

Vloga CIPKeBiP-a v projektu: Sodelujoča organizacija
Naslov projekta: **Nef, izločen z eksosomi iz celic okuženih z virusom HIV, pomembno prispeva k razvoju nevroloških simptomov AIDS-a**
Kordinatorator: **Dr. Boris Matija Peterlin**
ARRS šifra: J3-5499 (D)

Osnovni podatki o financiranju
Trajanje projekta: 1.8.2013 – 31.7.2016

Sestava CIPKeBiP projektne skupine

Priimek in ime	ARRS šifra	Raziskovalno področje	vloga
Dr. Dušan Turk	04988	biokemija in molekularna biologija	Raziskovalec 2013-2016
Dr. Marko Mihelič	22320	biokemija in molekularna biologija	Raziskovalec 2013
Dr. Jelena Rajković	34212	biokemija in molekularna biologija	Raziskovalec 2015-2016
Gregor Pretnar	34315		Tehnik 2016

Vsebinski opis projekta

V obdobju učinkovite protivirusne terapije HAART, nevrološki zapleti AIDS-a (nevroAIDS) ostajajo nepremagljiv problem. Klinični simptomi so s HIV-om povezana demenca (HAD), blage kognitivne poškodbe (MCMD) in vakuolarna mielopatija. HAD naj bi diagnosticirali pri okoli 10%, MCMD pa pri do 30% okuženih odraslih, otroci pa so še občutljivejši na učinke HIV-a. Za izboljšanje zdravstvenega stanja obolelih je zato pomembno razumevanje še nepojasnjenih mehanizmov s HIV-om povezane nevrodegeneracije. Odkritje biomarkerjev za napovedovanje tveganja in za spremljanje napredovanja nevroAIDS-a bi izredno izboljšali zdravljenje posameznikov okuženih s HIV-om.

Znano je, da HIV v možgane vstopi s pomočjo hematopoetskih celic, ki so nato vir nadaljnih okužb možganskih celic. Glavna tarča HIV-a v možganih so mikroglije (15% vseh celic CŽS) in astrociti (do 50% CŽS volumna), sposobne polne ali le delne virusne okužbe. Vzorci otroškega možganskega tkiva in in vitro okuženih celic so pokazali, da je Negativni faktor (Nef) najmočnejše izražen virusni protein v astrocitih. Raziskave kažejo na vpletenost Nef-a v nevr AIDS, vendar mehanizem ostaja nepojasnen. Zunajcelični Nef tako vpliva na viabilnost in metabolizem mikroglij, astrocitov, oligodendrocitov in nevronov. Poveča tudi migracijo in nabiranje levkocitov v možganih. V predhodni študiji smo prvič pokazali, da Nef s pomočjo indukcije sproščanja eksosomov (veziklov s premerom od 40-100 nm), pomembno stimulira svoje izločanje iz T celic, in pri tarčnih T limfocitih in vitro povzroči celično smrt sproženo z aktivacijo. Ta fenomen smo opazili tudi v primeru infekcije primarnih T limfocitov z virusom HIV. Naše rezultate so neodvisno potrdili in še dodatno pokazali prisotnost Nef-eksosomov v krvi tako s HAART zdravljenih kot tudi nezdravljenih posameznikov.

Hipoteza predlaganega projekta je, da Nef vsebujoči eksosomi, ki se sproščajo iz s HIV-om okuženih mikroglij in astrocitov, tvorijo rezervoar bioaktivnih veziklov, ki vplivajo na viabilnost in diferenciacijo okoliških celic CŽS. Naš glavni cilj je ovrednotiti in razumeti vlogo virusnega proteina Nef pri nevroAIDS-u in oceniti primernost Nef-eksosomov iz likvorja in/ali krvi kot biomarkerjev za prisotnost tega stanja. Sprva bomo pokazali klinično pomembnost Nef-eksosomov v CŽS. V ta namen bomo optimizirali metodo za izolacijo eksosomov iz vzorcev

likvorja, nato pa eksosome izolirali iz likvorja in krvi s HIV-om okuženih posameznikov in določili prisotnost Nef. Za kvantifikacijo eksosomov bomo razvili nov pristop na osnovi AF4-UV-MALS-QELS-RI. Ocenili bomo tudi učinek izražanja Nef-a ali okužbe celic s HIV-om na sproščanje in sestavo eksosomov pri mikroglijah in astrocitih, ter preučili vpliv inhibicije izražanja ključnih celičnih tarč z siRNA tehniko in izražanja mutiranih proteinov Nef na sproščanje. Med celicami CŽS (astrociti, mikroglije, oligodendrociti, nevroni, izvorne živčne celice) bomo nato z imunofluorescentno mikroskopijo določili tarče Nef-eksosomov, ki jih bomo nato izpostavili Nef-eksosomom in s pomočjo pretočne citometrije, imunofluorescentne mikroskopije in spektroskopskih metod ocenili učinek na apoptozo, namnoževanje in diferenciacijo celic. Nazadnje bomo razvili minimalno invazivne metode za spremljanje pojava in napredovanja nevroAIDSa. V ta namen bomo eksosome izolirane iz likvorja s HIV-om okuženih posameznikov, analizirali z masno spektrometrijo in miRNA profiliranjem s qPCR metodo terdoločili proteinsko sestavo in miRNA profil. Relevantne biomarkerje bomo preverili tudi na vzorcih krvi istih okuženih posameznikov.

Rezultati projekta bodo pomembno prispevali k razumevanju nevroAIDSa in fiziološke vloge eksosomov. Opisani bodo učinki proteina Nef na celice CŽS, kar bo pomagalo pri iskanju novih strategij pri omejitvi oziroma preprečavanju Nef-patogeneze. Vpeljana bo tudi nova metoda v diagnostiki AIDSa, pri kateri bodo Nef-eksosomi služili kot biomarkerji za spremljanje bolezni.