WITOLD N. NOWAK, IZABELLA NOWORYTA, GRZEGORZ SOKOŁOWSKI,
ALICJA JÓZKOWICZ

*Zakład Biotechnologii Medycznej
Wydział Biochemii Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Gronostajowa 7, 30-387 Kraków
Email: alicja.jozkowicz@uj.edu.pl*

MYSZY HUMANIZOWANE – ZASTOSOWANIE DO MODELOWANIA CHOROÓB ZAKAŻNYCH

WPROWADZENIE

Poznanie biologicznych podstaw fizjologii człowieka nie byłoby możliwe bez badań na zwierzętach laboratoryjnych. Mimo ogromnych możliwości jakie zapewniają hodowle komórek prowadzone *in vitro*, a zwłaszcza hodowle organoidów, doświadczenia na zwierzętach są wciąż niezbędne dla zrozumienia patofizjologii chorób i bardzo pomocne przy opracowywaniu nowych leków. W badaniach biomedycznych najczęściej wykorzystywane są myszy i szczury. Wybór gryzoni jako organizmów modelowych wynika z jednej strony z ich genetycznego i fizjologicznego podobieństwa do ludzi, a z drugiej, z ich małych rozmiarów, łatwości hodowli, dużej płodności i niewielkich kosztów utrzymania. Szczególnie cennym gatunkiem stały się myszy, zwłaszcza po opracowaniu metod precyzyjnego wprowadzania modyfikacji genetycznych i tworzenia zwierząt transgenicznych (BRYDA 2013).

Analiza porównawcza ludzkiego genomu zsekwencjonowanego w 2001 r. (LANDER i współaut. 2001, VENTER i współaut. 2001) oraz genomu myszy zsekwencjonowanego w 2002 r. (WATERSTON i współaut. 2002) wykazała, że oba gatunki mają ponad 95% wspólnych genów. Dlatego wiele badań prowadzonych na mysich modelach dobrze tłumaczy zarówno biologię myszy, jak i człowieka (BRYDA 2013). Należy jednak pamiętać, że mimo podobieństwa genetycznego, fizjologia myszy i ludzi w wielu ważnych aspektach jest jednak odmienna. Dotyczy to np.

tempa metabolizmu, gospodarki lipidowej, wrażliwości na uszkodzenia DNA, podatności na rozwój nowotworów, czy możliwości produkcji endogennego kwasu askorbinowego. To sprawia, że wyniki uzyskane na modelach mysich nie zawsze można odnosić bezpośrednio do ludzi.

Szczególnie istotne z punktu widzenia wykorzystywania myszy do badań biomedycznych są różnice dotyczące układu odpornościowego i hematopoezy. Układy odpornościowe ludzi i myszy, mimo wspólnych podstawowych zasad działania, wykazują cechy specyficzne dla gatunku zarówno w odporności wrodzonej, jak i nabytej. Niektóre odmienności łatwo zauważyć już przy podstawowej analizie hematopoezy i parametrów hematologicznych. U zdrowych dorosłych ludzi hematopoeza zachodzi prawie wyłącznie w szpiku kostnym, a największy procentowy udział wśród leukocytów krwi mają granulocyty. U zdrowych, dorosłych myszy hematopoeza jest aktywna i w szpiku i w śledzionie, a dominującą populacją krążących leukocytów są limfocyty. Inne różnice wymagają dokładniejszych analiz. Specyficzne dla gatunku są np. ważne białka regulujące hematopoezę, jak choćby Sca-1 (ang. stem cell antigen-1, Ly6a). Odmienna jest również regulacja ekspresji genów kodujących białka biorące udział w reakcji na infekcję. Dotyczy to między innymi działania i lokalizacji receptorów typu Toll (ang. toll-like receptors, TLR2, TLR3, TLR9 i TLR10), rodzaju komórek produkujących defensyny czy aktywno-

Ryc 1. Procedura humanizacji myszy NSG i NSG-SGM3 wymaga przed przeszczepieniem ludzkich komórek krwiotwórczych zastosowania mieloablacji za pomocą niskich dawek promieniowania jonizującego – do 3,5 Gy (**A**), myszy NRG i MISTRG są bardziej odporne na promieniowanie jonizujące i mogą być traktowane dawką promieniowania do 6 Gy (**B**), myszy NBSGW nie wymagają mieloablacji przed przeszczepieniem ludzkich komórek krwiotwórczych (**C**). Rycinę przygotowano wykorzystując Servier Medical Art.

ści niektórych cytokin, np. interleukiny 4 (ang. interleukin 4, IL-4) czy interleukiny-13 (IL-13) (podsumowane w MESTAS i HUGHES 2004).

Dodatkowe przeszkody pojawiają się przy próbach wykorzystywania myszy w badaniach związanych z chorobami infekcyjnymi, część patogenów może bowiem infekować jedynie komórki ludzkie. Do takich patogenów należą między innymi: pałeczka duru brzuszego *Salmonella typhi*, krętek odkleszczowej gorączki powrotnej *Borrelia hermsii* i prątek gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis* (DOUAM i PLOSS 2018) oraz wirus ludzkiego niedoboru odporności (ang. human immunodeficiency virus, HIV), wirus cytomegalii (ang. cytomegalovirus, CMV), wirus Epsteina-Barra (ang. Epstein-Barr virus, EBV) mogący wywoływać mononukleozę zakaźną, ludzki wirus T-limfotropowy (ang. human T-lymphotropic virus, HTLV) mogący wywołać białaczkę i chłoniaki z limfocytów T czy też wirus mięsaka Kaposiego (ang. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV). Takim

patogenem okazał się również wirus SARS-CoV-2 wywołujący COVID-19.

Sposobem na obejście tych przeszkód jest wykorzystanie myszy humanizowanych (Ryc. 1). Termin „myszy humanizowane” nie jest precyzyjny i może być rozumiany szeroko. W najbardziej ogólnym ujęciu humanizacja myszy polega albo na wprowadzeniu takich modyfikacji genetycznych, które upodabniają fizjologię myszy do fizjologii ludzkiej (np. wyłączenie możliwości edycji mRNA dla apolipoproteiny B w mysich hepatocytach likwiduje jedną z różnic w metabolizmie lipoprotein) albo na przeszczepieniu myszom ludzkich komórek i tkanek (a nawet mikrobiomu), które po przeszczepieniu zachowują swoje funkcje specyficzne gatunkowo. Oba podejścia są często stosowane łącznie. Użyte modele myszy humanizowanych (ang. humanized mice, humice) stają się niezastąpionym narzędziem w badaniach patogenetycznych ludzkich chorób nowotworowych, autoimmunizacyjnych i infekcyjnych. Pozwalają również na przedkliniczną ocenę skuteczności proponowanych terapii, także takich, któ-

Tabela 1. Słowniczek.

Komórki progenitorowe	Komórki potomne pochodzące od komórek macierzystych, są zazwyczaj bardziej ukierunkowane i nie mają zdolności samoodnowy
Mieloablacja	Zniszczenie szpiku kostnego przez radioterapię lub chemioterapię
Mielopoeza	Wytwarzanie limfocytów linii mieloidalnej tj. granulocytów (neutrofili, bazofili i eozynofili), monocytów
Myszy permissive	Myszy w których możliwa jest infekcja i namnażanie specyficznego wirusa
Nisza hematopoetyczna	Środowisko szpiku kostnego, w którym występują krwiotwórcze komórki macierzyste. Niszę tworzą komórki kości, naczyń krwionośnych, tkanki łącznej, w tym komórki macierzyste zrębu szpiku kostnego. Sygnały pochodzące z niszy są kluczowym regulatorem stanu komórek krwiotwórczych.
Rekombinacja V(D)J	Proces tworzenia genów przeciwciał lub receptorów limfocytów T poprzez rekombinację. Przeciwciała kodowane są w genomie przez geny stałe C oraz zmienne V, D, J, których występuje kilkadziesiąt wariantów. W procesie rekombinacji dochodzi do losowego łączenia wariantów przy udziale kompleksu rekombinazy.
Transdukcja	Wprowadzenie do komórek RNA lub DNA za pomocą wektorów wirusowych
Transfekcja	Wprowadzenie do komórek RNA lub DNA

rych działanie wykorzystuje specyficzne cechy ludzkiego układu odpornościowego. Modele te są obecnie bardzo intensywnie rozwijane, dlatego warto podsumować informacje dotyczące najważniejszych humanizowanych szczepów mysich. Skupimy się na szczepach wykorzystywanych w badaniach nad chorobami wirusowymi, w szczególności nad zakażeniem wirusem SARS-CoV-2.

Informacje dotyczące użytych w pracy terminów znajdzie czytelnik w Tabeli 1.

HUMANIZACJA MYSZY Z NIEDOBORAMI ODPORNOŚCI

Myszy humanizowane najszerzej wykorzystywane w badaniach to myszy z ludzkim układem odpornościowym. Powstają one na bazie szczepów z niedoborami odporności, często są też dodatkowo modyfikowane genetycznie, dzięki czemu produkują ludzkie czynniki stymulujące wzrost komórek krwiotwórczych. Kluczowa jest zwłaszcza produkcja czynników, których mysie formy nie są rozpoznawane przez ludzkie receptory. Tak dzieje się w przypadku interleukiny 3 (IL-3), czynnika stymulującego kolonie makrofagów (ang. macrophage colony stimulating factor, M-CSF, CSF1), czynnika stymulującego kolonie granulocytów i makrofagów (ang. granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF, CSF2), trombopoetyny (ang. thrombopoietin, TPO) oraz interleukiny 15 (IL-15), koniecznej dla prawidłowego rozwoju komórek NK. Częściowa interakcja między

mysimi ligandami a ludzkimi receptorami zachodzi natomiast w przypadku czynnika wzrostu komórek macierzystych (ang. stem cell factor, SCF, KITL), liganda receptorowej kinazy tyrozynowej FLT3 (ang. FMS-like tyrosine kinase 3 ligand, FLT3L) i interleukiny 7 (IL-7).

Najlepiej będzie, jeśli produkcja ludzkich białek w humanizowanych myszach nie zachodzi konstytutywnie, ale jest regulowana analogicznie, jak w mysiej hematopoezie. Można to uzyskać wprowadzając ludzkie geny w miejsce ich mysich odpowiedników, pod kontrolą endogennych promotorów. Dzięki takim modyfikacjom nisza hematopoetyczna promuje ludzką hematopoezę po przeszczepieniu ludzkich krwiotwórczych komórek macierzystych i progenitorowych.

Myszy z niedoborami odporności są podstawą tworzenia wszystkich modeli doświadczalnych, wykorzystujących przeszczepienia ksenogeniczne. W wielu badaniach, w których konieczne jest podanie myszom komórek ludzkich (np. komórek nowotworowych), używa się szczepów *nude* (*Foxn1^{nu}*), *scid*, *scid-beige* lub *NOD-scid*. Szczepy te mają mutacje powodujące przede wszystkim zaburzenia dojrzewania limfocytów i przez to wykazują upośledzoną odporność. Zostały dobrze scharakteryzowane w pracy Pauliny KOWALCZYK i współaut. (2019), do której warto sięgnąć. Do tworzenia myszy humanizowanych stosuje się zwykle bardziej zaawansowane szczepy, takie jak NSG lub NSG-SGM3 oraz ich dalsze, wciąż udoskonalane modyfikacje.

MYSZY NSG

Myszy NSG (szczep NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}-*Il2rg*^{tm1Wj/null}) to szczep wyprowadzony z nietotyłych cukrzycowych myszy NOD (ang. non-obese diabetic), uzyskanych w latach 70. w Japonii (MAKINO i współaut. 1980). Myszy NOD wykazują zaburzony rozwój makrofagów i osłabioną aktywność komórek NK i NKT. Nie mają również białka C5 układu dopełniacza (KOWALCZYK i współaut. 2019).

Co ciekawe, u wszystkich myszy wywodzących się ze szczepów NOD występuje wariant polimorficzny genu *Sirpa*, umożliwiający efektywne wiązanie receptora SIRP-α na mysich makrofagach do ludzkiego białka błonowego CD47 (będącego również receptorem dla trombospodiny 1). Interakcja białek SIRP-α/CD47 to sygnał „nie jedz mnie” dla makrofagów, chroniący komórki CD47⁺ przed fagocytozą i zwiększający przeżywalność przeszczepionych komórek ludzkich, a co za tym idzie poprawiający zasiedlanie szpiku przez przeszczepione krwiotwórcze komórki macierzyste (TAKENAKA i współaut. 2007).

U myszy NSG obecna jest także mutacja *scid* w genie *Prkdc* kodującym podjednostkę katalityczną kinazy białkowej zależnej od DNA (ang. DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit, DNA-PKcs) oraz mutacja lub delecja genu *Il2rg* kodującego łańcuch γ receptora interleukiny 2 (ang. interleukin 2 receptor subunit gamma). Ma to bardzo ważne konsekwencje, gdyż łańcuch γ wchodzi w skład kilku receptorów, nie tylko dla IL-2, ale również IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 i IL-21. Myszy NSG z delecją genu *Il2rg* zostały opisane w 2005 r. przez ISHIKAWĘ i współaut. (2005) oraz SHULTZA i współaut. (2005).

Unieczynnienie genu *Prkdc* prowadzi do silnej limfopenii, czyli braku funkcjonalnych limfocytów B i T (KOWALCZYK i współaut. 2019), oraz zwiększa wrażliwość myszy NSG na promieniowanie jonizujące. Delecja lub mutacja *Il2rg* wiąże się natomiast zablokowaniem przekazywania sygnału od interleukin. Wyłączenie aktywności IL-15 blokuje rozwój komórek NK i upośledza odporność nieswoistą (KOWALCZYK i współaut. 2019). Dodatkowym skutkiem braku aktywności IL-2 jest zabezpieczenie myszy przed spontanicznym rozwojem chłoniaków.

Myszy NSG mają zatem silnie upośledzoną odporność swoistą i nieswoistą, a jednocześnie ich fagocyty rozpoznają ludzkie CD47, czyli rozumieją sygnał „nie jedz mnie”. Umożliwia to przyjmowanie przez myszy NSG przeszczepów ludzkich krwiotwórczych komórek macierzystych i progenitorowych, w tym także komórek mobilizowanych do krwi obwodowej, a następnie produkcję ludzkich granulocytów, monocytów, limfocy-

tów, komórek NK i płytek krwi. Samice myszy NSG uważane są za najlepszych biorców ludzkich komórek (znacznie lepszych niż samce), skutecznych nawet przy małej liczbie przeszczepianych krwiotwórczych komórek macierzystych. Co istotne, przy zachowaniu warunków zabezpieczających przed infekcjami, myszy NSG żyją i rozmnażają się normalnie.

MYSZY NRG

Obecność mutacji *scid* u myszy NSG powoduje ich zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące stosowane na etapie mieloablacji przed przeszczepieniem ludzkich komórek krwiotwórczych. Myszy szczepu NRG (NOD-*Rag1*^{null}-*Il2rg*^{null}) są natomiast pozbawione funkcjonalnego genu *Rag1* (ang. recombination activating gene 1), co prowadzi do zablokowania rearanżacji V(D)J genów immunoglobulin i receptorów T, a w konsekwencji do braku funkcjonalnych limfocytów B i T (PEARSON i współaut. 2008). Jest to zatem fenotyp podobny do myszy z mutacją *Prkdc*^{scid}, ale myszy nie są tak wrażliwe na promieniowanie jonizujące (PEARSON i współaut. 2008). Co ważne, myszy NRG i NSG wykazują podobny chimeryzm po przeszczepieniu ludzkich krwiotwórczych komórek macierzystych (PEARSON i współaut. 2008), zapewniając produkcję ludzkich granulocytów, monocytów, limfocytów, komórek NK i płytek.

MYSZY NBSGW

Większość szczepów myszy z upośledzonym układem odpornościowym, przed przeszczepieniem ludzkich komórek krwiotwórczych wymaga mieloablacji, często z wykorzystaniem promieniowania jonizującego. Procedura ta jest obciążająca dla zwierzęcia i niesie wiele skutków ubocznych. Przeszczepienie ludzkich komórek krwiotwórczych do mysich biorców NSG bez uprzedniej mieloablacji jest możliwe, ale mało wydajne.

MCINTOSH i współaut. opublikowali w 2015 r. pracę, w której opisali szczep NBSGW. Są to myszy NOD, B6.SCID *Il2rg*^{null} *Kit*^{W41/W41}, które powstały w wyniku skrzyżowania myszy NSG z myszami homozygotycznymi dla zmutowanego genu receptora SCF, czyli *KIT*^{W41}. Po przeszczepieniu ludzkich komórek krwiotwórczych bez mieloablacji biorców, poziom chimeryzmu u myszy NBSGW był dziewięć razy wyższy niż chimeryzm u myszy NSG, podobny do chimeryzmu uzyskiwanego u myszy NSG po mieloablacji promieniowaniem jonizującym (MCINTOSH i współaut. 2015). Potwierdzono również, że przeszczepione do myszy NBSGW ludzkie krwiotwórcze komórki macierzyste mogą odbudowywać hematopoezę u drugorzędowych

biorców, co potwierdza ich pełną funkcjonalność. Niemniej, podobnie jak w innych modelach mysich, również u myszy NSGW przy różnicowaniu ludzkich komórek hematopoetycznych obserwuje się nietypowe dla ludzi ukierunkowanie: zamiast klasycznych proporcji ok. 53% granulocytów, 20% limfocytów T i 33% limfocytów B, uzyskuje się np. 2,5% granulocytów, 3,3% limfocytów T i 68% limfocytów B.

MYSZY NSG-SGM3 I MISTRG

Obecność mutacji upośledzających działanie układu odpornościowego umożliwia przyjmowanie przez biorców NSG przeszczepów ludzkich krwiotwórczych komórek macierzystych. Aby poprawić warunki funkcjonowania przeszczepionych komórek i zwiększyć poziom chimeryzmu, wykonano kolejną modyfikację – do mysiego genomu wprowadzono geny kodujące trzy ludzkie białka promujące hematopoezę: **SCF**, **GM-CSF** i **IL-3** (czyli zestaw białek SGM3).

Geny te zostały po raz pierwszy wprowadzone do myszy NOD-*Prkdc^{scid}* pod kontrolą promotora ludzkiego wirusa CMV w 2003 r. przez NICOLINIEGO i współaut., a uzyskane myszy charakteryzowały się wysokim stężeniem wszystkich ludzkich białek (na poziomie ng/ml). Aby zweryfikować funkcjonalną skuteczność wykonanej modyfikacji, porównano wydajność przeszczepienia ludzkich płodowych krwiotwórczych komórek macierzystych do biorców wyjściowego szczepu NOD-*Prkdc^{scid}* oraz biorców szczepu produkującego ludzkie białka. Zgodnie z oczekiwaniami, u myszy z ekspresją ludzkich genów zaobserwowano zwiększoną ludzką mielopoezę. Jednocześnie jednak stwierdzono zmniejszoną erytropoezę i obniżoną produkcję komórek linii limfocytów B (NICOLINI i współaut. 2003). Model nie spełnił więc wszystkich oczekiwań.

W 2011 roku Eva BILLERBECK i współaut. wprowadzili do genomu szczepu NSG geny kodujące ludzkie czynniki wspierające hematopoezę. Co ciekawe, u uzyskanych w ten sposób myszy NSG-SGM3 również zaobserwowano odbudowę szpiku kostnego z przeszczepionych ludzkich komórek krwiotwórczych CD34⁺, ale jednocześnie stwierdzono zwiększony udział komórek mieloidalnych w porównaniu do kontrolnych biorców NSG. Większy był również odsetek regulatorowych limfocytów T CD4⁺FoxP3⁺ (BILLERBECK i współaut. 2011). Warto zwrócić uwagę, że wysoki poziom ludzkich białek IL-3, GM-CSF i SCF u myszy NSG-SGM3 ułatwia także przyjmowanie ludzkich komórek ostrej białaczki szpikowej (ang. acute myeloid leukemia, AML) (WUNDERLICH 2010), co czyni ze szczepu NSG-SGM3 cenny model w badaniach onkologicznych.

Bardzo wyrafinowanym modelem są myszy szczepu MISTRG. Również one wykazują znaczne niedobory odporności, które w tym przypadku wynikają z delekcji *Il2rg* i genu *Rag2* (ang. recombination activating gene 2), kodującego białko podobne do Rag-2, czyli zaangażowane w rekombinację V(D)J w rozwoju limfocytów. Myszy MISTRG wykazują także ekspresję ludzkich genów kodujących M-CSF, GM-CSF, IL-3 i trombopoetynę, oraz ekspresję ludzkiego genu *Sirpa*, co ułatwia przyjmowanie się przeszczepów ludzkich komórek krwiotwórczych i stymuluje prawidłowy rozwój ludzkiego układu odpornościowego u mysich biorców (RONGVAUX i współaut. 2014). Co istotne, geny kodujące M-CSF, GM-CSF, IL-3 i trombopoetynę, wprowadzono w miejsce ich mysich odpowiedników.

Myszy MISTRG dobrze wspierają rozwój linii mieloidalnych i komórek NK oraz mają zahamowaną aktywność fagocytarną makrofagów w stosunku do przeszczepionych komórek ludzkich. Biorcy, u których endogenne cytokiny są zastąpione ludzkimi odpowiednikami, zapewniają przewagę hematopoezy z wszczepionych komórek ludzkich, kosztem mysiej hematopoezy endogennej. Zapewniają także różnicowanie ludzkich eozynofili, bazofili i komórek dendrytycznych. Co istotne, wszczepienie ludzkich komórek hematopoetycznych CD34⁺ do biorców MISTRG nie wymaga mieloablacji, bo efektywność repopulacji szpiku u biorców nie-naświetlanych jest podobnie wysoka jak po mieloablacji. Problemem może być natomiast rozwijająca się u biorców anemia wynikająca z niewystarczającej mysiej erytropoezy (RONGVAUX i współaut. 2014).

MYSZY BLT

Modyfikacje pozwalające na uzyskanie myszy, w których mogą prawidłowo funkcjonować ludzkie krwiotwórcze komórki macierzyste, nie są jednak wystarczające w badaniach funkcji komórek efektorowych, zaangażowanych w zwalczanie infekcji. Nie wystarczają też do badań patogenów, które nie zakażają komórek mysich. Aby badać interakcje między układem odpornościowym a zakażającymi organizm wirusami, konieczny był dalszy rozwój modeli myszy humanizowanych. Wśród nich najlepiej scharakteryzowane są myszy BLT.

Myszy BLT używane są m.in. do badań nad wirusem HIV. Ich nazwa pochodzi od przeszczepianych im tkanek: szpiku kostnego (ang. **b**one marrow), ludzkiej płodowej wątroby (ang. **l**iver) oraz grasicy (ang. **t**hymus) (KARPEL i współaut. 2015). Do tworzenia tego typu myszy wykorzystuje się szczepy NSG, NRG lub rzadziej NOD-*scid*, którym najpierw przeszczepia się fragment

ludzkiej wątroby i grasicy, a następnie podaje się dożylnie ludzkie komórki krwiotwórcze CD34⁺ pochodzące najczęściej z ludzkiej płodowej wątroby.

Po raz pierwszy model ten został zaproponowany przez LANA i współaut. w 2006 r. Myszy NOD-scid poddane zostały przeszczepowi komórek krwiotwórczych oraz przeszczepowi fragmentów ludzkiej płodowej grasicy i wątroby pod powięź nerkową. Okazało się, że przeszczep grasicy i wątroby płodowej znacząco zwiększa przyjmowanie się komórek krwiotwórczych oraz poprawia rozwój i dojrzewanie limfocytów T (LANA i współaut. 2006). Jest to szczególnie istotne w przypadku wykorzystywania modeli myszy humanizowanych do badań nad zakażeniem wirusem HIV, ze względu na jego tropizm do ludzkich limfocytów T.

OGRANICZENIA MODELI MYSZY HUMANIZOWANYCH

Wiele modeli myszy humanizowanych powstaje dzięki przeszczepieniu ludzkich komórek krwiotwórczych do szczepów z upośledzonym układem odpornościowym. Przeszczepione ludzkie komórki krwiotwórcze trafiają jednak do mysiej niszy szpikowej (SZADE i współaut. 2018), która nie w pełni odzwierciedla ludzką niszę, nawet u myszy produkujących ludzkie cytokiny. Problem ten można częściowo rozwiązać przez utworzenie ektopowych ludzkich nisz dla ludzkich komórek hematopoetycznych. Nisze powstają po przeszczepieniu ludzkich komórek macierzystych zrzębu szpiku kostnego, np. pod skórę myszy (REINISCH i współaut. 2016). Zapewniają prawidłowe działanie hematopoetycznych komórek macierzystych, potwierdzone zdolnością do odtwarzania hematopoety z drugorzędowych biorców. Wciąż jednak śródbłonek współtworzący ektopową niszę wywodzi się z komórek mysich. Nie jest jasne, na ile brak ludzkich komórek śródbłonka wpływa na regulację hematopoety.

Niedawno okazało się, że prawidłowe funkcjonowanie ludzkich komórek odpornościowych u myszy humanizowanych może być zaburzone przez odmienny od ludzkiego mikrobiom myszy, w szczególności u zwierząt utrzymywanych w warunkach wolnych od specyficznych gatunkowo patogenów (ang. specific pathogen-free, SPF) (TAO i REESE 2017). Ten warunek będzie prawdopodobnie coraz częściej uwzględniany w badaniach.

Pojawiają się również przypuszczenia, że funkcja komórek odpornościowych pochodzących z przeszczepionych komórek krwiotwórczych może zależeć od ich pochodzenia i od historii chorób dawcy. Coraz częściej

sugeruje się, że komórki krwiotwórcze posiadają epigenetyczną „pamięć” przebytych infekcji (CHEN i OZATO 2021). Na razie nie wiadomo jednak na ile może to wpływać na wyniki badań wykorzystujących myszy humanizowane jako modele chorób zakaźnych.

MODELE ZWIERZĘCE WYKORZYSTYWANE W BADAANIACH NAD SARS-CoV-2

Pandemia COVID-19 sprawia, że największym zainteresowaniem cieszą się obecnie modele pozwalające na badanie infekcji wirusem SARS-CoV-2. W badaniach nad SARS-CoV-1, zidentyfikowanym w 2003 r., bardzo przydatne okazały się myszy. Co ciekawe, wirus SARS-CoV-1 infekował myszy typu dzikiego (np. C57BL/6, BALB/c, 129SvEv), ale wywoływał u nich łagodne i nieco inne niż u ludzi objawy, co nie było dobrym modelem sytuacji klinicznej. Dlatego stworzone zostały myszy transgeniczne. Ponieważ SARS-CoV-1 infekuje komórki dzięki interakcji białka S (spike) z białkiem konwertazy angiotensyny-2 (ACE2), stworzono myszy humanizowane, z ludzkim genem ACE2. Były one bardzo wrażliwe na zakażenie, a objawy chorobowe wywoływane przez SARS-CoV-1 były znacznie silniejsze niż u myszy typu dzikiego (ZHENG i współaut. 2021). Myszy te okazały się przydatne również do badań nad SARS-CoV-2 (MUÑOZ-FONTELA i współaut. 2020).

MYSZY HACE2 I HDPP4

Podobnie jak SARS-CoV-1, również wirus SARS-CoV-2 wiąże się do ludzkiej konwertazy angiotensyny-2 za pomocą białka S. Jednak w tym przypadku, ze względu na niskie powinowactwo białka S do mysiej Ace2, klasyczne modele mysie nie mogą być wykorzystywane, gdyż myszy typu dzikiego nie są podatne na infekcję wirusem SARS-CoV-2. Dlatego w badaniach nad COVID-19 wykorzystano modele humanizowanych myszy wykazujących ekspresję ludzkiego genu ACE2. Istnieją różne warianty takich myszy: z ACE2 pod kontrolą promotora keratyny 18 (ang. keratin 18, KRT18) – specyficznego dla komórek nabłonka, z ACE2 pod kontrolą promotora HFH4 (ang. forkhead homologue 4) – specyficznego dla komórek nabłonka płucnego i neuronów, z ACE2 pod kontrolą promotora uniwersalnego (kurzy promotor β-aktyny z enhancerem CMV) lub ACE2 pod kontrolą mysiego promotora genu *Ace2* (MUÑOZ-FONTELA i współaut. 2020). Objawy chorobowe rozwijane przez myszy były silne i w dużej mierze przypominały objawy kliniczne u ludzi. Co jednak ważne, myszy transgeniczne z ekspresją ludzkiego genu

ACE2 w komórkach *Krt18⁺* (*Krt18-ACE2*), komórkach *HNF4⁺* (*Hnf4-ACE2*) lub pod kontrolą promotora uniwersalnego rozwijały po infekcji wirusami SARS-CoV zapalenie mózgu, które mogło prowadzić do śmierci zwierząt (DINNON i współaut. 2020, YINDA i współaut. 2021). Objawu takiego nie wykazywały myszy z transgenem *ACE2* pod kontrolą endogennego promotora *Ace2* (MUÑOZ-FONTELA i współaut. 2020).

Wykorzystując w badaniach myszy z ekspresją ludzkiej konwertazy *ACE2* pod kontrolą egzogennych promotorów należy pamiętać o zachowanej ekspresji mysiej formy białka. Jest ono nieaktywne w samej infekcji, ale potencjalnie może wpływać na badania skuteczności inhibitorów drobnocząsteczkowych i przeciwciał zakłócających interakcję ludzkiej *ACE2* z wirusem.

Myszy, w których mysiej *Ace2* zastąpiono ludzkim genem *ACE2*, utworzono modyfikując zarodkowe komórki macierzyste myszy C57BL/6 lub BALB/c za pomocą Crispr/Cas9. Zmodyfikowane komórki podano następnie do tetraploidalnych blastocyst (LIU i współaut. 2020). Tetraploidalne komórki mogą dać początek jedynie tkankom pozazarodkowym (np. łożysku), natomiast zarodki rozwijają się tylko z podanych zmodyfikowanych diploidalnych embrionalnych komórek macierzystych (LIU i współaut. 2020).

Podobna strategia uzyskania myszy permisyjnych dla ludzkich wirusów została zastosowana w przypadku szczepów wykorzystywanych do modelowania infekcji wirusem MERS-CoV, który wiąże się do ludzkiej dipeptydylopeptydazy-4 (ang. dipeptidyl peptidase 4, DPP4), a nie ma powinowactwa do mysiej *Dpp4*. U zainfekowanych MERS-CoV myszy wykazujących ekspresję *DPP4* pod kontrolą promotora *Krt18*, podobnie jak w przypadku myszy *Krt18-ACE2* po infekcji SARS-CoV, zaobserwowano zapalenie mózgu. To stanowi wadę modelu. Dlatego za pomocą Crispr/Cas9 stworzono nowy szczep myszy, w którym pełnej długości gen *DPP4* wstawiono w *locus Rosa26*, powodując globalną ekspresję transgenu. W tym przypadku mRNA Cas9, sgRNA oraz wektor z transgenem zostały wstrzyknięte do mysich zygot. Uzyskany szczep był wysoce podatny na infekcję klinicznym szczepem MERS-CoV, a objawy chorobowe przypominały przebieg infekcji u ludzi.

MYSZY TRANSDUKOWANE WEKTORAMI AAV

Esen SEFIK i współaut. (2021, preprint) zaproponowali model będący modyfikacją humanizowanych myszy MISTRG6. Szczep MISTRG6 to kolejna modyfikacja myszy MISTRG, dodatkowo wykazująca ekspresję ludzkiej interleukiny 6 (IL-6), która ma

poprawiać przyjmowanie się przeszczepów ludzkich komórek krwiotwórczych pochodzących od dorosłych dawców. Do takich myszy wprowadzono gen kodujący ludzką konwertazę angiotensyny 2, wykorzystując w tym celu wektory AAV, utworzone na bazie wirusów towarzyszących adenowirusom (ang. adeno-associated viruses, AAV). Wprowadzenie genu *ACE2* do płuc myszy MISTRG6 po udanej rekonstytucji ludzkimi komórkami krwiotwórczymi pozwoliło na zakażenie zwierząt wirusem SARS-CoV-2 oraz uzyskanie obrazu choroby podobnego do klinicznego przebiegu infekcji (SEFIK i współaut. 2021, preprint).

Żaden model myszy nie odzwierciedla jednak w pełni różnorodnych objawów zakażenia SARS-CoV-2 obserwowanych u ludzi. Wykorzystanie wektorów AAV lub wektorów adenowirusowych do transdukcji *in vivo* i uzyskiwania ekspresji *ACE2* jest szybkim i wydajnym podejściem, umożliwiającym uzyskanie modelu do badań infekcji SARS-CoV-2 u różnych szczepów myszy, z różnym tłem genetycznym (np. C57BL/6/J z dominacją odpowiedzi typu Th1 lub BALB/c z dominacją odpowiedzi typu Th2). To niewątpliwa zaleta. Transdukcja jest jednak mało specyficzna i prowadzi do ekspresji *ACE2* w różnych typach komórek układu oddechowego. Trudno również kontrolować poziom ekspresji transgenu, przy czym ekspresja ta może być krótkotrwała, zaledwie kilku- lub kilkunastodniowa (MUÑOZ-FONTELA i współaut. 2020).

MODELE MYSIE OPARTE NA MODYFIKACJACH WIRUSA SARS-CoV-2

Odmiennym podejściem jest tworzenie modelu mysiego dla infekcji wirusowej nie poprzez modyfikacje myszy, ale przez modyfikacje wirusa SARS-CoV-2. Przy tworzeniu takich dopasowanych do myszy wirusów zastosowano dwie strategie.

Pierwsza z nich, zastosowana przez Kuna HUANGA i współaut. (2021) polegała na dziesięciokrotnym pasażowaniu SARS-CoV-2 przez mysie płuca, poprzez kolejne infekcje myszy BALB/c (MUÑOZ-FONTELA i współaut. 2020). Do infekcji donosowej wykorzystywano nadsące z homogenatów płuc pobranych od zainfekowanych wcześniej zwierząt. Uzyskano w ten sposób dostosowany do myszy szczep wirusa WBP-1, który powoduje ciężkie śródmiąższowe zapalenie płuc i śmierć u myszy Balb/c infekowanych donosowo. Scharakteryzowano również mutacje odpowiedzialne za nabycie przez SARS-CoV-2 zdolności do infekowania myszy. Zmodyfikowany wirus może być wykorzystywany do zakażania różnych szczepów myszy, o różnym tle genetycznym (CHU i współaut. 2021).

Druga strategia zastosowana została przez Kennetha DINNONA i współaut. (2020). Polegała na analizie struktury białek S kilku koronawirusów zdolnych do infekowania myszy i zaprojektowaniu, a następnie wprowadzeniu mutacji do jego domeny wiążącej białko ACE2 takiej, która zwiększała prawdopodobieństwo wiązania białka S wirusa SARS-CoV-2 do mysiej konwertazy Ace2. Uzyskany wirus został nazwany SARS-CoV-2 MA. Okazało się, że wprowadzone modyfikacje rzeczywiście umożliwiły skuteczne infekowanie myszy, a replikację wirusa w drogach oddechowych zakażonych zwierząt można było wykryć już 24 h po ekspozycji. Przebieg infekcji wykazywał również cechy wspólne z przebiegiem infekcji u ludzi. Tak więc, podobnie jak zakażenie SARS-CoV-2 u ludzi, zakażenie SARS-CoV-2 MA u myszy prowadziło do replikacji wirusa zarówno w górnych, jak i w dolnych drogach oddechowych (DINNON i współaut. 2020). Co więcej, znacznie cięższy przebieg zakażenia obserwowano u myszy starych, co przypomina sytuację w populacji ludzkiej.

Modele zmodyfikowanych wirusów mogą być bardzo cenne w badaniach mechanizmów infekcji, interakcji między patogenem a gospodarzem oraz w poznawaniu biologii wirusa. Trzeba natomiast brać pod uwagę, że wprowadzone mutacje mogą potencjalnie wpływać na rozpoznawanie wirusa przez specyficzne przeciwciała neutralizujące. Mogą więc nie być optymalne do testowania niektórych typów opracowywanych leków (MUÑOZ-FONTELA i współaut. 2020).

MODELE WYKORZYSTUJĄCE INNE GATUNKI ZWIERZĄT

Wśród małych zwierząt są gatunki wrażliwe na zakażenie SARS-CoV-2. Najważniejszym potencjalnym modelem badawczym mogą być prawdopodobnie chomiki syryjskie (*Mesocricetus auratus*), które były wykorzystywane między innymi w pracach nad SARS-CoV-1. Porównanie *in silico* sekwencji ACE2 człowieka z białkiem chemicznym sugerowało, że chomiki syryjskie mogą być podatne na infekcję SARS-CoV-2. Przypuszczenie to zostało potwierdzone. Po doświadczalnym zakażeniu donosowym u chomików syryjskich występuje łagodna lub umiarkowana choroba z postępującą utratą masy ciała i oznakami zaburzeń oddechowych. Po dwóch tygodniach infekcji chomiki zwykle zdrowieją. Podobnie jak u ludzi, stare chomiki i samce rozwijają cięższe objawy chorobowe. Dochodzi również do zakażenia kolejnych zwierząt, dzięki czemu chomiki mogą być przydatne w badaniach nad transmisją wirusa. Największą wadą tego modelu jest

niewielki zestaw narzędzi badawczych, np. specyficznych przeciwciał, które można wykorzystać w analizach (MUÑOZ-FONTELA i współaut. 2020).

Innym gatunkiem wrażliwym na zakażenie SARS-CoV-2 są fretki (*Mustela putorius furo*). Przebieg choroby zwykle jest łagodny lub umiarkowany, bez wpływu na masę ciała, z niewielkimi zmianami parametrów hematologicznych i podwyższoną temperaturą. Obserwuje się też wyraźną odpowiedź zapalną (JIA i współaut. 2020). Podobnie jak w przypadku chomików syryjskich, replikacja wirusa u fretek jest wykrywana w drogach oddechowych (głównie górnych) bardzo wcześnie i zanika po około dwóch tygodniach. Może dochodzić do zakażeń między zwierzętami, również drogą kropelkową, więc gatunek ten także może być przydatny w badaniach transmisji wirusa (MUÑOZ-FONTELA i współaut. 2020).

SARS-CoV-2 zakaża też norki (*Neovison vison*), u których przebieg choroby jest zwykle cięższy niż u fretek, z objawami ze strony układu oddechowego, w tym z trudnościami w oddychaniu. Niektóre norki padają w wyniku infekcji. Norki i fretki są potencjalnie ciekawymi modelami badawczymi. Jednocześnie jednak są trudne do utrzymywania w laboratoriach, zwłaszcza z zachowaniem standardów bezpieczeństwa biologicznego BL3. Niewiele jest również narzędzi biologicznych dla tych gatunków, co bardzo ogranicza zakres możliwych do wykonania analiz.

Warto pamiętać, że wrażliwe na zakażenie SARS-CoV-2 są koty domowe (*Felis catus*), które w wyniku infekcji mogą rozwijać śródmiąższowe zapalenie płuc oraz zapalenie małżowin nosowych i tchawicy, choć infekcja może przebiegać bezobjawowo. Chore koty mogą zakażać kolejne osobniki, również drogą kropelkową. W znacznie mniejszym stopniu podatne na zakażenia SARS-CoV-2 są natomiast psy (*Canis lupus familiaris*), u których infekcja przebiega zwykle bezobjawowo lub bardzo łagodnie.

PODSUMOWANIE

Wykorzystanie myszy jako systemu modelowego do badań przebiegu infekcji wirusem SARS-CoV-2 wydaje się optymalnym rozwiązaniem. Dostępnych jest wiele szczepów myszy transgenicznych, z różnym tłem genetycznym, pozwalających na badania różnorodnych aspektów odpowiedzi na zakażenie. Dobrze poznane są również zależności między genomem a cechami fenotypowymi zwierząt. Do pracy na myszach dysponujemy najbogatszym zestawem przeciwciał, sond i zoptymalizowanych protokołów. Moż-

liwość włączenia do badań myszy humanizowanych, z funkcjonalnymi komórkami ludzkiego układu odpornościowego, stwarza możliwości bardziej bezpośredniego odnoszenia wyników uzyskanych w układzie modelowym, do przebiegu infekcji u ludzi.

Streszczenie

Myszy są podstawowym modelem badawczym w biologii i fizjologii. Jednak, aby móc badać na modelach mysich ludzką fizjologię oraz rozwój chorób specyficznych dla ludzi, należało stworzyć nowe ich szczepy. W tym celu opracowano myszy humanizowane, które wykazują ekspresję ludzkich genów albo mają przeszczepione ludzkie tkanki lub komórki. W niniejszej pracy opisujemy przede wszystkim szczepy myszy, w których można utrzymać ludzki układ odpornościowy. Pandemia COVID-19 spowodowała duże zainteresowanie badaczy biologią wirusa SARS-CoV-2. Dlatego w dalszej części artykułu skupiamy się nad modelami zwierzęcymi pozwalającymi badać zakażenie wirusem SARS-CoV-2. Opisujemy modele myszy transgenicznych wykazujących ekspresję ludzkiego genu *ACE2*, myszy transgeniczne z ludzkim układem odpornościowym i inne modele zwierzęce wykorzystywane w badaniach nad COVID-19.

LITERATURA

- BILLERBECK E., BARRY W. T., MU K., DORNER M., RICE C. M. i współaut., 2011. *Development of human CD4+FoxP3+ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2R γ ^{null} humanized mice*. Blood 117, 3076-3086.
- BRYDA E. C., 2013. *The Mighty Mouse: The impact of rodents on advances in biomedical research*. Missouri Med. 110, 207-211.
- CHEN L., OZATO K., 2021. *Innate immune memory in hematopoietic stem/progenitor cells: myeloid-biased differentiation and the role of interferon*. Front. Immunol. 12, doi.org/10.3389/fimmu.2021.621333.
- CHU H., CHAN J. F.-W., 2021. *A lethal mouse model using a mouse-adapted SARS-CoV-2 strain with enhanced binding to mouse ACE2 as an important platform for COVID-19 research*. EBioMedicine 68, doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103406.
- DINNON K. H. 3RD, LEIST S. R., SCHÄFER A., EDWARDS C. E., MARTINEZ D. R., MONTGOMERY S. A. i współaut., 2020. *A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures*. Nature 586, 560-566.
- DOUAM F., PLOSS A., 2018. *The use of humanized mice for studies of viral pathogenesis and immunity*. Curr. Opin. Virol. 29, 62-71.
- HUANG K., ZHANG Y., HUI X., ZHAO Y., GONG W. i współaut., 2021. *Q493K and Q498H substitutions in Spike promote adaptation of SARS-CoV-2 in mice*. EBioMedicine 67, doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103381.
- ISHIKAWA F., YASUKAWA M., LYONS B., YOSHIDA S., MIYAMOTO T. i współaut., 2005. *Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chain^{null} mice*. Blood 106, 1565-1573.
- JIA H., YUE X., LAZARTIGUES E., 2020. *ACE2 mouse models: A toolbox for cardiovascular and pulmonary research*. Nat. Commun. 11, doi: 10.1038/s41467-020-18880-0.
- KARPEL M. E., BOUTWELL C. L., ALLEN T. M., 2015. *BLT humanized mice as a small animal model of HIV infection*. Curr. Opin. Virol. 13, 75-80.
- KOWALCZYK P., BIAŁA D., SZCZEPANIK M., MAJEWSKA-SZCZEPANIK M., 2019. *Modele myszy z niedoborami odporności: Charakterystyka i zastosowanie*. Kosmos 68, 375-387.
- LAN P., TONOMURA N., SHIMIZU A., WANG S., YANG Y.-G., 2006. *Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation*. Blood 108, 487-492.
- LANDER E. S., LINTON L. M., BIRREN B., NUSBAUM C., ZODY M. C. i współaut., 2001. *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature 409, 860-921.
- LIU F.-L., WU K., SUN J., DUAN Z., QUAN X. i współaut., 2020. *Rapid generation of ACE2 humanized inbred mouse model for COVID-19 with tetraploid complementation*. Nat. Sci. Rev. 8 doi.org/10.1093/nsr/nwaa285.
- MAKINO S., KUNIMOTO K., MURAOKA Y., MIZUSHIMA Y., KATAGIRI K., TOCHINO Y., 1980. *Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice*. Exp. Anim. 29, 1-13.
- MCINTOSH B. E., BROWN M. E., DUFFIN B. M., MAUFORT J. P., VEREIDE D. T. i współaut., 2015. *Nonirradiated NOD.B6.SCID IL2r γ -Kit(W41/W41) (NBSGW) mice support multilineage engraftment of human hematopoietic cells*. Stem Cell Rep. 4, 171-180.
- MESTAS J., HUGHES C. C. W., 2004. *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology*. J. Immunol. 172, 2731-2738.
- MUÑOZ-FONTELA C., DOWLING W. E., FUNNELL S. G. P., GSELL P.-S., RIVEROS-BALTA A. X. i współaut., 2020. *Animal models for COVID-19*. Nature 586, 509-515.
- NICOLINI F. E., CASHMAN J. D., HOGGE D. E., HUMPHRIES R. K., EAVES C. J., 2004. *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.
- PEARSON T., SHULTZ L. D., MILLER D., KING M., LANING J. i współaut., 2008. *Non-obese diabetic-recombination activating gene-1 (NOD-Rag1 null) interleukin (IL)-2 receptor common gamma chain (IL2r gamma null) null mice: A radioresistant model for human lymphohematopoietic engraftment*. Clin. Exp. Immunol. 154, 270-284.
- REINISCH A., THOMAS D., CORCES M. R., ZHANG X., GRATZINGER D. i współaut., 2016. *A humanized bone marrow ossicle xenotransplantation model enables improved engraftment of healthy and leukemic human hematopoietic cells*. Nat. Med. 22, 812-821.
- RONGVAUX A., WILLINGER T., MARTINEK J., STROWIG T., GEARTY S. V. i współaut., 2014. *Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model*. Nat. Biotechnol. 32, 364-372.
- SEFIK E., ISRAELOW B., ZHAO J., QU R., SONG E. i współaut., 2021. *A humanized mouse model of chronic COVID-19 to evaluate disease mechanisms and treatment options*. Res. Sq., doi: 10.21203/rs.3.rs-279341/v1.
- SHULTZ L. D., LYONS B. L., BURZENSKI L. M., GOTT B., CHEN X. i współaut., 2005. *Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/*

- LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells.* J. Immunol. 174, 6477-6489.
- SZADE K., GULATI G. S., CHAN C. K. F., KAO K. S., MIYANISHI M. i współpracownicy., 2018. *Where hematopoietic stem cells live: the bone marrow niche.* Antioxid. Redox Signal. 29, 191-204.
- TAKENAKA K., PRASOLAVA T. K., WANG J. C. Y., MORTIN-TOTH S. M., KHALOUEI S. i współpracownicy., 2007. *Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells.* Nat. Immunol. 8, 1313-1323.
- TAO L., REESE T. A., 2017. *Making mouse models that reflect human immune responses.* Trends Immunol. 38, 181-193.
- VENTER J. C., ADAMS M. D., MYERS E. W., LI P. W., MURAL R. J. i współpracownicy., 2001. *The sequence of the human genome.* Science 291, 1304-1351.
- WATERSTON R. H., LINDBLAD-TOH K., BIRNEY E., ROGERS J., ABRIL J. F. i współpracownicy., 2002. *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome.* Nature, 420, 520-562.
- WUNDERLICH M., CHOU F.-S., LINK K. A., MIZUKAWA B., PERRY R. L. i współpracownicy., 2010. *AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3.* Leukemia 24, 1785-1788.
- YINDA C. K., PORT J. R., BUSHMAKER T., OFFEI OWUSU I., PURUSHOTHAM i współpracownicy., 2021. *K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19.* PLoS Pathogens 17, doi.org/10.1371/journal.ppat.1009195.
- ZHENG J., WONG L.-Y. R., LI K., VERMA A. K., ORTIZ M. E. i współpracownicy., 2021. *COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice.* Nature 589, 603-607.

KOSMOS Vol. 70, 3, 485-494, 2021

WITOLD N. NOWAK, IZABELLA NOWORYTA, GRZEGORZ SOKOŁOWSKI, ALICJA JÓZKOWICZ

Department of Medical Biotechnology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, 7 Gronostajowa Str., 30-387 Kraków, Email: alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

HUMANIZED MICE AND THEIR USE IN MODELING OF HUMAN INFECTIOUS DISEASES

Summary

Mice are the primary research model in biology and physiology. However, in order to be able to study human physiology and the development of human-specific diseases in mouse models, new strains had to be created. For this purpose, humanized mice that express human genes or have transplanted human tissues or cells were developed. In this paper, we mainly focus on mouse strains in which the human immune system can be sustained. The COVID-19 pandemic has sparked a lot of interest among researchers in the biology of the SARS-CoV-2 virus. Therefore, later in the article, we focus on animal models that allow studying SARS-CoV-2 infection. We describe transgenic mouse models expressing the human ACE2 gene, transgenic mice with the human immune system, and other animal models used in COVID-19 research.

Key words: animal models, coronavirus, humanization, immunology, transplantation