο μέγεθος (Artandi and DePinho, 2000). Σε φυσιολογικά κύτταρα, τα σύντομα τελομερή αναγνωρίζονται ως κατεστραμένο DNA (DDR) και τα κύτταρα υφίστανται γηρασμό ή απόπτωση (Ben-Porath and Weinberg, 2005). Τα καρκινικά κύτταρα είναι σε θέση να ξεπεράσουν το γηρασμό εκφράζοντας τελομεράση, ένα ένζυμο που αποτελείται από τρεις υπομονάδες: την ανάστροφη μεταγραφάση τελομεράσης (TERT), η τελομεράση RNA συστατικό (TERC) και η πρωτεΐνη δυσκερίνης (DKC1) (Collins, 2008). Η τελομεράση

προστατεύει τα τελομερή από κρίσιμη βράχυνση , επιτρέποντας έτσι συνεχή κυτταρική διαίρεση (Blasco, 2002), και η αυξημένη έκφραση τελομεράσης έχει βρεθεί συχνά στον καρκίνο του πνεύμονα (Lantuejoul et al., 2010). Ως εκ τούτου , επειδή η αντοχή του όγκου και υποτροπή έχουν αποδοθεί στην αδυναμία των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων για την εξάλειψη των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSC), η στόχευση της λειτουργίας της τελομεράσης μπορεί να παρέχει μια νέα και πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την εξάλειψη ειδικά αυτών των κυττάρων. Μετά από ενδελεχή χαρακτηρισμό του φαινοτύπου των CSC του πνεύμονα , ο σκοπός των μελετών ήταν να προσδιοριστεί αν η αντιτελομερική θεραπεία στοχεύει αποτελεσματικά τον πληθυσμό των CSC τόσο in vitro όσο και in vivo (Serrano et al., 2011).

Η υψηλή έκφραση και η δραστικότητα της τελομεράσης έχουν αναφερθεί σε περισσότερους από το 80% των όγκων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα (Lantuejoul et al., 2007). Οι περισσότεροι μη μικροκυτταρικοί καρκίνοι του πνεύμονα (NSCLC) και σχεδόν όλοι οι μικροκυτταρικοί καρκίνοι του πνεύμονα (SCLC) εμφανίζουν σημαντικά υψηλά επίπεδα δραστικότητας τελομεράσης σε σύγκριση με τον φυσιολογικό πνεύμονα. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα hTERT mRNA συσχετίζονται με κακή πρόγνωση και επανεμφάνιση του όγκου (Lantuejoul et al., 2007). Κατά την έναρξη της καρκινογένεσης του πνεύμονα, μια προοδευτική μείωση του μήκους των τελομερών έχει αναφερθεί, ως αποτέλεσμα της τελομερικής υπερέκφρασης (Lantuejoul et al., 2010). Στην περίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα, η προγνωστική αξία της διάβρωσης των τελομερών και της σχέσης τους με τη γενετική αστάθεια είναι τα θέματα που εξακολουθούν να χρειάζονται να αναλυθούν σε μεγάλες ομάδες ασθενών. Βάσει όλων αυτών των στοιχείων, η αντιτελομερική θεραπεία μπορεί να είναι η κατάλληλη προσέγγιση για τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.

Διαφορετικές στρατηγικές που στοχεύουν την τελομεράση δοκιμάζονται σήμερα στον καρκίνο, αν και λίγες μελέτες έχουν αναλύσει κατά πόσο αυτές οι θεραπείες είναι πιο αποτελεσματικές σε CSC. Αυτές περιλαμβάνουν μεθόδους νουκλεϊκών οξέων που βασίζονται στην αναστολή της hTERT και hTR, ανοσοθεραπεία, συνδέτες G-τετραπλών, και hTERT-στόχευση φαρμάκων (Philippi et al., 2010). Η προηγούμενη ένωση είναι η GRN163L (Imetelstat,

Geron Corporation), η οποία είναι επί του παρόντος σε κλινικές δοκιμές φάσης I για τη θεραπεία του NSCLC και του καρκίνου του μαστού (Molckovsky and Siu, 2008).

Το MST312 είναι ένα μικρό μόριο που έχει αναδειχθεί ως ένα πολλά υποσχόμενο υποψήφιο για αντιτελομερική θεραπεία (Seimiya et al., 2002). Προηγούμενες μελέτες σε αστροκύττωμα έχουν δείξει ότι αυτός ο αναστολέας της τελομεράσης δρα μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών, ανάλογα με τον χρόνο έκθεσης (Wong et al., 2009). Βραχυπρόθεσμη χορήγηση του φαρμάκου οδηγεί σε μια οξεία επίδραση, με ATM εξαρτώμενη στην G2 / M του κυτταρικού κύκλου σύλληψη, βλάβη του DNA, και μειωμένη κυτταρική βιωσιμότητα. Αυτή η επίδραση, η οποία συμβαίνει μέσα σε 72 ώρες μετά τη θεραπεία, δεν διαμεσολαμβάνεται από τη διάβρωση των τελομερών. Μακροπρόθεσμα αποτελέσματα χρησιμοποιώντας υπο-κυτταροστατικές δόσεις MST312, η οποία απαιτεί τη χορήγηση της ένωσης για περισσότερο από 1,5 μήνες οδηγεί σε σημαντική βράχυνση των τελομερών (Wong et al., 2009).

Μαζική απόπτωση ανιχνεύθηκε *in vitro* 10 ημέρες μετά από την έκθεση στο φάρμακο και αυτό το αποτέλεσμα επίσης επιβεβαιώνεται *in vivo* σε ποντικούς που φέρουν όγκο. Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν την οξεία επίδραση του MST312 επί των κυττάρων καρκίνου του πνεύμονα, οδηγώντας τα κύτταρα σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου και, τέλος, στην απόπτωση (Goldblatt et al., 2009; Mikami-Terao et al., 2007). Αυτό υποδηλώνει νέους μηχανισμούς αντιτελομερικής θεραπείας που δεν σχετίζονται με φθορά των τελομερών που θα παράγει διαταραχή των καρκινικών κυττάρων.

Το μήκος των τελομερών μπορεί να καθορίσει την ευαισθησία στην MST312, παρά τη δραστηριότητα των τελομερών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, τα κύτταρα με μεγαλύτερα τελομερή είναι πιο ευαίσθητα σε MST312 μεσολαμβάνοντας στην αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Τα ευρήματα αυτά ταιριάζουν με προηγούμενες παρατηρήσεις, τα οποία κατέδειξαν ότι η βράχυνση των τελομερών εξασθενεί την επίδραση της αναστολής της τελομεράσης με MST312. Αν και αυτή η υπόθεση θα πρέπει να επιβεβαιωθεί σε μελλοντικές μελέτες χρησιμοποιώντας μια μεγαλύτερη ποικιλία κυτταρικών σειρών, είναι πιθανό ότι τα κύτταρα με μεγαλύτερα τελομερή είναι πιο επιρρεπή να υποστούν βλάβη του DNA λόγω της τελομεράσης, απόζευξη-

DNA. Εάν επιβεβαιωθεί, το μήκος των τελομερών μπορεί επίσης να είναι ένας δείκτης απάντησης της MST312.

Για πρώτη φορά αποδείχθηκε ότι ο νέος αναστολέας της τελομεράσης, MST312, έχει μια ισχυρή δραστικότητα αύξησης κατά του όγκου για NSCLC in vivo, με συρρίκνωση του όγκου περισσότερο από 70 % χρησιμοποιώντας ενέσεις 40 mg / kg ip ημερησίως . Παρόμοια μείωση του όγκου (~ 70 %) έχει βρεθεί για ποντικούς με ξενομοσχεύματα ανθρώπινων κυττάρων γλοιοβλαστώματος, στα οποία καθημερινά χορηγούνταν με 30 mg / kg Imetelstat (Marian et al., 2010). Ιστολογικά, οι όγκοι από ποντικούς που υπέστησαν αγωγή σ' αυτό το πείραμα έδειξε μεγάλες νεκρωτικές περιοχές, χαμηλότερους αριθμούς των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων και αύξηση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων. Αυτό συνοδεύεται από μία σημαντική μείωση του μήκους του τελομερούς που προκαλείται από το φάρμακο (Serrano et al., 2011).

Για την αξιολόγηση της ικανότητας των CSC στην έναρξη του όγκου, χρησιμοποιήθηκαν NSG ποντικοί (NOD SCID IL2Rγ από το The Jackson Laboratory, USA) ηλικίας έξι εβδομάδων. Τα ποντίκια διατηρήθηκαν σε ένα περιβάλλον ελεύθερο από παθογόνους μικροοργανισμούς και χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του ιδρύματος. Δέκα χιλιάδες θετικά ή αρνητικά ALDH ταξινομημένα H460 κύτταρα εγχύθηκαν υποδορίως στα πλευρά των ποντικών σε διάλυμα 1:1 PBS / Matrigel (BD). Ο όγκος του όγκου μετρήθηκε μετά από 3 εβδομάδες σύμφωνα με τον τύπο: $V = \text{μήκος} \times (\text{πλάτος})^2 / 2$.

Για να δοκιμαστεί η αποτελεσματικότητα της θεραπείας της αναστολής της τελομεράσης χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά αθυμικά ποντίκια ηλικίας οκτώ εβδομάδων. 4 x 10⁵ H460 κύτταρα εγχύθηκαν υποδορίως στα πλευρά των ποντικών, και τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία και κατατάχθηκαν σε 4 ομάδες: ομάδα ελέγχου (καμία επεξεργασία), MST312 κατεργασμένα, κατεργασμένα με ακτινοθεραπεία (RT), και ο συνδυασμός MST312 + RT. Η θεραπευτική αγωγή για MST312 αποτελούνταν από καθημερινή ip ενέσεις (40 mg / kg) για 25 ημέρες, ξεκινώντας όταν ο όγκος έφτασε ~ 100 mm³. Για την RT, δύο δόσεις των 10 Gys με εφαρμογή τοπικά επί του όγκου την 3^η και 13^η ημέρα χρησιμοποιώντας ένα Primus Γραμμικό Επιταχυντή. Οι ίδιες δόσεις και χορήγηση από εκείνες που χρησιμοποιούνται στην απλή θεραπεία

χρησιμοποιήθηκαν για συνδυαστικούς προσδιορισμούς. Ο όγκος του όγκου μετράται περιοδικώς και οι ποντικοί παρακολουθούνται προσεκτικά για συμπτώματα τοξικότητας. Σε όλους τους ποντικούς προκαλείτε ευθανασία 25 ημέρες μετά την ένεση, τα κύτταρα και οι ιστοί (όγκου, ήπαρ, έντερο και νεφρούς) κρατήθηκαν για ανοσοϊστοχημική ανάλυση.

3.2 ΜΕΛΑΝΩΜΑ

Ένα ακόμα είδος καρκίνου που θα γίνει αναφορά αποτελεί το μελάνωμα διότι ως καρκίνος έχει μελετηθεί εκτενώς λόγω κάποιων ιδιοτήτων του σε σχέση με το στέλεχος που μελετάμε. Η ανάπτυξη μεταστάσεων μελανώματος καθυστερεί και μεταβάλλεται σε SCID, και NOD-SCID ποντικούς. Σε αντίθεση, με τα NOD-SCID $\beta 2mnull$ και NOD-SCID IL2R $\gamma null$ ποντίκια που δείχνουν ταχεία εμφύτευση του όγκου, αν και η ανάπτυξη του όγκου είναι μεταβλητή σε NOD-SCID $\beta 2mnull$ ποντικούς. NK κύτταρα ανιχνεύθηκαν σε όλα τα στελέχη, εκτός από τα NOD-SCID IL2R $\gamma null$, και *in vitro* ενεργοποιημένα NK κύτταρα των SCID, NOD-SCID και NOD-SCID $\beta 2mnull$ σκοτώνουν τις ανθρώπινες σειρές του μελανώματος και τα πρωτογενή κύτταρα αυτού. Η έκφραση των ανθρώπινων NKG2D συνδετών της MHC κατηγορίας I αλύσου που σχετίζονται με τα μόρια A και B που καθιστούν ευαίσθητο το μελάνωμα με τη μεσολάβηση της κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων του ποντικού και η θανάτωση αναστέλλεται με αποκλεισμό αντισώματος στο NKG2D του ποντικού. Τα NOD-SCID IL2R $\gamma null$ στελέχη είναι ιδιαίτερα ανεκτικά στον ενοφθαλμισμό ανθρώπινων μεταστάσεων μελανώματος (Carreno et al., 2010).

3.2.1 Θεωρία των CSC

Το μελάνωμα είναι ιάσιμο αν οι πρωτογενείς όγκοι ανιχνεύονται σε πρώιμο στάδιο και αφαιρούνται χειρουργικά. Εξαιτίας αυτού, η παρακολούθηση των ασθενών υψηλού κινδύνου και οι προ-κακοήθεις βλάβες, όπως δυσπλαστικοί σπίλοι συχνά συνιστάται. Ωστόσο, ένα υψηλό ποσοστό των μελανωμάτων προκύπτουν *de novo* και όχι σε συνδυασμό με προηγούμενους καλοήθεις σπίλους (Weatherhead et al., 2007). Εξαιτίας αυτού, δεν είναι όλα τα

πρωτογενή μελανώματα σε αυτό το στάδιο που είναι ιάσιμα με χειρουργική επέμβαση, και πάνω από το 10% των ασθενών παρουσιάζουν μεταστατική νόσο (Hu et al., 2009). Ως εκ τούτου, παρά τη σημασία της κατανόησης της μελανογένεσης για τη βελτίωση της πρωτογενούς πρόληψης, εκτιμώντας το πως τα μελανώματα διαδίδονται μετά την εγκαθίδρυση ενός πρωτογενούς όγκου είναι σημαντικό για τη μείωση της φυσικής και οικονομικής επιβάρυνση της νόσου.

Εννοιολογικά, η διάδοση του καρκίνου προτείνεται να συμβεί ανάλογα με τα διάφορα μοντέλα, καθένα από τα οποία παρέχει ανεξάρτητη επεξήγηση της φαινοτυπικής και λειτουργικής ετερογένειας που συχνά είναι εμφανής μεταξύ των κυττάρων εντός ενός κακοήθους όγκου. Το πρώτο μοντέλο είναι αυτό των βλαστικών κυττάρων του καρκίνου (CSC) (Dick, 2008; Lobo et al., 2007), στο οποίο η ανάπτυξη του όγκου καθοδηγείται κυρίως από σπάνιους πληθυσμούς άκρως ογκογόνων κυττάρων τα οποία όχι μόνο ανανεώνουν το δικό τους κακόηθες δυναμικό, αλλά επίσης οδηγούν σε πληθυσμούς άλλων κυττάρων που είναι αμετάκλητα λιγότερο ή μη-ογκογονικά. Δεύτερο είναι το κλωνικό μοντέλο εξέλιξης (Fearon and Vogelstein, 1990; Foulds, 1998), στο οποίο ένα υψηλό ποσοστό των κυττάρων σε ένα καρκίνο έχει τη δυνατότητα να οδηγήσει την εξέλιξη της νόσου και στην οποία ορισμένα κύτταρα αποκτούν επιπλέον γενετικές μεταλλάξεις που τους παρέχουν ένα πλεονέκτημα στην ανάπτυξη και στην ικανότητα να μεθίστανται. Πιο πρόσφατα, η χωριστή έννοια της πλαστικότητας των καρκινικών κυττάρων, ή ενδομετατροπής αναγνωρίζεται στην βιβλιογραφία ως συμβολή στην ετερογένεια των κυττάρων του καρκίνου και στην εξέλιξη της κακοήθους νόσου (Gupta et al., 2009; Roesch et al., 2010). Το μοντέλο ενδομετατροπής αναφέρεται σε αναστρέψιμη μεταγωγή των καρκινικών κυττάρων μεταξύ περισσότερο και λιγότερο ενεργά κακοήθεις συμπεριφορές που μπορεί να σχετίζονται με φαινοτυπικές διακρίσεις και στις διαφορές στην ανταπόκριση της θεραπείας μεταξύ των κυττάρων. Στην πραγματικότητα είναι πιθανό ότι τουλάχιστον ορισμένοι καρκίνοι χρησιμοποιούν περισσότερα από ένα από αυτά τα μοντέλα σε διάφορα στάδια, ή ακόμα και ταυτόχρονα, κατά τη διάρκεια της εξέλιξής τους σε έναν ασθενή (Shackleton, 2010).

Από κλινική προοπτική, το μελάνωμα γενικά θεωρείται ότι είναι μια εξαιρετικά επιθετική μορφή καρκίνου, αν και ένα μικρό υποσύνολο των ασθενών με

μεταστατικό μελάνωμα έχει σχετικά βραδεία πορεία της νόσου (Tsao et al., 2004). Ιστολογικά, οι μπιώσεις είναι συχνά εμφανείς σε τμήματα των όγκων του μελανώματος (Ohsie et al., 2008). Υπό το πρίσμα αυτό, θα ήταν έκπληξη αν το μελάνωμα εξελισσόταν σύμφωνα με ένα μοντέλο στο οποίο τα ογκογόνα κύτταρα ήταν σπάνια. Ωστόσο, η κυτταρική ετερογένεια είναι επίσης ένα ιστολογικό χαρακτηριστικό πολλών μελανωμάτων, και μελέτες έκφρασης του δείκτη της κυτταρικής επιφάνειας δείχνουν ότι υπάρχουν πολλαπλοί, φαινοτυπικά διακριτοί υποπληθυσμοί κυττάρων του μελανώματος εντός του όγκου (Schattton et al., 2008).

Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στην κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων εξελίσσεται το μελάνωμα. Αυτή η κατανόηση οδήγησε στην πρόσφατη ανάπτυξη θεραπείας αυτής της νόσου, με προσέγγιση των BRAF αναστολέων (Flaherty et al., 2009), όπου οι οριστικές κλινικές δοκιμές βρίσκονται σε εξέλιξη. Ωστόσο, η αναγνώριση των μηχανισμών αντοχής στους αναστολείς BRAF (Emery et al., 2009), και το γεγονός ότι πολλά μελανώματα δεν φέρουν κατάλληλες μεταλλάξεις (Davies et al., 2002), δείχνουν ότι η πολλή δουλειά απομένει να γίνει στην κατανόηση της φύσης διάδοσης του μελανώματος.

Ενώ το μοντέλο CSC προσφέρει ελπίδα για βελτιωμένη θεραπεία ορισμένων μορφών καρκίνου με την εστίαση της έρευνας με στοχευμένες θεραπείες σε πληθυσμούς σπάνιων ογκογόνων κυττάρων, είναι προφανές ότι δεν ακολουθούν όλοι οι καρκίνοι ένα μοντέλο CSC. Αν και στοιχεία από προηγούμενες μελέτες πρότειναν ότι το μελάνωμα μπορεί να ακολουθήσει ένα μοντέλο CSC, πρόσφατες μελέτες σε πιο ανεκτικές δοκιμασίες ογκογένεσης υποστηρίζουν έντονα εναντίον αυτής της δυνατότητας. Η εστίαση των ερευνητικών προσπαθειών πρέπει να είναι σταθερές στην διαλεύκανση των μηχανισμών που προωθούν την ανάπτυξη, τη μετάσταση και της αντοχή στη θεραπεία, στα κύτταρα με πιθανότητα ογκογένεσης που είναι τόσο άφθονα σε αυτή τη νόσο (Shackleton and Quintana, 2010).

3.2.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΛΕΞΙΝΗΣ

Οι υποδοχείς πλεξίνης είναι μια οικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών τύπου I. (A-D) που προσδένονται σε semaphorins (Artigiani et al., 1999; Yazdani

and Terman, 2006; Perala et al., 2012). Το μελάνωμα είναι ένας άκρως επιθετικός όγκος που προέρχεται από τα μελανοκύτταρα, στα οποία η υπεριώδης ακτινοβολία παίζει σημαντικό επαγωγικό ρόλο. Έχει αναφερθεί πρόσφατα ότι η πλεξίνη C1 χάνεται σε κυτταρικές σειρές μελανώματος εν μέρει μέσω μεθυλίωσης του DNA, ενός κοινού μηχανισμού ευθυνόμενου για τη σίγηση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, και σε ένα μεγάλο πάνελ των πρωτογενών και μεταστατικών όγκων του μελανώματος (Scott et al., 2009; Lazova et al., 2009; Balakrishnan et al., 2009). Σχεδόν ολική απώλεια της έκφρασης της πλεξίνης C1 παρατηρήθηκε σε μεταστατικό μελάνωμα και σε πρωτογενές μελάνωμα με κλιμακούμενη απώλεια της πλεξίνης C1, όπου η έκφραση συσχετίζεται με το βάθος του όγκου της εισβολής. Σωματικές μεταλλάξεις mis-sense και απώλεια αριθμού των αντιγράφων της πλεξίνης C1 έχουν επίσης ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα (Balakrishnan et al., 2009). Λόγω του ότι η πλεξίνη C1 ρυθμίζει την κυτταροσκελετική αναδιαμόρφωση σε ανθρώπινα μελανοκύτταρα, η απώλειά της θα μπορούσε να προωθήσει την εξέλιξη του μελανώματος μέσω της επίδρασής της στην κυτταρική προσκόλληση και τη μετανάστευση. Στην έκθεση αυτή, καθορίζονται οι λειτουργικές επιπτώσεις της εισαγωγής της πλεξίνης C1 σε μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά μελανώματος που στερείται τον υποδοχέα, συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης της πλεξίνης C1 στην R-Ras και Rap1 δραστηριότητα των μελανοκυτταρικών. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ένα ρόλο για την πλεξίνη C1 ως πρωτεΐνη καταστολέα του όγκου στα πρώτα βήματα στην ανάπτυξη του μελανώματος, και υποδηλώνουν ότι η καταστολή της δραστηριότητας του R-Ras από την πλεξίνη C1 είναι ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο η πλεξίνη C1 μπλοκάρει στα πρώτα στάδια την εξέλιξη του μελανώματος (Chen et al., 2013).

Για την έρευνα αυτή επιλέχθηκαν NSG ποντίκια (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ). Ένα σύνολο 2×10^6 κύτταρα μελανώματος εγχύθηκαν υποδορίως στις αμφοτέρες πλευρές του κάθε ποντικού ($n = 5$). Η ανάπτυξη των όγκων παρακολουθήθηκε με εβδομαδιαία ψηλάφηση, και το μήκος και το πλάτος του όγκου (σε mm) μετρήθηκαν με παχύμετρο. Το μέγεθος του όγκου υπολογίστηκε ως 4π (μήκος \times πλάτος). Οι ποντικοί θανατώθηκαν 5

εβδομάδες μετά την ένεση και οι όγκοι συλλέχθηκαν, μετρήθηκαν και ζυγίστηκαν.

Μας ενδιαφέρει η πλεξίνη C1 επειδή εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε φυσιολογικά ανθρώπινα μελανοκύτταρα *in vitro* και *in vivo*, ρυθμίζει την πρόσφυση των μελανοκυττάρων και χάνεται σε μελάνωμα *in vivo*. Η έκφραση της πλεξίνης C1 ρυθμίζεται προς τα κάτω από χαμηλές δόσεις υπεριώδους-B ακτινοβολίας, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ρύθμιση της πλεξίνης C1 που εξαρτάται από την UV ακτινοβολία μπορεί να προωθήσει την έναρξη ή την εξέλιξη του μελανώματος. Ο σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να εξεταστεί η υπόθεση ότι η πλεξίνη C1 καταστέλλει την πρόοδο του μελανώματος. Στην έκθεση αυτή, δείχνουμε ότι η πλεξίνη C1 καθυστερεί την εξέλιξη του όγκου σε ξενομοσχεύματα στο ποντίκι, και μέσω από *in vitro* μελέτες έχουν καθορίσει ένα ρόλο για την πλεξίνη C1 στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης στο μελάνωμα (Chen et al., 2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

MITRG ΚΑΙ MISTRG ΠΟΝΤΙΚΟΙ

Μικρά ζωικά μοντέλα όπως ποντικοί χρησιμοποιούνται συχνά για τις *in vivo* μελέτες των θηλαστικών, ιδιαίτερα των ανθρώπινων ανοσοαποκρίσεων. Ωστόσο, υπάρχουν διαφορές στη λειτουργία του ανοσοποιητικού μεταξύ των ειδών και συχνά, η γνώση που αποκτάται από τις μελέτες του ποντικού δεν μπορεί να μεταφραστεί στον άνθρωπο (Mestas and Hughes, 2004; Rongvaux et al., 2013). Μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη μελέτη της λειτουργίας του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος *in vivo* είναι να χρησιμοποιούνται ανοσοανεπαρκείς ποντικοί που έχουν μεταμοσχευθεί με ανθρώπινα αιμοποιητικά αρχέγονα και προγονικά κύτταρα (Rongvaux et al., 2013; Shultz, 2012). Ωστόσο, η ανάπτυξη και η λειτουργία των διαφόρων τύπων κυττάρων του ανθρώπινου ανοσοποιητικού, όπως μονοκύτταρα, μακροφάγα και NK κύτταρα, είναι σε μεγάλο βαθμό ελαττωματική στα τωρινά διαθέσιμα μοντέλα εξανθρωπισμένων ποντικών (Rongvaux et al., 2013). Ειδικότερα, ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα είναι παρόντα σε χαμηλή συχνότητα (Tanaka et al., 2012; Li et al., 2013), και παρότι η έκθεση έδειξε ότι

τα κύτταρα αυτά είναι λειτουργικά (Tanaka et al., 2012), μια άλλη έκθεση εντόπισε λειτουργικές διαταραχές και ένα ανώριμο φαινότυπο των ανθρώπινων μονοκυττάρων (Gille et al., 2012), την ωρίμανση, τη λειτουργία και την ομοιόσταση των ανθρώπινων NK κυττάρων (Huntington et al., 2009; Strowig et al., 2010). Οι περιορισμοί αυτοί τονίζουν την ανάγκη να αναπτυχθούν εξανθρωπισμένα μοντέλα ποντικών με ένα πιο πλήρες και λειτουργικό έμφυτο ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα.

Τα ελαττώματα στην ανθρώπινη έμφυτη ανάπτυξη κυττάρων του ανοσοποιητικού στα υπάρχοντα εξανθρωπισμένα ποντίκια είναι πιο πιθανόν να οφείλεται σε περιορισμένη αντιδραστικότητα των κυτοκινών του ποντικού σε σχέση με αντίστοιχους υποδοχείς κυτοκινών των ανθρώπων (Manz, 2007). Αρκετές στρατηγικές για να παρακαμφθεί το ζήτημα αυτό με την παροχή ανθρώπινων κυτοκινών στον ξενιστή ποντικό έχουν περιγραφεί, (Willinger et al., 2011; Drake et al., 2012). Μερικά βασίζονται στη χορήγηση εξωγενών κυτοκινών (Huntingto et al., 2009), ή πλασμίδια που κωδικοποιούν κυτοκίνη (Li et al., 2013; Chen et al., 2012), ενώ άλλοι χρησιμοποιούν εισαχθέντα διαγονίδια που κωδικοποιούν τις ανθρώπινες κυτοκίνες (Nicolini et al., 2004; Brehm et al., 2012; Ito et al., 2013). Ωστόσο, υψηλές συστηματικές συγκεντρώσεις των κυτοκινών μπορεί να οδηγήσουν σε τεχνητά αποτελέσματα, όπως η κινητοποίηση και εξάντληση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (Nicolini et al., 2004).

Η προσέγγιση του να εισάγει ανθρώπινα γονίδια κυτοκινών για να αντικαταστήσει ομόλογα του ποντικού έχει το πλεονέκτημα της εξασφάλισης των κατάλληλων ιστών, κυττάρου και την πλαίσιο-ειδική έκφραση της ανθρώπινης κυτοκίνης (Willinger et al., 2011). Επιπλέον, στο σενάριο της ομόζυγης ανθρώπινης κυτοκίνης σε knockin ποντίκια, αν η ανθρώπινη κυτοκίνη δεν είναι πλήρως δραστική με τον αντίστοιχο υποδοχέα κυτοκίνης του ποντικού, στους πληθυσμούς των κυττάρων του ποντικού η σηματοδότηση εξαρτάται από την εν λόγω κυτοκίνη που μπορεί να εμφανίζουν αριθμητικά ή λειτουργικά ελαττώματα, αυτά τα ελαττώματα προσδίδουν ένα πρόσθετο ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στα μεταμοσχευμένα ανθρώπινα κύτταρα (Willinger et al., 2011). Αυτή η knock-in στρατηγική αντικατάστασης γονιδίου έχει χρησιμοποιηθεί για να εξανθρωπίσει αρκετά γονίδια που κωδικοποιούν κυτοκίνες. Για παράδειγμα, ο εξανθρωπισμός του

γονιδίου που κωδικοποιεί την θρομβοποιητίνη (THPO, επίσης γνωστή ως TPO) είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη συντήρηση λειτουργικών ανθρώπινων αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων ικανών για πολλαπλή διαφοροποίηση, τη διατήρηση της μακροχρόνιας υψηλής εμφύτευση στο μυελό των οστών (BM) και τη σειριακή μεταφύτευση (Rongvaux et al., 2011), εξανθρωπισμένων γονιδίων που κωδικοποιούν ιντερλευκίνη 3 (IL3) (Rathinam et al., 2011). Μολονότι κάθε μία από αυτές τις αντικαταστάσεις γονιδίου βελτίωσε την ανάπτυξη και τη λειτουργία των επιμέρους τύπων κυττάρων δεν είχαν σαν αποτέλεσμα ένα πλήρες και ισχυρό ανθρώπινο μυελομονοκυτταρικό σύστημα σε έναν ποντικό.

Η πλήρης μοντελοποίηση του συνόλου των ανθρώπινων μονοκυττάρων και μακροφάγων είναι σημαντική διότι τα μονοκύτταρα και μακροφάγα είναι σημαντικά στην ομοίωση των ιστών, την φλεγμονή και την ογκογένεση, και την απόκριση σε μολυσματικούς παράγοντες (Auffray et al., 2009; Chow et al., 2011). Δύο γενικές κατηγορίες μακροφάγων έχουν καθοριστεί με βάση το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης, και την δραστηριότητα που ασκούν (Sica et al., 2012) τους κλασικούς ενεργοποιημένους M1 υπότυπους οι οποίοι εμφανίζουν προφλεγμονώδη και μικροβιοκτόνο δραστηριότητα, και εναλλακτικώς τους ενεργοποιημένους M2 υποτύπους οι οποίοι χαρακτηρίζονται από ρόλο ανοσορυθμιστικό, αντιπαρασιτικό και το ρόλο επισκευής των ιστών. Τούτου λεχθέντος, αυτή η διχοτόμηση είναι πιθανώς μια υπεραπλούστευση, και πιθανόν να υπάρξει ένα φάσμα λειτουργικά διακριτών υποσυνόλων μακροφάγων. Ανεξάρτητα, τα M1-M2 παραδείγματα της διαφοροποίησης μακροφάγων σχετίζονται με ένα αριθμό ασθενειών του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου (Sica et al., 2012; Allavena and Mantovani, 2012; Qian and Pollard, 2010). Για παράδειγμα, M1-μακροφάγα διαποτιζόμενα εμφανίζουν αντικαρκινική δράση, ενώ M2-μακροφάγα στο μικροπεριβάλλον του όγκου προωθούν την ανάπτυξη του όγκου με την παροχή πολλαπλασιασμού, αντιαποπτωτικά σήματα και σήματα προαγγειογένεσης. Τα σήματα αυτά επιτρέπουν επίσης την έξοδο των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτογενή όγκο και σχηματισμό μεταστάσεων (Qian and Pollard, 2010; Coussens et al., 2013). Κλινικές παρατηρήσεις δείχνουν ότι μυελοειδή κύτταρα διηθούν διάφορους τύπους όγκων, και στις περισσότερες περιπτώσεις, η υψηλή πυκνότητα των διεισδυτικών

μακροφάγων συσχετίζεται με κακή πρόγνωση του ασθενή (Qian and Pollard, 2010; Bingle et al., 2002).

Η ανάπτυξη ενός εξανθρωπισμένου μοντέλου ποντικού για τη μελέτη αυτών και άλλων φαινομένων που σχετίζονται με ανθρώπινα μακροφάγα, μία συνέργεια μεταξύ πολλών εξανθρωπισμένων κυτοκινών θα επιτρέψει την πλήρη ανακεφαλαίωση της ανάπτυξης και λειτουργίας του ανθρώπινου μυελοειδούς στο ποντίκι. Ως εκ τούτου, δημιουργούνται ανοσοανεπαρκείς Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-} ποντικοί στα οποία τα γονίδια που κωδικοποιούν την ανθρώπινη M-CSF18, την ανθρώπινη ιντερλευκίνη 3 (IL-3) και την GM-CSF17, και την ανθρώπινη θρομβοποιητίνη είναι knocked in στους αντίστοιχους τόπους του ποντικού. Αυτοί οι ποντικοί ονομάζονται MITRG από τις κωδικοποιημένες πρωτείνες M-CSF, IL-3, GM-CSF και TPO στο Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-} υπόβαθρο. Ποντίκια MISTRG φέρουν επίσης ένα διαγονιδικό βακτηριακό τεχνητό χρωμόσωμα (BAC) που κωδικοποιεί την ανθρώπινη SIRPα (Strowig et al., 2011). Η SIRPα συνδέεται με τα CD47 και το προκύπτον σήμα καταστέλλει την φαγοκυττάρωση των CD47 που εκφράζουν τα κύτταρα. Επειδή τα ανθρώπινα CD47 εκφράζονται σε ανθρώπινα κύτταρα συνδέονται αποτελεσματικά με το διαγονιδικό BAC του ποντικού που κωδικοποιεί την ανθρώπινη SIRPα. Αυτό δίνει τη δυνατότητα στα φαγοκύτταρα του διαγονιδικού ποντικού να «ανεχθεί» και να μην φαγοκυτταρώσει τα μεταμοσχευμένα ανθρώπινα κύτταρα (Takenaka et al., 2007). MITRG και MISTRG ποντίκια επιτρέπουν ιδιαίτερα την ανθρώπινη αιματοποίηση. Συγκεκριμένα, τα ανθρώπινα μυελομονοκύτταρα παρουσιάζουν ποικιλομορφία και αριθμούς άνευ προηγουμένου σε όλα τα εξανθρωπισμένα μοντέλα ποντικών που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα και στενή ομοιότητα με εκείνα και τους ανθρώπους. Χρησιμοποιώντας αυτά τα ποντίκια, βρέθηκε ότι τα ανθρώπινα μονοκύτταρα δρουν ως πηγή της IL-15 trans-προσαγωγής, και να στηρίζουν την ανάπτυξη και τη λειτουργία των ανθρώπινων NK κυττάρων. Με την παροχή ενός πιο πλήρους και λειτουργικού μοντέλου του ανθρώπινου έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, τα MITRG και MISTRG ποντίκια μπορούν να επιτρέψουν την εφαρμογή των εξανθρωπισμένων ποντίκων σε νέους τομείς της μεταγραφικής έρευνας.

Τα υπάρχοντα εξανθρωπισμένα μοντέλα ποντικών δεν επιτρέπουν την αποτελεσματική ανάπτυξη των ανθρώπινων έμφυτων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Το μοντέλο MITRG και MISTRG που περιγράφεται εδώ υπερνικά αυτό το σημαντικό περιορισμό. Ως εκ τούτου, τα MITRG και MISTRG ποντίκια μπορούν να επιτρέψουν μοναδική μελέτη στα θεμελιώδη ερωτήματα σχετικά με τη βιολογία του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος, την in vivo μοντελοποίηση των ανθρώπινων ασθενειών και προκλινικές δοκιμές in vivo των νέων υποψήφιων φαρμάκων. Η υψηλή απόδοση της εμφύτευσης των ανθρώπινων αιμοποιητικών κυττάρων και εύρωστη ανάπτυξη των διαφόρων υποσυνόλων των έμφυτων ανθρώπινων ανοσοποιητικών κυττάρων σε MITRG και MISTRG ποντικούς οφείλεται στη συνεργιστική επίδραση των κυτοκινών που υποστηρίζουν διαδοχικά βήματα και πολλαπλές καταγωγές της ανθρώπινης αιμοποίησης καθώς και τη δευτερεύουσα παροχή επιπρόσθετων κυτοκινών από τα ίδια τα ανθρώπινα κύτταρα. Το γεγονός ότι τα MISTRG μπορεί να είναι αποτελεσματικά μεταμοσχευμένα χωρίς ακτινοβολία απεικονίζει το πλεονέκτημα της συνδυασμένης αντικατάστασης των πολλαπλών γονιδίων κυτοκίνης του ποντικού με τα αντίστοιχα ανθρώπινα. Η απουσία των κυτοκινών του ποντικού οδηγεί σε ελαττώματα στους κυτταρικούς πληθυσμούς του ποντικού (ιδίως στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και φαγοκύτταρα του ποντικού) και προκαλεί μια κατάσταση γενετικής προετοιμασίας. Τα MITRG και MISTRG ποντίκια θα διευκολύνουν την εμφύτευση των αιμοποιητικών κυττάρων που προέρχονται από το περιφερικό αίμα. Αυτό θα επιτρέψει την ανασύσταση ενός ανοσοποιητικού συστήματος που προέρχεται από ασθενή και μπορεί να επιτραπεί η μελέτη των χαμηλών-πολλαπλασιαστικής, πρωτογενών ανθρώπινων αιματοποιητικών κακοθηριών, όπως το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο ή η μυελοπολλαπλασιαστική νεοπλασία, ότι μέχρι στιγμής έχει αποδειχθεί δύσκολο να εμφυτευθούν αποτελεσματικά σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια (Thanopoulou et al., 2004; Wang et al., 2012).

Επιπλέον, ένα ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να συνδυαστεί με συν-μεταμόσχευση των νοσούντων ιστών από τον ίδιο δότη, αυτό μπορεί να είναι συναφές με αυτοάνοσα νοσήματα και τον καρκίνο. Αυτό θα δημιουργήσει ένα εξατομικευμένο μοντέλο στο οποίο η αλληλεπίδραση του ανοσοποιητικού

συστήματος του ασθενούς με τα καρκινικά κύτταρα ή οι αυτοάνοσοι ιστοί στόχοι ώστε να μπορέσουν να μελετηθούν *in vivo*. Επιπλέον, η επίδραση των φαρμάκων στο ανοσοποιητικό σύστημα και συν-μεταμοσχευμένων ιστών μπορούν να αξιολογηθούν βάσει των προκλινικών και η θεραπεία θα μπορούσε να είναι προσαρμοσμένη στον κάθε ασθενή με έναν εξατομικευμένο τρόπο. Μια επίπτωση των πειραμάτων ξενομοσχεύματος είναι ότι το αποτέλεσμα του φαρμάκου της αντικαρκινικής θεραπείας επηρεάζεται αισθητά από την παρουσία ή απουσία του ογκο-διηθητικού κυττάρου του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου. Ως εκ τούτου, ο ρόλος των μη καρκινικών κυττάρων, που περιλαμβάνουν αλλά δεν περιορίζονται σε ανθρώπινα μυελοειδή κύτταρα, θα πρέπει να εξετάζεται και να αξιολογείται προσεκτικά στην διαλογή των υποψήφιων αντικαρκινικών φαρμάκων.

Τα MITRG και MISTRG ποντίκια θα επιτρέψουν επίσης τη μελέτη του ανθρώπινου έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος σε οξείες και χρόνιες φλεγμονές, καθώς όπως και στην μολυσματική ασθένεια. Η λειτουργία των μονοκυττάρων ή μακροφάγων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον *in vivo* περιβάλλοντα που δεν μπορεί εύκολα να μοντελοποιηθεί σε *in vitro*. Για παράδειγμα, τα CD16 + μονοκύτταρα, τα οποία αναπτύσσονται στο μοντέλο MISTRG αλλά όχι σε άλλα εξανθρωπισμένα μοντέλα ποντικού, επεκτείνονται σε ανθρώπους σε φλεγμονώδεις ρυθμίσεις, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προκαλείται από λοίμωξη HIV και την αθυροσκλήρυνση (Wong et al., 2012). Ωστόσο, η λειτουργική σημασία των CD16 + μονοκυττάρων σε αυτές τις ρυθμίσεις είναι άγνωστη, τα MITRG και MISTRG ποντίκια μπορούν να επιτρέψουν τη διερεύνηση της αιτιώδους σχέσεις μεταξύ των CD16 + μονοκυττάρων και της ανθρώπινης φλεγμονώδους νόσου. Τα μακροφάγα είναι επίσης εμφανή σε ανθρώπους μολυσμένους με βακτήρια, συμπεριλαμβανομένου του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης (Ramakrishnan, 2012). Περαιτέρω βελτιώσεις της προσαρμοστικής λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος σε MITRG και MISTRG ποντίκια θα πρέπει να επιτρέψει τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ανθρώπινων μακροφάγων, τα CD4 + T κύτταρα και του *M. tuberculosis in vivo*. Πρότυπα μη εξανθρωπισμένα ποντίκια δεν αντιπροσώπουν αυτό το σύμπλοκο ανθρώπινης ασθένειας πιστά. Άλλα θεμελιώδη ερωτήματα που μπορούν να

απαντηθούν με τη χρήση των MITRG και MISTRG μοντέλα ποντικών περιλαμβάνουν τα οντογενικής προέλευσης των μακροφάγων ιστού έναντι προερχόμενων από μονοκύτταρα μακροφάγα (Schulz et al., 2012), τη διακίνηση αυτών των κυττάρων ως αντίδραση στη φλεγμονή ή μόλυνση, και οι μηχανισμοί της διαφοροποίησης και της τελεστής λειτουργία των M1 έναντι των M2 μακροφάγων (Martinez et al., 2013).

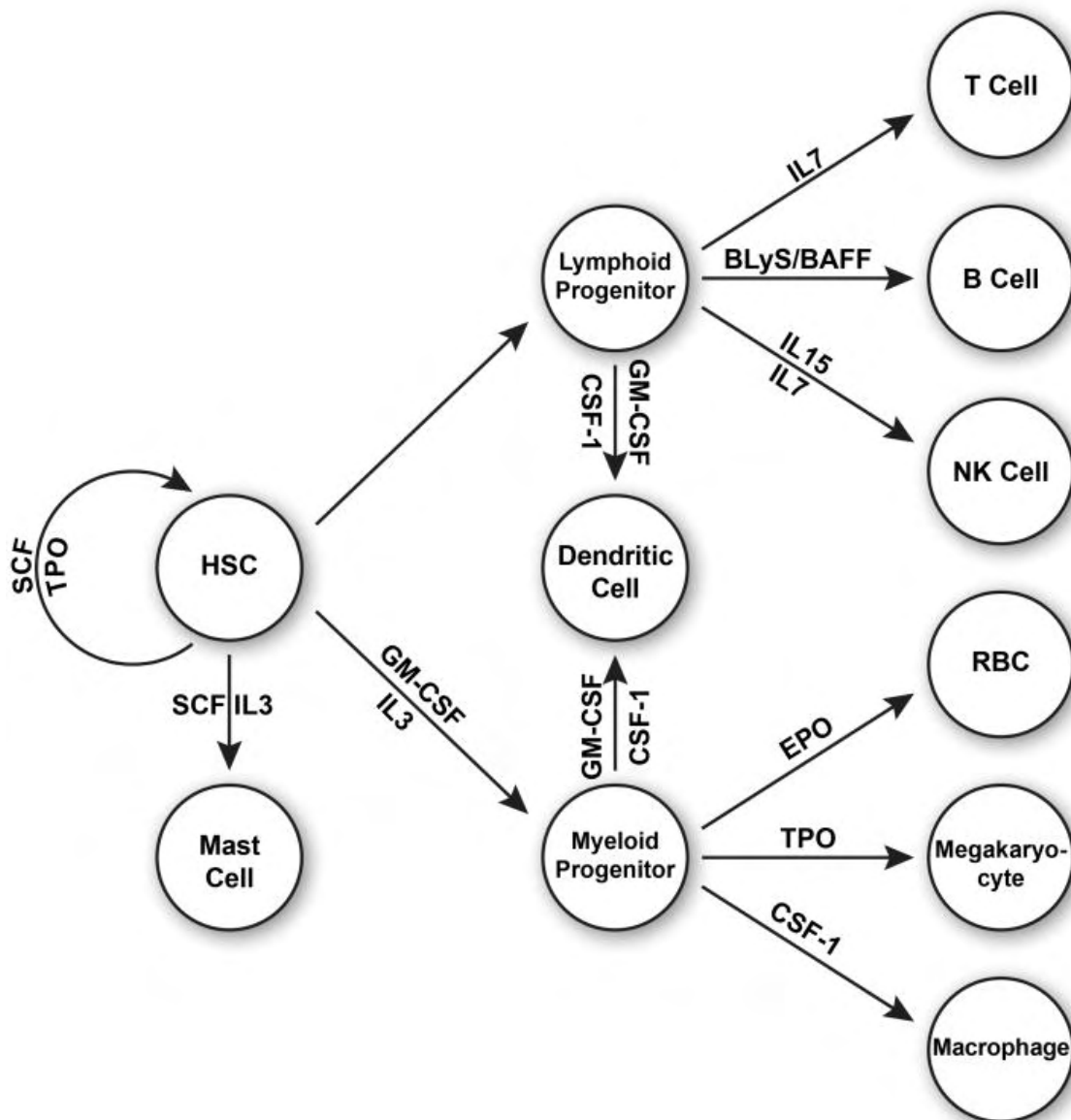
Τέλος, οι ποντικοί MISTRG θα επιτρέψουν τη μελέτη του ρόλου των ανθρώπινων κυττάρων NK in vivo, για παράδειγμα, στο πλαίσιο του καρκίνου και ιικών λοιμώξεων (Jost and Altfeld, 2013). Παρά το γεγονός ότι τα ποντίκια MISTRG αντιπροσωπεύουν μια σημαντική βελτίωση σε σχέση με τα υπάρχοντα εξανθρωπισμένα μοντέλα ποντικών, έχουν επίσης δύο μειονεκτήματα. Πρώτον, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η ανάπτυξη και η επιβίωση ερυθρών αιμοσφαιρίων ποντικού και ανθρώπου είναι αναντίστοιχα σε MITRG και MISTRG ποντίκια. Αυτό το πρόβλημα θα πρέπει να αντιμετωπιστεί στο μέλλον από τη γενετικές στρατηγικές είτε στο να προστατεύσουν τα RBCs του ποντικού από φαγοκυττάρωση από τα ανθρώπινα κύτταρα ή να υποστηρίξουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των ανθρώπινων ερυθροκυττάρων. Ο άλλος περιορισμός των MITRG και MISTRG ποντικών, παρόμοια με άλλα μοντέλα, είναι σχετικά οι αδύναμες προσαρμοστικές ανοσιακές αποκρίσεις τους, με χαμηλές κυτταροτοξικές και χυμικές ανοσοαποκρίσεις, ιδιαίτερα μία χαμηλή συχνότητα των σωματικών υπερμεταλλάξεων και ταξική μεταγωγή σε B κύτταρα. Η προσαρμοστική ανοσία μπορεί να βελτιωθεί με διάφορες προσεγγίσεις, συμπεριλαμβανομένων την έκφραση των ανθρώπινων MHC στοιχείων σε ποντικούς ή τη χρήση του BM ήπαρ-θύμου προσέγγιση, στην οποία ανθρώπινος εμβρυϊκός ιστούς μεταμοσχεύεται μαζί με τα ανθρώπινα CD34 + κύτταρα (Lan et al., 2006; Melkus et al., 2006). Η προσέγγιση BM-ήπατος-θύμου καταλήγει σε περισσότερο εύρωστες προσαρμοστικές ανοσιακές αποκρίσεις, επειδή τα T κύτταρα αναπτύσσονται και επιλέγονται σε ένα ανθρώπινο θυμικό ιστό. Μια μη αμοιβαία αποκλειστική προσέγγιση εξανθρωπισμού επιπλέον γονιδίων κυτταροκινών σε ποντίκια ξενιστές. Με το συνδυασμό πολλαπλών στρατηγικών, μοντέλα εξανθρωπισμένων ποντικών μπορούν να ανακεφαλαιώσουν πλήρως λειτουργικό έμφυτο ανθρώπινο ανοσοποιητικό και τις προσαρμοστικές ανοσοαποκρίσεις. Τέτοια μοντέλα

ποντικών μπορεί να επιτρέψουν μια ευρύτερη ποικιλία βασικών και προκλινική έρευνα εφαρμογών.

ΚΑΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ

Τα νέα μοντέλα που έχουν περιγραφεί και χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της ανθρώπινης ανοσίας είναι μόνο η αρχή της επόμενης γενιάς των εξανθρωπισμένων ποντίκων που θα είναι σύντομα διαθέσιμα. Εναπομένουσες προκλήσεις είναι να δημιουργηθούν νέα στελέχη ποντικών που απαιτούνται για την περαιτέρω ενίσχυση της ανθρώπινης ανοσίας με μειωμένη την έμφυτη ανοσία του ποντικού (εικόνα) (Shultz et al., 2007; Ito et al., 2012).



Οι κυτοκίνες εκφράζονται σε διαγονιδιακά στελέχη *IL2γnull* με ανοσοανεπάρκεια

Υπόμνημα: Ανθρώπινες κυτοκίνες, οι οποίες είναι, ή βρίσκονται υπό ανάπτυξη, που εκφράζονται σε διαγονιδιακά στελέχη *IL2γnull* με ανοσοανεπάρκεια για να ενισχυθεί η ανθρώπινη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων και η ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και η λειτουργία. SCF, παράγοντας αρχέγονων κυττάρων, TPO, θρομβοποιητίνη, HSC, αιματοποιητικών βλαστικών κυττάρων, GM-CSF, παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων μακροφάγων, IL3, ιντερλευκίνη 3, EPO, ερυθροποιητίνη, CSF-1, παράγοντας διέγερσης αποικιών-1, BlyS / BAFF, B παράγοντας διέγερσης λεμφοκυττάρων / B κυττάρων ενεργοποίηση, IL7, ιντερλευκίνη 7, IL15, ιντερλευκίνη 15.

Ένα κρίσιμο ζήτημα που απομένει είναι η περιορισμένη ανάπτυξη των λεμφαδένων στα ανοσοανεπαρκή *Il2rgnull* ποντίκια. Παρόλο που μεσεντέρια λεμφογάγγλια αναπτύσσονται, άλλοι περιφερικοί λεμφαδένες είναι μικροί με λίγη ή καθόλου λεμφοειδή οργάνωση (Vuuyugu et al., 2012). Τρέχουσες προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση αυτού, περιλαμβάνουν την χορήγηση της ανθρώπινης IL-7, το οποίο είναι κρίσιμο στην νεογνική ωρίμανση της λέμφου, (Chappaz and Finke, 2010), και την παροχή ανθρώπινου αντι-αγωνιστή υποδοχέα λεμφοτοξίνης β κατά τη διάρκεια μιας κρίσιμης πρώιμης ωρίμανσης στην ανάπτυξη του λεμφαδένα (Rennert et al., 1998). Ένας από τους ατελής κυτταρικούς πληθυσμούς στους *Il2rgnull* ποντικούς είναι ο λεμφοειδής ιστός-επαγωγέας κυτάρου, ο οποίος απαιτείται για τον σχηματισμό του λεμφαδένα και του λεμφοειδούς ιστού που σχετίζεται με το έντερο. Οι προσπάθειες για τον εντοπισμό των προσεγγίσεων για την ενίσχυση της ανάπτυξης αυτών των κυτταρικών πληθυσμών συνεχίζεται.

Ένας άλλος περιορισμός που αντιμετωπίζεται είναι η παραγωγή ανοσοανεπαρκών *Il2rgnull* HLA διαγονιδιακών ποντικών που αντιπροσωπεύουν πολλά από τα κοινά των οικογενειών HLA τάξης I (Greiner et al., 2011). Για τη μελέτη της αυτοανοσίας, τα HLA τάξης II NSG διαγονιδιακά ποντίκια αναπτύσσονται. Αυτά τα νέα μοντέλα θα διευκολύνουν τις έρευνες του διαβήτη τύπου 1, της σκλήρυνσης κατά πλάκας και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, τις αυτοάνοσες διαταραχές που συνδέονται ισχυρά με αλληλόμορφα HLA τάξης II. Για τη μελέτη των ανθρώπινων NK κυτάρων, τα NSG-HLA διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν το HLA-B27, τα οποία είναι σημαντικά στην αδειοδότηση (licensing) των NK κυτάρων, είναι υπό μελέτη. Η χρήση των HLA διαγονιδιακών ποντικών με συνέκφραση της IL-7 ή και του BAFF μπορεί να αυξήσει τη λειτουργία των T και B κυτάρων, αντίστοιχα, και την ενίσχυση των ανοσοαποκρίσεων. Ξεπερνώντας την κακή προσαρμοστική χυμική ανοσολογική απάντηση σε εξανθρωπισμένα ποντίκια θα οδηγήσει σε πιο αποτελεσματικά μοντέλα για δοκιμές εμβολίων.

Οι επιπρόσθετες τροποποιήσεις που απαιτούνται για τις μελέτες των μολυσματικών παραγόντων που απαιτούν κυκλοφορούντα ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια ή τα ηπατοκύτταρα ως μέρος αποικισμού για τον κύκλο ζωής τους, όπως το *Plasmodium falciparum*, το οποίο υποχρεωτικά χρησιμοποιεί στα στάδια του και τα δύο, τα ηπατοκύτταρα και τα ερυθρά

αιμοσφαίρια. Τα μακροφάγα του ποντικού είναι ένα σημαντικό εμπόδιο για την επιβίωση των ανθρώπινων ερυθροκυττάρων σε ποντίκια NSG και η εξάντληση των μακροφάγων του ποντικού επιτρέπει την ενισχυμένη ανάπτυξη και την επιβίωση των περιφερειακών ανθρώπινων ερυθροκυττάρων σε BLT ποντίκια (Hu et al., 2011). Εναλλακτικά, η μελέτη της μόλυνσης από τον ιό της ηπατίτιδας B και C σε παρουσία ενός ανοσοποιητικού συστήματος απαιτεί την παρουσία των ανθρώπινων ηπατοκυττάρων και των ερυθροκυττάρων στα εξανθρωπισμένα ποντίκια. Μία προσέγγιση για την επίτευξη του στόχου αυτού ήταν να εμφυτευθούν ανθρώπινα ηπατοκύτταρα εμβρυϊκού ήπατος και αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα σε έναν παραλήπτη με ανοσοανεπάρκεια με πρόσθετες γενετικές τροποποιήσεις που προκαλείται από βλάβη των υποδοχέων των κυττάρων του ήπατος. Τόσο το ανθρώπινο ήπαρ όσο και το ανοσοποιητικό σύστημα αναπτύσσεται, και τα ποντίκια υποστηρίζουν τη λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας C (Washburn et al., 2011).

Για σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, απαιτείται κατάλληλη διακίνηση των ανθρώπινων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος σε μη λεμφοειδείς ιστούς. Λόγω των διαφορών συγκεκριμένων ειδών στα μόρια προσκόλλησης και σε πιθανές ασυμβατότητες του ζεύγους υποδοχέα-συνδέτη, τα αυτοκατευθυνόμενα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα μπορεί να μην εμφανιστούν σωστά σε ανοσοανεπαρκείς ποντικούς. Για παράδειγμα, υπάρχουν γνωστές διαφορές συγκεκριμένων ειδών στην ποντικού / ανθρώπου λειτουργία των λεμφοκυττάρων που σχετίζεται με το αντιγόνο 1 (LFA-1) και το διακυτταρικό μόριο-1 προσφύσεως (ICAM-1).

Ένα από τα τελευταία εμπόδια στην καθιέρωση μιας πλήρους ανθρώπινης χίμαιρας είναι η ανικανότητα ενός αριθμού ανθρώπινων αιμοποιητικών κυτταρικών σειρών, συμπεριλαμβανομένων των κοκκιοκυττάρων, των αιμοπεταλίων και των ερυθρών αιμοσφαιρίων, να κυκλοφορούν καταλλήλως στην κυκλοφορία του ποντικού ξενιστή. Όταν ο ξενιστής ποντικός προετοιμάζεται επαρκώς για να αντικαταστήσει ουσιαστικά όλο το μυελό των οστών του με ανθρώπινα αιμοποιητικά κύτταρα, το ποντίκι πεθαίνει, και πιθανόν ο θάνατός του να οφείλεται σε σοβαρή αναιμία ή και σε μεγάλο βαθμό σε μειωμένα επίπεδα των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων και των κοκκιοκυττάρων (Takagi et al., 2012). Μολονότι τα ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια και κοκκιοκύτταρα προγονικών κυττάρων

ανιχνεύονται στο μυελό των οστών, λίγοι από αυτούς τους πληθυσμούς κυττάρων βρίσκονται στην κυκλοφορία, πιθανόν λόγω της απομάκρυνσης τους από τα μακροφάγα της κυκλοφορίας του ποντικού (Rozemuller et al., 2004).

Η ποικιλία των στελεχών εξανθρωπισμένων μοντέλων, οι διαφορές στις προσεγγίσεις στον ενοφθαλμισμό ανθρώπινων κυττάρων και ιστών, καθώς και οι διάφορες τεχνολογικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία της επόμενης γενιάς ανοσοανεπαρκών *Il2rgnull* ποντικών οδηγεί στο κλειδί της προειδοποίησης για τη χρήση των εξανθρωπισμένων ποντικών για τη μελέτη της ανθρώπινης ανοσολογίας. Πειράματα με τη χρήση εξανθρωπισμένων ποντικών, ή οποιοδήποτε συστήματος ζωικού μοντέλου, πρέπει να σχεδιαστεί για να αντιμετωπίσει ένα μηχανιστικό ερώτημα, αντί να προσπαθούν να ανακεφαλαιώσουν πλήρως την ανθρώπινη βιολογική διαδικασία ή παθολογία. Με αυτές τις επισημάνσεις κατά νου, εξανθρωπισμένα ποντίκια είναι ολοένα και περισσότερο σημαντικά εργαλεία στη μεταγραφική βιοϊατρική έρευνα, επιτρέποντας γνώσεις σχετικά με την κατανόηση μας για την ανθρώπινη αιμοποίηση, την έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία, την αυτοανοσία, την μολυσματική ασθένεια και την ανοσολογία του καρκίνου (Shultz et al., 2012).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Allan B. Haberman (2010) *Animal Models for Therapeutic Strategies Fifth Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union*, Commission of the European Communities, published November 2007

Allavena, P. & Mantovani, A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin. Exp. Immunol.* 167, 195–205 (2012).

Andre, RG, RA Wirtz, and YT Das (1989). "Insect Models for Biomedical Research". In: *Nonmammalian Animal Models for Biomedical Research*, AD Woodhead (Editor), CRC Press: Boca Raton, FL. Retrieved November 13, 2008.

Anthony Rongvaux, Tim Willinger, Jan Martinek, Till Strowig, Sofia V Gearty, Lino L Teichmann, Yasuyuki Saito, Florentina Marches, Stephanie Halene, A Karolina Palucka, Markus G Manz & Richard A Flavell (March 2014), "Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model", Nature Biotechnology, doi:10.1038/nbt.2858.

Arnold L, Tyagi RK, et al. Further improvements of the *P. falciparum* humanized mouse model. PloS One. 2011;6(3):e18045. [PubMed]

Artandi SE, DePinho RA. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. Curr Opin Genet Dev. 2000;10:39–46. doi: 10.1016/S0959-437X(99)00047-7. [PubMed]

Artigiani S, Comoglio PM, Tamagnone L. Plexins semaphorins, and scatter factor receptors: a common root for cell guidance signals? IUBMB Life. 1999;48:477–482. [PubMed]

Asao H, Okuyama C, Kumaki S, Ishii N, Tsuchiya S, Foster D, Sugamura K (July 2001). "Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex". J. Immunol. 167 (1): 1–5. PMID 11418623.

Atkinson M, Leiter EH 1999. The NOD mouse model of insulin dependent diabetes: As good as it gets? Nat Med 5: 601–604. [PubMed]

Auffray, C., Sieweke, M.H. & Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. 27, 669–692 (2009).

Aurandt J, Vikis HG, Gutkind JS, Ahn N, Guan KL. The semaphorin receptor plexin-B1 signals through a direct interaction with the Rho-specific nucleotide exchange factor, LARG. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:12085–12090. [PubMed]

Azuma H, Paulk N, Ranade A, Dorrell C, Al-Dhalimy M, Ellis E et al. Robust expansion of human hepatocytes in Fah2/2/Rag22/2/Il2rg2/2 mice. Nat Biotechnol 2007; 25: 903–910.

Bailey SM, Murnane JP. Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:2408–2417. doi: 10.1093/nar/gkl303. [PubMed]

Balakrishnan A, Penachioni JY, Lamba S, Bleeker FE, Zanon C, Rodolfo M, et al. Molecular profiling of the "plexinome" in melanoma and pancreatic cancer. *Hum Mutat.* 2009;30:1167–1174. [PubMed]

Bankert, R. B., N. K. Egilmez, S. D. Hess. 2001. *Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies.* *Trends Immunol.* 22: 386-393.

Bankert, R. B., S. D. Hess, N. K. Egilmez. 2002. *SCID mouse models to study human cancer pathogenesis and approaches to therapy: potential, limitations, and future directions.* *Front. Biosci.* 7: c44-c62.

Barberis D, Casazza A, Sordella R, Corso S, Artigiani S, Settleman J, et al. p190 Rho-GTPase activating protein associates with plexins and it is required for semaphorin signalling. *J Cell Sci.* 2005;118(Part 20):4689–4700. [PubMed]

Barton WA, Himanen JP, Antipenko A, Nikolov DB. Structures of axon guidance molecules and their neuronal receptors. *Adv Protein Chem.* 2004;68:65–106. [PubMed]

Beatriz M. Carreno, Joel R. Garbow, Grant R. Kolar, Erin N. Jackson, John A. Engelbach, Michelle Becker-Hapak, Leonidas N. Carayannopoulos, David Piwnicka-Worms and Gerald P. Linette. IMMUNE-DEFICIENT MOUSE STRAINS DISPLAY MARKED VARIABILITY IN GROWTH OF HUMAN MELANOMA LUNG METASTASES. *Clin Cancer Res.* Author manuscript; available in PMC May 15, 2010. Published in final edited form as: *Clin Cancer Res.* May 15, 2009; 15(10): 3277–3286. Published online May 15, 2009. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2502.

Becker PD, Legrand N, et al. Generation of human antigen-specific monoclonal IgM antibodies using vaccinated human immune system mice. *PloS One.* 2010;5:10. [PubMed]

Becker, P.D. et al. *PLoS ONE* 5, e13137 (2010).

Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:961–976. doi: 10.1016/j.biocel.2004.10.013. [PubMed]

Berges BK, Akkina SR, et al. Mucosal transmission of R5 and X4 tropic HIV-1 via vaginal and rectal routes in humanized Rag2^{-/-}gammac^{-/-}(RAG-hu) mice. *Virology.* 2008;373(2):342–351. [PubMed]

Berges BK, Rowan MR. The utility of the new generation of humanized mice to study HIV-1 infection: transmission, prevention, pathogenesis, and treatment. *Retrovirology.* 2011;8:65. [PubMed]

Bernink, J.H. et al. *Nat. Immunol.* 14, 221–229 (2013).

Bingle, L., Brown, N.J. & Lewis, C.E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* 196, 254–265 (2002).

Bissig KD, Wieland SF, Tran P, Isogawa M, Le TT, Chisari FV et al. Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest* 2010; 120: 924–930.

Biswas S, Chang H, et al. Humoral immune responses in humanized BLT mice immunized with West Nile virus and HIV-1 envelope proteins are largely mediated via human CD5+ B cells. *Immunology.* 2011;134(4):419–433. [PubMed]

Blasco MA. Telomerase beyond telomeres. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:627–633. doi: 10.1038/nrc862. [PubMed]

Bortolomai I, Canevari S, Facetti I, De Cecco L, Castellano G, Zacchetti A, Alison MR, Miotti S. Tumor initiating cells: Development and critical characterization of a model derived from the A431 carcinoma cell line forming spheres in suspension. *Cell Cycle.* 2010;9[PubMed]

Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature.* 1983;301:527–530. [PubMed]

Brehm, M.A. et al. Engraftment of human HSCs in nonirradiated newborn NOD-scid IL2rgamma null mice is enhanced by transgenic expression of membrane-bound human SCF. *Blood* 119, 2778–2788 (2012).

Broderick, L., S. J. Yokota, J. Reineke, E. Mathiowitz, C. C. Stewart, M. Barcos, R. J. Kelleher, Jr, R. B. Bankert. 2005. *Human CD4⁺ effector memory T cells persisting in the microenvironment of lung cancer xenografts are activated by local delivery of IL-12 to proliferate, produce IFN- γ , and eradicate tumor cells.* J. Immunol.174: 898-906.

Cao X, Shores EW, Hu-Li J et al. (1995). "Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain". *Immunity* 2 (3): 223–38.doi:10.1016/1074-7613(95)90047-0. PMID 7697543.

Carreno BM, Garbow JR, Kolar GR, Jackson EN, Engelbach JA, Becker-Hapak M, Carayannopoulos LN, Piwnica-Worms D, Linette GP. Immunodeficient mouse strains display marked variability in growth of human melanoma lung metastases. *Clin Cancer Res.* 2009 May 15;15(10):3277-86. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2502. Epub 2009 May 15.

Chappaz S, Finke D. The IL-7 signaling pathway regulates lymph node development independent of peripheral lymphocytes. *J Immunol.* 2010;184:3562–3569. [PubMed]

Chen Y, Soong J, Mohanty S, Xu L, Scott G. The neural guidance receptor Plexin C1 delays melanoma progression. *Oncogene.* 2013 Oct 10;32(41):4941-9. doi: 10.1038/onc.2012.511. Epub 2012 Nov 19.

Chen, Q., Khoury, M. & Chen, J. Expression of human cytokines dramatically improves reconstitution of specific human-blood lineage cells in humanized mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 21783–21788 (2009).

Chow, A., Brown, B.D. & Merad, M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 788–798 (2011).

Coffelt SB, Chen YY, Muthana M, et al. Angiopoietin 2 stimulates TIE2-expressing monocytes to suppress T cell activation and to promote regulatory T cell expansion. *J Immunol.* 2011;186(7):4183–4190. [PubMed]

Collins K. Physiological assembly and activity of human telomerase complexes. *Mech Ageing Dev.* 2008;129:91–98. doi: 10.1016/j.mad.2007.10.008. [PubMed]

Comeau MR, Johnson R, DuBose RF, Petersen M, Gearing P, VandenBos T, et al. A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor. *VESPR Immunity.* 1998;8:473–482. [PubMed]

Coussens, L.M., Zitvogel, L. & Palucka, A.K. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science* 339, 286–291 (2013).

Couzin-Frankel J 2011. Clinical studies. Trying to reset the clock on type 1 diabetes. *Science* 333: 819–821 [PubMed]

Cox J, Mota J, et al. Mosquito bite delivery of dengue virus enhances immunogenicity and pathogenesis in humanized mice. *J. Virol.* 2012;86(14):7637–7649. [PubMed]

Dale L. Greiner, Michael A. Brehm, Vishnu Hosur, David M. Harlan, Alvin C. Powers, and Leonard D. Shultz. Humanized mice for the study of type 1 and type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* Author manuscript; available in PMC Dec 1, 2012. Published in final edited form as: *Ann N Y Acad Sci.* Dec 2011; 1245: 55–58. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06318.x

Dallas NA, Xia L, Fan F, Gray MJ, Gaur P, van Buren G, Samuel S, Kim MP, Lim SJ, Ellis LM. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res.* 2009;69:1951–1957. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2023. [PubMed]

Daniel, V. C. et al. A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer Res.* 69, 3364–3373 (2009).

Danner R, Chaudhari SN, Rosenberger J, Surls J, Richie TL, Brumeanu TD et al. Expression of HLA class II molecules in humanized NOD.Rag1KO.IL2RgckO mice is critical for development and function of human T and B cells. *PLoS One* 2011; 6:e19826.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417:949–954. [PubMed]

Davis LS, Sackler M, Brezinschek RI, Lightfoot E, Bailey JL, Oppenheimer-Marks N, Lipsky PE 2002. Inflammation, immune reactivity, and angiogenesis in a severe combined immunodeficiency model of rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 160: 357–367. [PubMed]

Di Lorenzo TP, Peakman M, Roep BO 2007. Translational mini-review series on type 1 diabetes: Systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clin Exp Immunol* 148: 1–16. [PubMed]

Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008;112:4793–4807.[PubMed]

Diego Serrano, Anne-Marie Bleau, [...], and Alfonso Calvo. Inhibition of telomerase activity preferentially targets aldehyde dehydrogenase-positive cancer stem-like cells in lung cancer. *Mol Cancer*. 2011 Aug 9;10:96. doi: 10.1186/1476-4598-10-96

Drake, A.C., Chen, Q. & Chen, J. Engineering humanized mice for improved hematopoietic reconstitution. *Cell. Mol. Immunol.* 9, 215–224 (2012).

Dustin, M. L., A. R. de Fougères. 2001. Reprogramming T cells: the role of extracellular matrix in coordination of T cell activation and migration. Curr. Opin. Immunol. 13: 286-290.

Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, Sawyer AM, Niu L, Kim JJ, Hatton C, Chopra R, Oberholzer PA, Karpova MB, MacConaill LE, Zhang J, Gray NS, Sellers WR, Dummer R, Garraway LA. MEK1 mutations confer resistance to

MEK and B-RAF inhibition. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:20411–20416. [PMC free article] [PubMed]

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 1990;61:759–767. [PubMed]

Firoz Mian M, Pek EA, et al. Humanized mice are susceptible to *Salmonella typhi* infection. Cell. Mol. Immunol. 2011;8(1):83–87. [PubMed]

Flaherty K, Puzanov I, Sosman J, Kim K, Ribas A, McArthur G, Lee RJ, Grippo JF, Nolop P, Chapman P. Phase 1 study of PLX4032: Proof of concept for V600E BRAF mutation as a therapeutic target in human cancer. J Clin Oncol. 2009;27(suppl) abstr 9000.

Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. Genet Res. 1966 Dec; 8(3):295-309

Foulds L. The natural history of cancer. J Chronic Dis. 1958;8:2–37. [PubMed]

Giger RJ, Hollis ER, 2nd, Tuszynski MH. Guidance molecules in axon regeneration. Cold Spring Harbor Perspect Biol. 2010;2:a001867. [PubMed]

Gille, C. et al. Monocytes derived from humanized neonatal NOD/SCID/IL2Rgamma(null) mice are phenotypically immature and exhibit functional impairments. Hum. Immunol. 73, 346–354 (2012).

Giovanella, B. C. et al. DNA topoisomerase I-targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts. Science 246, 1046–1048 (1989).

Goldblatt EM, Gentry ER, Fox MJ, Gryaznov SM, Shen C, Herbert BS. The telomerase template antagonist GRN163L alters MDA-MB-231 breast cancer cell morphology, inhibits growth, and augments the effects of paclitaxel. Mol Cancer Ther. 2009;8:2027–2035. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-1188. [PubMed]

Greiner DL, et al. Humanized mice for the study of type 1 and type 2 diabetes. Ann N Y Acad Sci. 2011;1245:55–58. [PubMed]

Greiner DL, Hesselton RA, Shultz LD (1998). "SCID mouse models of human stem cell engraftment". *Stem Cells* 16 (3): 166–177. doi:10.1002/stem.160166. PMID 9617892.

Greiner DL, Rossini AA, Mordes JP 2001. Translating data from animal models into methods for preventing human autoimmune diabetes mellitus: *Caveat emptor* and *primum non nocere*. *Clin Immunol* 100: 134–143 [PubMed]

Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med.*2009;15:1010–1012. [PubMed]

Haridass D, Yuan Q, Becker PD, Cantz T, Iken M, Rothe M et al. Repopulation efficiencies of adult hepatocytes, fetal liver progenitor cells, and embryonic stem cell-derived hepatic cells in albumin-promoter-enhancer urokinase-type plasminogen activator mice. *Am J Pathol* 2009; 175: 1483–1492.

Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res.* 1991;256:271–282. [PubMed]

Hasegawa M, Kawai K, Mitsui T, Taniguchi K, Monnai M, Wakui M et al. The reconstituted 'humanized liver' in TK-NOG mice is mature and functional. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 405: 405–410.

He Z, Zhang H, et al. Liver xeno-repopulation with human hepatocytes in *Fah^{-/-}Rag2^{-/-}* mice after pharmacological immunosuppression. *Am. J. Pathol.* 2010;177(3):1311–1319. [PubMed]

Henthorn PS, Somberg RL, Fimiani VM, Puck JM, Patterson DF, Felsburg PJ (September 1994). "IL-2R gamma gene microdeletion demonstrates that canine X-linked severe combined immunodeficiency is a homologue of the human disease". *Genomics* 23 (1): 69–74. doi:10.1006/geno.1994.1460. PMID 7829104.

Hergen Spits. New models of human immunity. *NATURE BIOTECHNOLOGY* VOLUME 32 NUMBER 4 APRIL 2014

Hess, S. D., N. K. Egilmez, N. Bailey, T. M. Anderson, E. Mathiowitz, S. H. Bernstein, R. B. Bankert. 2003. *Human CD4⁺ T cells present within the microenvironment of human lung tumors are mobilized by the local and sustained release of IL-12 to kill tumors in situ by indirect effects of IFN- γ* . *J. Immunol.* 170:400-412.

Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T, Ito M, Kobayashi K, Katamura K et al. Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD341 cells using the NOD/ SCID/ccnull mice model. *Blood* 2003; 102: 873–880.

Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene.* 1999;18(38):5356–5362. [PubMed]

<http://emice.nci.nih.gov/aam/mouse/how-and-why-mouse-cancer-models-are-used>

<http://emice.nci.nih.gov/generating-models/mouse-cancer-models-1>

http://en.wikipedia.org/wiki/Common_gamma_chain

<http://jaxmice.jax.org/strain/005557.html>

<http://research.jax.org/mousegenetics/advantages/advantages-of-mouse.html>

<http://research.jax.org/mousegenetics/advantages/genetic-background-effects.html>

<http://www.unitedhealthgroup.com>

<http://www.who.int/diabetes/en/>

Hu S, Parmet Y, Allen G, Parker DF, Ma F, Rouhani P, Kirsner RS. Disparity in melanoma: a trend analysis of melanoma incidence and stage at diagnosis among whites, Hispanics, and blacks in Florida. *Arch Dermatol.* 2009;145:1369–1374. [PubMed]

Hu Z, Van RN, Yang YG. Macrophages prevent human red blood cell reconstitution in immunodeficient mice. *Blood.* 2011;118:5938–5946. [PubMed]

Huang RL, Teo Z, Chong HC, et al. ANGPTL4 modulates vascular junction integrity by integrin signaling and disruption of intercellular VE-cadherin and claudin-5 clusters. *Blood.* 2011;118(14):3990–4002. [PubMed]

Huntington, N.D. et al. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 206, 25–34 (2009).

Ibe, S., Z. Qin, T. Schuler, S. Preiss, T. Blankenstein. 2001. *Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions.* *J. Exp. Med.* 194: 1549-1559.

Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S et al. Novel mouse xenograft models reveal a critical role of CD41 T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002326.

Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor c chain null mice. *Blood* 2005; 106: 1565–1573.

Ito R, Katano I, Kawai K, Hirata H, Ogura T, Kamisako T et al. Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. *Transplantation* 2009; 87: 1654–1658.

Ito R, Takahashi T, Katano I, Ito M. Current advances in humanized mouse models. *Cell Mol Immunol.* 2012;9:208–214. [PubMed]

Ito, R. et al. Establishment of a human allergy model using human IL 3/GM-CSF transgenic NOG mice. *J. Immunol.* 191, 2890–2899 (2013).

Jaiswal S, Pazoles P, et al. Enhanced humoral and HLA-A2-restricted dengue virus-specific T-cell responses in humanized BLT NSG mice. *Immunology.* 2012;136(3):334–343. [PubMed]

Jamieson BD, Zack JA. Murine models for HIV disease. *AIDS.* 1999;13(Suppl A):S5–S11. [PubMed]

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009;59:225–249. doi: 10.3322/caac.20006. [PubMed]

Jimenez-Diaz MB, Mulet T, Viera S, Gomez V, Garuti H, Ibanez J et al. Improved murine model of malaria using *Plasmodium falciparum* competent strains and nonmyelodepleted NOD-scid IL2Rc null mice engrafted with human erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4533–4536.

John J. Tentler, Aik Choon Tan, Colin D. Weekes, Antonio Jimeno, Stephen Leong, Todd M. Pitts, John J. Arcaroli, Wells A. Messersmith & S. Gail Eckhardt (2012) Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development *Nature Reviews Clinical Oncology* 9, 338-350 (June 2012) | doi:10.1038/nrclinonc.2012.61

Johnson, J. I. et al. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br. J. Cancer* 84, 1424–1431 (2001).

Jost, S. & Altfeld, M. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 163–194 (2013).

Ketao Jin, Lisong Teng, Yanping Shen, Kuifeng He, Zhenzhen Xu, Guangliang Li Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review *Clinical and Translational Oncology* July 2010, Volume 12, Issue 7, pp 473-480

King M, Pearson T, Shultz LD, Leif J, Bottino R, Trucco M, Atkinson MA, Wasserfall C, Herold KC, Woodland RT, et al. 2008. A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor γ chain gene. *Clin Immunol* 126: 303–314. [PubMed]

King MA, Covassin L, Brehm MA, Racki W, Pearson T, Leif J et al. Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin- 2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clin Exp Immunol* 2009; 157: 104–118.

King MA, Covassin L, Brehm MA, Racki W, Pearson T, Leif J, Laning J, Fodor W, Foreman O, Burzenski L, et al. 2009. Hu-PBL-NOD-*scid* *IL2rg*^{null} mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host MHC. *Clin Exp Immunol* 157: 104–118. [PubMed]

Kitchen SG, Bennett M, Galic Z, Kim J, Xu Q, Young A, Lieberman A, Joseph A, Goldstein H, Ng H, et al. 2009. Engineering antigen-specific T cells from genetically modified human hematopoietic stem cells in immunodeficient mice. *PLoS ONE* 4: e8208. [PubMed]

Kong YC, Flynn JC, Banga JP, David CS. Application of HLA class II transgenic mice to study autoimmune regulation. *Thyroid*. 2007;17:995–1003.

Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 324: 133–148.

Kuruvilla JG, Troyer RM, et al. Dengue virus infection and immune response in humanized RAG2(-/-)gamma(c)(-/-) (RAG-hu) mice. *Virology*. 2007;369(1):143–152. [PubMed]

Kwant-Mitchell A, Ashkar AA, et al. Mucosal innate and adaptive immune responses against herpes simplex virus type 2 in a humanized mouse model. *J. Virol*. 2009;83(20):10664–10676. [PubMed]

Lallier TE. Semaphorin profiling of periodontal fibroblasts and osteoblasts. *J Dent Res*. 2004;83:677–682. [PubMed]

Lan, P., Tonomura, N., Shimizu, A., Wang, S. & Yang, Y.G. Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation. *Blood* 108, 487–492 (2006).

Lantuejoul S, Raynaud C, Salameire D, Gazzeri S, Moro-Sibilot D, Soria JC, Brambilla C, Brambilla E. Telomere maintenance and DNA damage responses during lung carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 2010;16:2979–2988. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0142. [PubMed]

Lantuejoul S, Salon C, Soria JC, Brambilla E. Telomerase expression in lung preneoplasia and neoplasia. *Int J Cancer*. 2007;120:1835–1841. doi: 10.1002/ijc.22473. [PubMed]

Lazova R, Gould Rothberg BE, Rimm D, Scott G. The semaphorin 7A receptor Plexin C1 is lost during melanoma metastasis. *Am J Dermatopathol*. 2009;31:177–181. [PubMed]

Lee, E.-C. et al. *Nat. Biotechnol.* 32, 356–363 (2014).

Legrand N, Ploss A, et al. Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook. *Cell Host Microbe*. 2009;6(1):5–9. [PubMed]

Leonard D. Shultz, Michael A. Brehm, J. Victor Garcia, and Dale L. Greiner. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol*. Author manuscript; available in PMC Aug 22, 2013. Published in final edited form as: *Nat Rev Immunol*. Nov 2012; 12(11): 786–798. Published online Oct 12, 2012. doi: 10.1038/nri3311

Li, Y. et al. Induction of functional human macrophages from bone marrow promonocytes by M-CSF in humanized mice. *J. Immunol*. 191, 3192–3199 (2013).

Libby SJ, Brehm MA, et al. Humanized nonobese diabetic-scid IL2rgammanull mice are susceptible to lethal *Salmonella typhi* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107(35):15589–15594. [PubMed]

Liu H, Juo ZS, Shim AH, Focia PJ, Chen X, Garcia KC, et al. Structural basis of semaphorin-plexin recognition and viral mimicry from Sema7A and A39R complexes with PlexinC1. *Cell*. 2010;142:749–761. [PubMed]

Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:675–699. [PubMed]

Lonberg, N. *Nat. Biotechnol*. 23, 1117–1125 (2005).

Mamoru Ito, Hidefumi Hiramatsu, Kimio Kobayashi, Kazutomo Suzue, Mariko Kawahata, Kyoji Hioki, Yoshito Ueyama, Yoshio Koyanagi, Kazuo Sugamura, Kohichiro Tsuji, Toshio Heike, and Tatsutoshi Nakahata. *NOD/SCID γ formula mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells*. Home November 1, 2002; *Blood*: 100 (9)

Manz, M.G. Human-hemato-lymphoid-system mice: opportunities and challenges. *Immunity* 26, 537–541 (2007).

Manz, M.G. *Immunity* 26, 537–541 (2007).

Marian CO, Cho SK, McEllin BM, Maher EA, Hatanpaa KJ, Madden CJ, Mickey BE, Wright WE, Shay JW, Bachoo RM. The telomerase antagonist, imetelstat, efficiently targets glioblastoma tumor-initiating cells leading to decreased proliferation and tumor growth. *Clin Cancer Res.* 2010;16:154–163. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2850. [PubMed]

Martin A, Kimura H, Thung S, Fong P, Shultz LD, Davies TF 1992. Characteristics of long-term human thyroid peroxidase autoantibody secretion in scid mice transplanted with lymphocytes from patients with autoimmune thyroiditis. *Int Arch Allergy Immunol* 98: 317–323. [PubMed]

Martinez, F.O. et al. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* 121, e57–e69 (2013).

Martino G, Anastasi J, Feng J, Mc Shan C, DeGroot L, Quintans J et al. The fate of human peripheral blood lymphocytes after transplantation into SCID mice. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1023–1028.

Mazzieri R, Pucci F, Moi D, et al. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell.* 2011;19(4):512–526. [PubMed]

McCawley, L. J., L. M. Matrisian. 2001. *Tumor progression: defining the soil round the tumor seed.* *Curr. Biol.* 11: R25-R27.

McCune J, Kaneshima H, Krowka J, Namikawa R, Outzen H, Peault B et al. The SCIDhu mouse: a small animal model for HIV infection and pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 399–429

McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science.* 1988;241:1632–1639. [PubMed]

McCune JM. Development and applications of the SCID-hu mouse model. *Sem. Immunol.* 1996;8(4):187–196. [PubMed]

McLellan, J.S. et al. *Science* 342, 592–598 (2013).

Melkus MW, Estes JD, et al. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nat. Med.* 2006;12(11):1316–1322. [PubMed]

Melkus MW, Estes JD, et al. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nat. Med.* 2006;12(11):1316–1322. [PubMed]

Melkus, M.W. et al. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nat. Med.* 12, 1316–1322 (2006).

Messina A, Ferraris N, Wray S, Cagnoni G, Donohue DE, Casoni F, et al. Dysregulation of Semaphorin7A/beta1-integrin signaling leads to defective GnRH-1 cell migration, abnormal gonadal development and altered fertility. *Hum Mol Genet.* 2011;20:4759–4774. [PubMed]

Mestas, J. & Hughes, C.C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* 172, 2731–2738 (2004).

Michael A. Brehm, Alvin C. Powers, [...], and Dale L. Greiner. Advancing Animal Models of Human Type 1 Diabetes by Engraftment of Functional Human Tissues in Immunodeficient Mice. *Cold Spring Harb Perspect Med* May 2012 ; 2(5) a007757

Michael A. Brehm, Alvin C. Powers, Leonard D. Shultz, and Dale L. Greiner. Advancing Animal Models of Human Type 1 Diabetes by Engraftment of Functional Human Tissues in Immunodeficient Mice *Cold Spring Harb Perspect Med.* May 2012; 2(5): a007757. doi: 10.1101/cshperspect.a007757

Michelle R. Simpson-Abelson, Gregory F. Sonnenberg, Hiroshi Takita, Sandra J. Yokota, Thomas F. Conway Jr., Raymond J. Kelleher Jr., Leonard D. Shultz, Maurice Barcos and Richard B. Bankert. Long-Term Engraftment and Expansion of Tumor-Derived Memory T Cells Following the Implantation of Non-Disrupted Pieces of Human Lung Tumor into NOD-scid IL2Ry^{null} Mice: doi: 10.4049/jimmunol.180.10.7009 *The Journal of Immunology* May 15, 2008 vol. 180 no. 10 7009-7018.

Michelle R. Simpson-Abelson, Gregory F. Sonnenberg, Hiroshi Takita, Sandra J. Yokota, Thomas F. Conway Jr., Raymond J. Kelleher Jr., Leonard D. Shultz, Maurice Barcos and Richard B. Bankert. Long-Term Engraftment and Expansion of Tumor-Derived Memory T Cells Following the Implantation of Non-Disrupted Pieces of Human Lung Tumor into NOD-scid IL2Ry^{null} Mice.

doi: 10.4049/jimmunol.180.10.7009 The Journal of Immunology May 15, 2008 vol. 180 no. 10 7009-7018

Mikami-Terao Y, Akiyama M, Yuza Y, Yanagisawa T, Yamada O, Yamada H. Antitumor activity of G-quadruplex-interactive agent TMPyP4 in K562 leukemic cells. *Cancer Lett.* 2008;261:226–234. doi: 10.1016/j.canlet.2007.11.017. [PubMed]

Mikolajczak SA, Sacci JB Jr, de la Vega P, Camargo N, VanBuskirk K, Krzych U et al. Disruption of the *Plasmodium falciparum* liver-stage antigen-1 locus causes a differentiation defect in late liver-stage parasites. *Cell Microbiol* 2011; 13: 1250– 1260.

Molckovsky A, Siu LL. First-in-class, first-in-human phase I results of targeted agents: highlights of the 2008 American society of clinical oncology meeting. *J Hematol Oncol.*2008;1:20. doi: 10.1186/1756-8722-1-20. [PubMed]

Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell.* 1992;68:869–877. [PubMed]

Moran, N. *Nat. Biotechnol.* 31, 267–268 (2013).

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

Mosier DE. Human xenograft models for virus infection. *Virology.* 2000;271(2):215–219. [PubMed]

Namikawa R, Kaneshima H, Lieberman M, Weissman IL, McCune JM. Infection of the SCID-hu mouse by HIV-1. *Science* 1988; 242: 1684–1686.

Negishi M, Oinuma I, Katoh H. R-ras as a key player for signaling pathway of plexins. *Mol Neurobiol.* 2005;32:217–222. [PubMed]

Nicolini, F.E., Cashman, J.D., Hogge, D.E., Humphries, R.K. & Eaves, C.J. NOD/ SCID mice engineered to express human IL-3, GM-CSF and Steel factor constitutively mobilize engrafted human progenitors and compromise human stem cell regeneration. *Leukemia* 18, 341–347 (2004).

Nischang M, Gers-Huber G, et al. Modeling HIV infection and therapies in humanized mice. *Swiss Med. Wkly.* 2012;142:13618. [PubMed]

Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, Tsang M, Cao X, Leonard WJ (December 1993). "Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor". *Science* 262 (5141): 1877–80. doi:10.1126/science.8266077. PMID 8266077.

Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol.* 2008;35:433–444. [PubMed]

Oinuma I, Kato H, Negishi M. Semaphorin 4D/Plexin-B1-mediated R-Ras GAP activity inhibits cell migration by regulating beta(1) integrin activity. *J Cell Biol.* 2006;173:601–613.

Okada S, Harada H, Ito T, Saito T, Suzu S. Early development of human hematopoietic and acquired immune systems in new born NOD/Scid/Jak3null mice intrahepatic engrafted with cord blood-derived CD341 cells. *Int J Hematol* 2008; 88: 476–482.

Parsons CH, Adang LA, et al. KSHV targets multiple leukocyte lineages during long-term productive infection in NOD/SCID mice. *J. Clin. Invest.* 2006;116(7):1963–1973. [PubMed]

Pasterkamp K, Okuno T, Yamamoto M, Pasterkamp RJ, Takegahara N, Takamatsu H, et al. Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin. *Nature.* 2007;446:680–684. [PubMed]

Pasterkamp RJ, Peschon JJ, Spriggs MK, Kolodkin AL. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature.* 2003;424:398–405. [PubMed]

Pearson T, Greiner DL, Shultz LD 2008a. Creation of “humanized” mice to study human immunity. *Curr Protoc Immunol Chap. 15: Unit 15.12.* [PubMed]

Pearson T, Greiner DL, Shultz LD. Humanized SCID mouse models for biomedical research. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2008;324:25–51

Pearson T, Markees TG, Wicker LS, Serreze DV, Peterson LB, Mordes JP, Rossini AA, Greiner DL 2003. NOD congenic mice genetically protected from

autoimmune diabetes remain resistant to transplantation tolerance induction. *Diabetes* 52: 321–326. [PubMed]

Pearson T, Shultz LD, Lief J, Burzenski L, Gott B, Chase T, Foreman O, Rossini AA, Bottino R, Trucco M, et al. 2008b. A new immunodeficient hyperglycaemic mouse model based on the *Ins2^{Akita}* mutation for analyses of human islet and β stem and progenitor cell function. *Diabetologia* 51: 1449–1456. [PubMed]

Perala N, Sariola H, Immonen T. More than nervous: the emerging roles of plexins. *Differentiation*. 2012;83:77–91. [PubMed]

Petersen JS, Marshall MO, Baekkeskov S, Hejnaes KR, Hoier-Madsen M, Dyrberg T 1993. Transfer of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus associated autoimmunity to mice with severe combined immunodeficiency (SCID). *Diabetologia* 36: 510–515. [PubMed]

Philippi C, Loretz B, Schaefer UF, Lehr CM. Telomerase as an emerging target to fight cancer--opportunities and challenges for nanomedicine. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2010;146:228–240. [PubMed]

Puschel AW. GTPases in semaphorin signaling. *Adv Exp Med Biol*. 2007;600:12–23. [PubMed]

Qian, B.Z. & Pollard, J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51 (2010).

Ramakrishnan, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 352–366 (2012).

Ramesh Akkina. New generation humanized mice for virus research: Comparative aspects and future prospects. *Virology*. Author manuscript; available in PMC Feb 23, 2014. Published in final edited form as: *Virology*. Jan 5, 2013; 435(1): 14–28. doi: 10.1016/j.virol.2012.10.007

Ramesh Akkina. New generation humanized mice for virus research: Comparative aspects and future prospects. *Virology*. Jan 5, 2013; 435(1):14-28

Rathinam, C. et al. Efficient differentiation and function of human macrophages in humanized CSF-1 mice. *Blood* 118, 3119–3128 (2011).

Reddy, S., D. Piccione, H. Takita, R. B. Bankert. 1987. Human lung tumor growth established in the lung and subcutaneous tissue of mice with severe combined immunodeficiency. Cancer Res. 47: 2456-2460.

Rennert PD, James D, Mackay F, Browning JL, Hochman PS. Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor. *Immunity*. 1998;9:71–79. [PubMed]

Rickinson AB, Kieff E. Epstein–Barr virus. In: Knipe DM, Howley PM (eds.) *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011: 2575–2628.

Roep BO 2007. Are insights gained from NOD mice sufficient to guide clinical translation? Another inconvenient truth. *Ann NY Acad Sci* 1103: 1–10. [PubMed]

Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, Zabierowski SE, Brafford PA, Vultur A, Basu D, Gimotty P, Vogt T, Herlyn M. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell*. 2010;141:583–594. [PubMed]

Rongvaux, A. et al. Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential for medicine. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 635–674 (2013).

Rongvaux, A. et al. Human thrombopoietin knockin mice efficiently support human hematopoiesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 2378–2383 (2011).

Rongvaux, A. et al. *Nat. Biotechnol.* 32, 364–372 (2014).

Rongvaux, A.A. et al. *Annu. Rev. Immunology* 31,635–674 (2013).

Rozemuller H, et al. Enhanced engraftment of human cells in RAG2/gammac double-knockout mice after treatment with CL2MDP liposomes. *Exp Hematol*. 2004;32:1118–1125. [PubMed]

Russell SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P, Friedmann MC, Miyajima A, Puri RK, Paul WE (December 1993). "Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor". *Science* 262(5141): 1880–3. doi:10.1126/science.8266078. PMID 8266078.

Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Dynamics of memory and naïve CD81 T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2R^{cn} mice infected with CCR5- tropic HIV-1. *Vaccine* 8 2010; Suppl 2, B32–37.

Sato K, Misawa N, Nie C, Satou Y, Iwakiri D, Matsuoka M et al. A novel animal model of Epstein–Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood* 2011; 117: 5663–5673.

Sato Y, Takata H, Kobayashi N, Nagata S, Nakagata N, Ueno T et al. Failure of effector function of human CD81 T cells in NOD/SCID/JAK3/ immunodeficient mice transplanted with human CD341 hematopoietic stem cells. *PLoS One* 2010; 5: e13109.

Sauerwein RW, Roestenberg M, Moorthy VS. Experimental human challenge infections can accelerate clinical malaria vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 57–64.

Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Sayegh MH, Frank MH. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*. 2008;451:345–349. [PubMed]

Schulz, C. et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336, 86–90 (2012).

Scott GA, McClelland LA, Fricke AF, Fender A. Plexin C1, a receptor for semaphorin 7a, inactivates cofilin and is a potential tumor suppressor for melanoma progression. *J Invest Dermatol*. 2009;129:954–963. [PubMed]

Scott GA, McClelland LA, Fricke AF. Semaphorin 7a promotes spreading and dendricity in human melanocytes through beta1-integrins. *J Invest Dermatol.* 2008;128:151–161. [PubMed]

Seimiya H, Oh-hara T, Suzuki T, Naasani I, Shimazaki T, Tsuchiya K, Tsuruo T. Telomere shortening and growth inhibition of human cancer cells by novel synthetic telomerase inhibitors MST-312, MST-295, and MST-1991. *Mol Cancer Ther.* 2002;1:657–665. [PubMed]

Shackleton M, Quintana E. Progress in understanding melanoma propagation. *Mol Oncol.* 2010 Oct;4(5):451-7. doi: 10.1016/j.molonc.2010.06.006. Epub 2010 Jun 23.

Shackleton M. Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. *Semin Cancer Biol.* 2010 In press. [PubMed]

Shafee N, Smith CR, Wei S, Kim Y, Mills GB, Hortobagyi GN, Stanbridge EJ, Lee EY. Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in Brca1/p53-mediated mouse mammary tumors. *Cancer Res.* 2008;68:3243–3250. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5480. [PubMed]

Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA, Wong KK, Brandstetter K, Wittner B, Ramaswamy S, Classon M, Settleman J. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell.* 2010;141:69–80. [PubMed]

Shultz LD, Brehm MA, et al. Humanized mice as a preclinical tool for infectious disease and biomedical research. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2011;1245:50–54. [PubMed]

Shultz, L.D., Brehm, M.A., Garcia-Martinez, J.V. & Greiner, D.L. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 786–798 (2012).

Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol.*2007;7:118–130. [PubMed]

Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Gillies SD, King M, Mangada J, Greiner DL, et al. 2005. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-*scid* *IL2rg*^{null} mice engrafted with mobilized human hematopoietic stem cell. *J Immunol* 174: 6477–6489. [PubMed]

Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW et al. (1995). "Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-*scid* mice". *J. Immunol.* 154 (1): 180–91. PMID 7995938.

Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795 (2012).

Smith MS, Goldman DC, et al. Granulocyte-colony stimulating factor reactivates human cytomegalovirus in a latently infected humanized mouse model. *Cell Host Microbe.* 2010;8(3):284–291. [PubMed]

Song J, Willinger T, Rongvaux A, Eynon EE, Stevens S, Manz MG et al. A mouse model for the human pathogen *Salmonella typhi*. *Cell Host Microbe* 2010; 8: 369–376.

Staeva-Vieira T, Peakman M, von Herrath M 2007. Translational mini-review series on type 1 diabetes: Immune-based therapeutic approaches for type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 148: 17–31 . [PubMed]

Stoddart CA, Maidji E, et al. Superior human leukocyte reconstitution and susceptibility to vaginal HIV transmission in humanized NOD-*scid* *IL-2R* γ ($-/-$) (NSG) BLT mice. *Virology.* 2011;417(1):154–160. [PubMed]

Strowig T, Gurer C, et al. Priming of protective T cell responses against virus-induced tumors in mice with human immune system components. *J. Exp. Med.* 2009;206(6):1423–1434. [PubMed]

Strowig, T. et al. Human NK cells of mice with reconstituted human immune system components require preactivation to acquire functional competence. *Blood* 116, 4158–4167 (2010).

Strowig, T. et al. Transgenic expression of human signal regulatory protein alpha in *Rag2* $-/-$ *gamma(c)* $-/-$ mice improves engraftment of human hematopoietic cells in humanized mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 13218–13223 (2011).

Sugiyama, Y., M. Kato, F. A. Chen, S. S. Williams, Y. Kawaguchi, K. Miya, Y. S. Jong, E. Mathiowitz, N. K. Egilmez, R. B. Bankert. 2001. *Human inflammatory cells within the tumor microenvironment of lung tumor xenografts*

mediate tumor growth suppression in situ that depends on and is augmented by interleukin-12. J. Immunother. 24: 37-45.

Takagi S, et al. Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. Blood. 2012;119:2768–2777. [PubMed]

Takenaka K, Prasolava TK, Wang JC, Mortin-Toth SM, Khalouei S, Gan OI et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. Nat Immunol 2007; 8: 1313–1323.

Takenaka, K. et al. Nat. Immunol. 8, 1313–1323 (2007).

Takenaka, K. et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. Nat. Immunol. 8, 1313–1323 (2007).

Takizawa H, Manz MG. Macrophage tolerance: CD47-SIRP-a-mediated signals matter. Nat Immunol 2007; 8: 1287–1289.

Tanaka, S. et al. Development of mature and functional human myeloid subsets in hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2rgammaKO mice. J. Immunol. 188, 6145–6155 (2012).

Tanja Holopainen, Pipsa Saharinen, Gabriela D'Amico, Anita Lampinen, Lauri Eklund, Raija Sormunen, Andrey Anisimov, Georgia Zarkada, Marja Lohela, Hanna Heloterä, Tuomas Tammela, Laura E. Benjamin, Seppo Ylä-Herttuala, Ching Ching Leow, Gou Young Koh, and Kari Alitalo. Effects of Angiopoietin-2-Blocking Antibody on Endothelial Cell–Cell Junctions and Lung Metastasis. J Natl Cancer Inst. Mar 21, 2012; 104(6): 461–475. Published online Feb 17, 2012. doi: 10.1093/jnci/djs009

Thanopoulou, E. et al. Engraftment of NOD/SCID-beta2 microglobulin null mice with multilineage neoplastic cells from patients with myelodysplastic syndrome. Blood 103, 4285–4293 (2004).

The ethics of research involving animals. Nuffield Council on Bioethics. 2005. Retrieved 2008-07-16.

Tighe H, Silverman GJ, Kozin F, Tucker R, Gulizia R, Peebles C, Lotz M, Rhodes G, Machold K, Mosier DE, et al. 1990. Autoantibody production by severe combined immunodeficient mice reconstituted with synovial cells from rheumatoid arthritis patients. Eur J Immunol 20: 1843–1848. [PubMed]

Tlsty, T. D.. 2001. Stromal cells can contribute oncogenic signals. Semin. Cancer Biol. 11: 97-104.

Tonomura N, Habiro K, et al. Antigen-specific human T-cell responses and T cell-dependent production of human antibodies in a humanized mouse model. *Blood*. 2008;111(8):4293–4296. [PubMed]

Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti JC, Lanzavecchia A et al. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 2004; 304: 104–107.

Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med*.2004;351:998–1012. [PubMed]

Uesugi K, Oinuma I, Katoh H, Negishi M. Different requirement for Rnd GTPases of R-Ras GAP activity of Plexin-C1 and Plexin-D1. *J. Biol Chem*. 2009;284:6743–6751.

van Rijn RS, Simonetti ER, Hagenbeek A, Hogenes MC, de Weger RA, Canninga-van Dijk MR et al. A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG22/2 cc2/2 doublemutant mice. *Blood* 2003; 102: 2522–2531.

Vendrame F, Pileggi A, Laughlin E, Allende G, Martin-Pagola A, Molano RD, Diamantopoulos S, Standifer N, Geubtner KA, Falk BA, et al. 2010. Recurrence of type 1 diabetes after simultaneous pancreas-kidney transplantation, despite immunosuppression, is associated with autoantibodies and pathogenic autoreactive CD4 T-cells. *Diabetes* 59: 947–957. [PubMed]

Villaudy J, Wencker M, et al. HTLV-1 propels thymic human T cell development in human immune system Rag2(-)/(-) gamma c(-)/(-) mice. *PLoS Pathog*. 2011;7(9):e1002231. [PubMed]

Von HM, Nepom GT 2009. Animal models of human type 1 diabetes. *Nat Immunol* 10: 129–132 [PubMed]

Vuyyuru R, Patton J, Manser T. Human immune system mice: current potential and limitations for translational research on human antibody responses. *Immunol Res*. 2011;51:257–266. [PubMed]

Walzer T, Galibert L, De Smedt T. Dendritic cell function in mice lacking Plexin C1. *Int Immunol*. 2005;17:943–950. [PubMed]

Wang Y, He H, Srivastava N, Vikarunnessa S, Chen Y-b, Jiang J, et al. Plexins are GTPase-activating proteins for Rap and are activated by induced dimerization. *Sci Signal*. 2012;5:ra6.

Wang, X. et al. Spleens of myelofibrosis patients contain malignant hematopoietic stem cells. *J. Clin. Invest*. 122, 3888–3899 (2012).

Washburn ML, Bility MT, et al. A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology*. 2011;140(4):1334–1344. [PubMed]

Washburn ML, et al. A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology*. 2011;140:1334–1344. [PubMed]

Watanabe Y, Takahashi T, Okajima A, Shiokawa M, Ishii N, Katano I et al. The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/scid/ccnull (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int Immunol* 2009; 21: 843–858.

Weatherhead SC, Haniffa M, Lawrence CM. Melanomas arising from naevi and de novo melanomas--does origin matter? *Br J Dermatol*. 2007;156:72–76. [PubMed]

Wege AK, Florian C, et al. Leishmania major infection in humanized mice induces systemic infection and provokes a nonprotective human immune response. *PLoS Neglected Trop. Dis*. 2012;6(7):e1741. [PubMed]

Weinstein IB, Joe A. Oncogene addiction. *Cancer Res*. 2008;68:3077–3080. discussion 3080. [PubMed]

Whitfield-Larry F, Young EF, Talmage G, Fudge E, Azam A, Patel S, Largay J, Byrd W, Buse J, Calikoglu AS, et al. 2011. HLA-A2-matched peripheral blood mononuclear cells from type 1 diabetic patients, but not nondiabetic donors, transfer insulinitis to NOD-*scid*/ γ c^{null}/HLA-A2 transgenic mice concurrent with the expansion of islet-specific CD8⁺ T cells. *Diabetes* 60: 1726–1733. [PubMed]

Williams, S. S., F. A. Chen, H. Kida, S. Yokata, K. Miya, M. Kato, M. P. Barcos, H. Q. Wang, T. Alosco, T. Umemoto, et al 1996. *Engraftment of*

human tumor-infiltrating lymphocytes and the production of anti-tumor antibodies in SCID mice. J. Immunol. 156: 1908-1915.

Willinger T, Rongvaux A, Strowig T, Manz MG, Flavell RA. Improving human hematolymphoid-system mice by cytokine knock-in gene replacement. Trends Immunol 2011; 32: 321–327.

Willinger, T., Rongvaux, A., Strowig, T., Manz, M.G. & Flavell, R.A. Improving human hemato-lymphoid-system mice by cytokine knock-in gene replacement. Trends Immunol. 32, 321–327 (2011).

Wong VC, Ma J, Hawkins CE. Telomerase inhibition induces acute ATM-dependent growth arrest in human astrocytomas. Cancer Lett. 2009;274:151–159. doi: 10.1016/j.canlet.2008.09.012. [PubMed]

Wong, K.L. et al. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. Immunol. Res. 53, 41–57 (2012).

Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H et al. A new humanized mouse model of Epstein–Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. J Infect Dis 2008; 198: 673–682.

Yamamoto I, Takajo I, et al. Multiple integrations of human T-lymphotropic virus type 1 proviruses in the engrafted cells from the asymptomatic carriers in NOD/SCID/gammacnull mice. Intervirology. 2010;53(4):229–239. [PubMed]

Yazdani U, Terman JR. The semaphorins. Genome Biol. 2006;7:211.

Yu CI, Gallegos M, et al. Broad influenza-specific CD8+ T-cell responses in humanized mice vaccinated with influenza virus vaccines. Blood. 2008;112(9):3671–3678. [PubMed]

Zhang L, Meissner E, Chen J, Su L. Current humanized mouse models for studying human immunology and HIV-1 immuno-pathogenesis. Sci China Life Sci 2010; 53:195–203.

Zhou XL, Sullivan GJ, et al. Humanized murine model for HBV and HCV using human induced pluripotent stem cells. Arch. Pharmacol Res. 2012;35(2):261–269. [PubMed]