



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIA ZEHATZAK ETA NATUR ZIENTZIAK

**Nanogarraiatazaileen Garapena
Molekula Terapeutiko Txikiak
Modu Eraginkor Batean Ehun
Linfatikoetan Askatzeko**

*J.A. Nieto-Garai, S. Benet, M. Pino,
E. Bilbao, Itziar Erkizia,
M. Fernandez-Figueras,
FX. Contreras, JG. Prado,
J. Martinez-Picado, N. Izquierdo-
Users eta M. Lorizate*

425-431 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.58>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



eman ta zabal zazu



LAGUNTZAILEAK:



Nanogarraiatzaileen Garapena Molekula Terapeutiko Txikiak Modu Eraginkor Batean Ehun Linfatikoetan Askatzeko

Nieto-Garai JA^{1,+}, Benet S^{2,+}, Pino M², Bilbao E¹, Itziar Erkizia², Fernandez-Figueras M³,
Contreras FX^{1,4}, Prado JG², Martinez-Picado J^{2,5}, Izquierdo-Useros N^{2,*} and Lorizate M^{1,*}

*korrespondentzia egileak maier.lorizate@ehu.eus

⁺ekarpen berdina

¹Biofisikako Unitatea, Biokimika eta Biologia Molekularra saila CSIC, UPV/EHU, ²IrsiCaixa
Institut de Recerca de la Sida, ³Hospital Germans Trias i Pujol, ⁴IKERBASQUE, Basque
Foundation for Science, ⁵ICREA

Laburpena

Giza Immunoeskasiaren Birusa 1-ek (GIB-1) zelula mieloideoetara sartu eta inguruan dabilzan CD4+T zelulak infektatzen ditu. Horretarako, zelulan dagoen Siglec-1 molekula-hartzailea birusaren mintz gangliosidoak (GM) ezagutu eta estekatzen ditu. Siglec-1 infektatutako pazienten monozitoetan gainadierazita dago, baita ehun linfatikoetan aurkitzen diren zelula mieloideoetan ere. Lan honetan GIB-1-arekiko tamainan eta lipido konposaketan antzeko diren nanoliposomak eratu ziren, bere baitan zeramatzen molekulak espezifikoki ehun linfatikoetara bideratu eta askatzeko. Latenteke infektatutako zelulak GIBaren patogenesiaren adierazleak dira. Zelula hauek birus-gordailu gisa jarduten dute eta horri aurre egiteko nanoliposoma hauetan latentziaren konposatu berraktibatzaileak txertatu nahi ditugu. Nanoliposoma hauek zelula latenteak berraktibatzeko gai izan ziren, eta Siglec-1 adierazten duten zelula mieloideoengaitik harrapatuak izan ziren GM-ekiko dependentea den prozesu baten bitartez.

Odol periferikoan zein ehun linfatikoetan kokatutako zelula mieloideoek daramaten Siglec-1-ekiko espezifikoa den nanogarraiatzaile sistema garatu dugu. Teknologia honen bidez GIB-1 latentzia-berraktibatzaileak zein molekula-txertoak “santutegi anatomikoetara” bideratuko ditugu.

Hitz-gakoak: GIB-1, mDC, Gangliosidoak, nanoliposomak, latentzia-erreaktibatzailak, harrapaketa, Trans-infekzioa

Abstract

HIV-1 enters myeloid cells and infects bystander CD4⁺ T cells via Siglec-1 recognition of viral membrane gangliosides. Siglec-1 is up-regulated on monocytes of infected patients, and we also detected this receptor on myeloid cells residing in lymphoid tissues. Here we aimed to engineer liposomal nanocarriers to mimic HIV-1 membranes and target Siglec-1 for efficient delivery of therapeutic cargo to lymphoid tissue. Nanoliposomes bearing latency reactivators efficiently reactivated latently infected cells and were captured by Siglec-1⁺ myeloid cells in a GM dependent manner.

We have developed a nanocarrier system highly specific for Siglec-1⁺ myeloid cells located in peripheral blood and lymphoid tissues, a technology that could aid to deliver HIV-1 latency-reactivation molecules or candidate vaccines to key anatomical sanctuaries.

Keywords: HIV-1, mDC, Gangliosides, nanoliposomes, latency reactivators, capture, Trans-infection

1. Sarrera eta motibazioa

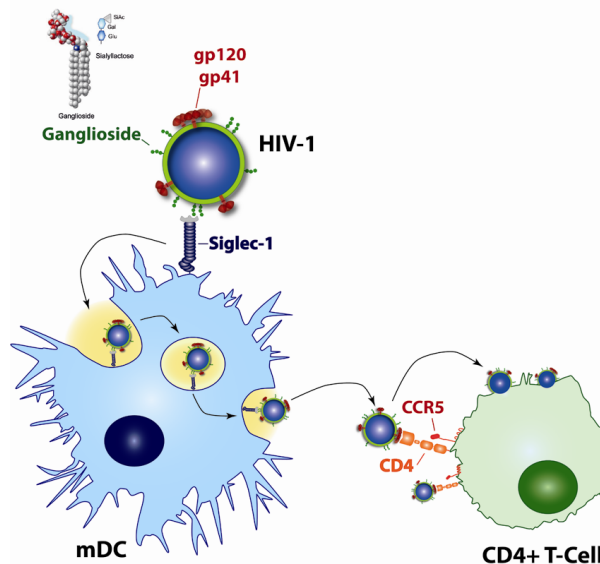
Giza Immunoeskasiaren Birusa-1 (GIB-1-a) HIES-aren eretrovirus eragilea da sistema immunearen infekzio kronikoa sortarazten baitu. 1980.urte aldera aditzera eman zenetik orain arte, 30 milioi heriotza baino gehiagoren eragilea izan da, eta egun, munduan, 34 milioi pertsona inguru dira GIB-arekin kutsatuta daudenak (UNAIDS 2012). Oraindik ordea, ez da sendagai edo txerto eraginkorrik aurkitu. Hala ere, birusa identifikatu zenetik, aurrerapen esanguratsuak egin dira arlo biologiko eta patologikoan, eta honek birusaren propagazioa behintzat kontrolarazten duten terapia berrien aurkikuntza ekarri du, gaixotasuna kronikoa bihurtaraziz. Normalean, eretrobirusen aurkako farmakoak terapia konbinatu moduan erabiltzen dira (HAART; ingelesez, highly active antiretroviral therapy) eta patologia- eta heriotza-tasen jaitsiera ekarri dute. Dena den, atxikipen terapeutikoa, tolerantzia eta luzarorako toxikotasuna, beraien erabilpenaren muga nagusi izaten darraite. Horrez gain, birusak mutazio-ratioa eta errekonbinazio maiztasun altuak ditu. GIB-ari aurre egitea, beraz, ez da lan erraza, eta ikertalde ugari dira arlo honetan ekarpenak egiteko asmoz dihardutenak.

Gaur egungo GIB infekzioa pairatzen dutenek egunero eretrobirusen aurkako farmakoak hartu behar dituzte. Pertsona horiei kontrolak egiten dizkietenean birus-kopurua detektaezina bihurtzen da; baina botikak alde batera utziz gero gaixotasuna berpizten da. Horren erantzulea infektatutako zelula latenteak dira. Zelula hauek, gaur egungo teknikentzako detektaezinak diren, birus kantitateak “sor” dezakete eta sistema immunitarioa ez da ohartzen zelula horiek infektatuak daudenik; beraz ez dira suntsitzen. Horrela “santutegi anatomikoak” bihurtzen dira non botikak ez dira erraz irixten. Gainera zelula latenteak bereizgarri egiten dituen “etiketa” molekularrak zeintzu diren ez dakizkigunez, zelula hauen suntsiketa zaildu egiten ari zaigu. Egoera honi aurre egin ahal izango bagenio, tratamenduak eraginkorragoak izango lirateke.

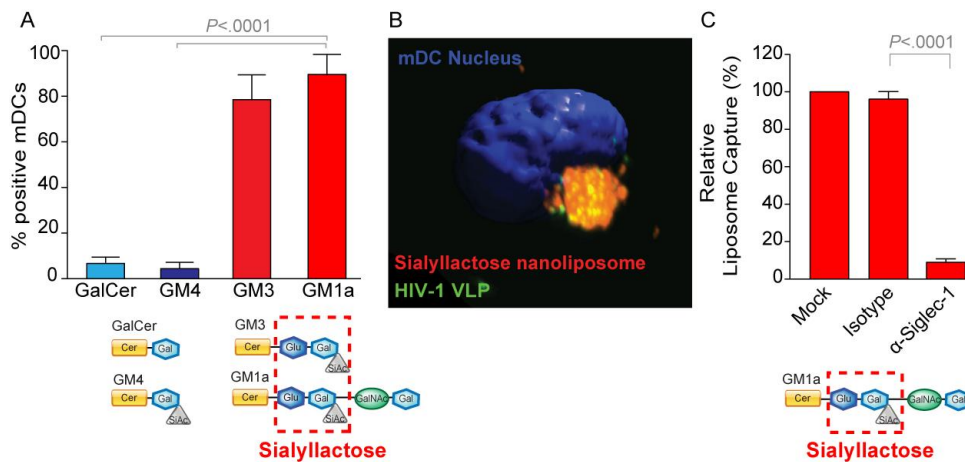
Gaur egungo eretrobirusen aurkako terapia, esan bezala, GIB-1-aren erreplikazioa inhibitzeko gai da, baina, besteak beste, ez du oztopatzen infektatutako zelula latenteen barruan birus-biltegiak ezartzea. Zailtasun handiena GIB-1 birus-biltegien berpiztean eta “santutegi anatomikoetatik” desagertaraztean datza (Izquierdo-Useros, et al., 2014). Zoritxarrez, eta berraktibatze konposatu ugari eskuragarri izan arren, batek ere ez du eraginkortasunik frogatu orain arte. Hori dela eta, estrategia konbinatuak eta berritzaileak behar dira birusa desagerrarazteaz gain, birusaren kontrako immunitate-kontrola sustatzen dutenak.

GIB-1-a estalki lipidiko batez inguraturik dago eta bertan, zelula ostalaria ezagutu eta infektatzeaz arduratzen diren fusio-proteinak (env) aurkitzen dira. Birusak ostalaria ezagutzen duenean (CD4+ zelulak) env CD4 hartzailera eta CXCR4 edo CCR5 kohartzaileetara lotzen dira, fusio prozesua ematen delarik. Modu honetan CD4+ zelula berria infektatzen da. Zelula dendritiko helduak (ingelesez mDC), ez direnak GIBagatik infektatzen, antigeno aurkezle indartsuak dira etengabe T zelulekin elkarrengaitan duten erantzun immunei hasiera emateko. Hala ere, GIB-1-ek strategiak garatu ditu mDC-ak dituen birus-aurkako ahalmena asaldatzeko. Horrela, CD4+ T zelulen infekzioa sustatzen du mekanismo berezi baten bidez: *trans-infekzioa*, alegia. Infekzio mekanismo honetan birusak mDC-ak dituen gainazaleko molekula-hartzaile bati estekatu eta zelulan barneratua izango da, mDC infektatu gabe. Azkenik, gongoil linfatikoetan dauden CD4+ T zelulei parasazi egingo zaie aurretik mDCak barneratutako birusak, bukaeran CD4+ T zelulak infektatuko dituelarik (1. Irudia). Duela gutxi GIB-1-ek burutzen duen *trans-infekzio* prozesuaren mekanismo molekularren oinarriak plazaratu genituen (1 eta 2. Irudiak). mDCaren gainazalean adierazten den Siglec-1 molekula-hartzaileak birusaren estalki lipidikoan dauden gangliosidoen sialil-laktosa molekulak ezagutu eta estekatzean oinarritzen da aipatutako mekanismo molekularra (Izquierdo-Useros/Lorizate, et al., 2012; Izquierdo-Useros et al., 2012).

Bide berri hau latenteki infektatutako zelulen berpiztea sustatzeko eta GIB-1 desagerrarazteko aukera paregabea da, Siglec-1 adierazten duten mDC-ei zuzendutako nanoliposomen bidez. Gainera, Siglec-1 bidezko ituraketa jarraitzen duten liposomek *in vivo* antigenoen aurkezpenean dihardutela frogatu da (Kawasaki et al., 2013).



1. Irudia. mDC-ak bideratutako GIB-1-aren Trans-infekzioa



2. Irudia. Nanoliposomen harrapaketa sialil-laktosarekiko dependentea da. A) Nanoliposoma fluoreszenteen mDC bidezko harrapaketa gangliosido motaren arabera. Irudiaren azpialdean gangliosidoen marrazkia, sialil-laktosadunak soilki harrapatuak dira. B) Mikroskopia konfokalaren bidez lorturiko mDC-harrapaketa irudiak. Gorri nanoliposomak, berdez GIB-1 partikula eta urdinez nukleoa. C) Harrapaketaren inhibizioa Siglec-1 hartzailearen estekaunean antigorputz bat lotu ostean (Izquierdo-Useros/Lorzate, et al., 2012).

2. Ikerketaren Helburuak

- 1) Siglec-1 adierazten duten Zelula Dendritiko helduak itu-zelula gisa erabiliko duten nanoliposomak diseinatu eta sintetizatzea. Nanoliposomen formulazioa hobetzea, hauen harrapaketa ahalik eta eraginkorren izan dadin.
- 2) Latentekei infektatutako CD4+T zelulen berraktibazioa eragitea. Horren ondorioz askatuko liratekeen GIB-1 berriek eragingo luketen berrinfekzioa inhibitzea. Hortarako mDCek aurretik harrapatutako berraktibatzaile eta birus aurkako konposatuak daramatzaten nanoliposomak askatuko lituzkete. Baina etorkizun batean, sistema immunitarioaren bide zitotoxikoa aktibatu nahi dugu, berpiztutako zelula latenteak suntsituak izateko.

3. Ikerketaren Muina

Latentekei infektatutako CD4+ T zelulak berraktibatzeke, mDC-en bidezko transmisio bidea ustiatuko dugu, mDC hauek berez GIB-1-ek erabiltzen duen Siglec-1 adierazten dutelarik. Horretarako GIB-1-arekiko tamainan eta lipido konposaketan antzekoak diren nanoliposomak eratu ditugu, bertan berraktibazio konposatuak daramatzatenak. Modu honetan nanoliposomak mDC-arengaitik harrapatuak izateaz gain, berraktibazio konposatuak eta eretrobirusen aurkako konposatuak CD4+T zeluletara bideratzeko gaitasuna

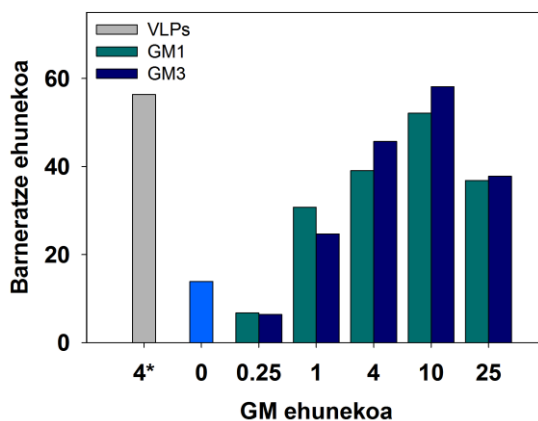
izango dute. Horrela nanoliposoma hauek barreiatu dauden bigarren mailako organo linfoideetara iritsiko dira. Gainera, barneratu egiten diren konposatuen erdi-bizitza eta potentzia handitu daiteke, eta toxizitatea, solubilitatea eta egonkortasuna hobetu daiteke honela.

3.1. Nanoliposomen formulazioa eta mDC bidezko harrapaketa.

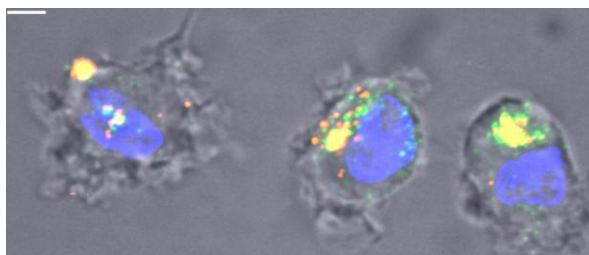
GIB-1ek bere estalki lipidikoa infektatutako zelula ostalariaren mintz plasmatikotik eskuratzen du gemazioz. Birusaren askapena ematen deneko mintzaren inguruneak *raft* motako ezaugarriak dituela dirudi (Lorizate eta Kräusslich, 2011). *Raft* lipidoak mintzeko mikrodomeinu dinamikoak dira eta kolesterol, esfingolipido eta saturaturiko glizerofosfolipidoetan aberastuta daude, l_0 deritzon likido-fase ordenatu egitura dutelarik (Simons, eta Ikonen, 1997). Birusaren mintz lipidikoa masa espektrometria bidez kuantifikatu ondoren, esfingolipidoetan, kolesterolan eta gantz azido aseetan aberatsa dela ikusi zuten (Brügger et al., 2006; Lorizate et al., 2013). Esfingolipidoen artean gangliosidoak bazeudela ere antzeman zen (Chan et al., 2008).

Duela gutxi, birusaren mintzaren gainazalean dauden zenbait gangliosidoren sialil-laktosa molekula mDC-tara sartzearen arduraduna dela aurkitu genuen. mDC-ek patroi-molekular hau daramaten edozein partikula (birusak, exosomak, liposomak etab.) harrapa dezakete. Jakin badakigu harrapaketa hau birusen fusio-glikoproteinarekiko guztiz independentea dela (Izquierdo-Useros/Lorizate et al., 2012). Nanoliposoma hauen eraginkortasuna ahalik eta altuena lortzearen gangliosido desberdinez eta gangliosido kantitate aldakorrez osaturiko nanoliposoma fluoreszenteak eraiki ziren eta beraien harrapaketa mDC-enganetik FACS bidez neurtua izan zen (3A. Irudia). Berriz ere, nanoliposoma hauek soilik gangliosidoak zituztenekoetan harrapatuak izaten ziren eta eraginkortasuna eta garraio-bidea GIB-1-ek egindakoaren berdina zela ikusi genuen (2. Irudia eta 3B irudia). Monozitoek jardura berdina erakutsi zigun, honekin odolean zehar aurki daitezkeen partikulak harrapatu daitezkeela ondoriozta daiteke, aurretik proposaturiko sistema erakargarriagoa bihurtuz. Erabilitako gangliosidoen artean ez zen desberdintasun argirik ikusi, hortaz GM1-ekin jarraitzea erabaki genuen gangliosidoen tamaina handiak nanoliposomei egonkortasuna ematen baitio. Kantitateari dagokionez, %10eko gangliosido kontzentrazioa izan da aukeraturikoa, hortik aurrerako kontzentrazioek eragin negatiboa baitzeukan harrapaketan, ziurrenik oztopo esterikoaren ordainez.

A



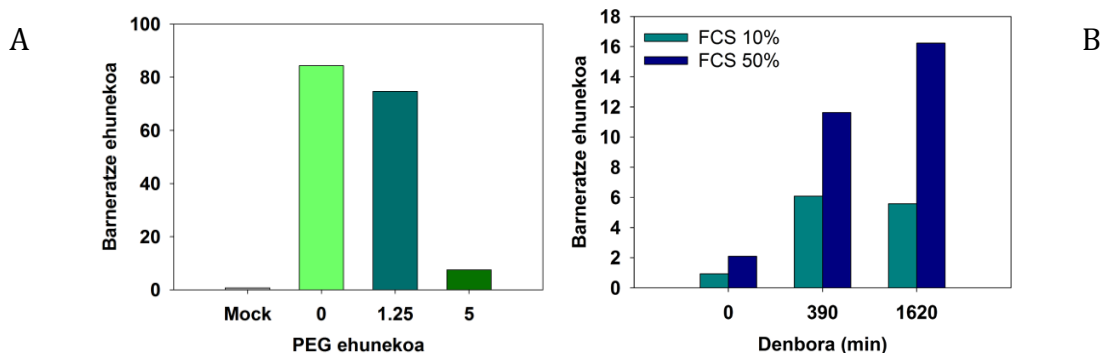
B



3. Irudia. mDC eta monozitoen bidezko nanoliposomen harrapaketa. A) Gangliosido kantitate desberdina erabili da eta GIB-1 birusaren harrapaketaekin konparatu da (VLP). B) Mikroskopia konfokalaren bidez lorturiko mDC-harrapaketa irudiak. Gorriz nanoliposomak eta berdez GIB-1 partikulak. Hori kolorea aurreko bi koloreak kolokalizatzean agertzen da. Marratxoak $2\mu\text{m}$ adierazten ditu. * argitaratutako GIBern GM3 kantitatea (Chan et al., 2008).

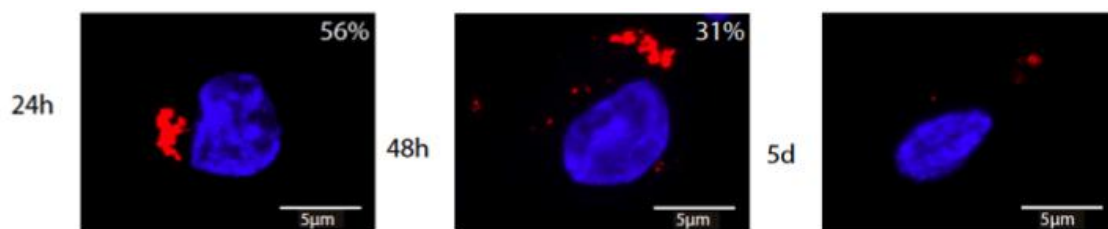
3.2. Nanoliposomen egonkortasuna eta *ex vivo* erretentzioa

Nanoliposomen egonkortasuna oso ezaugarri garrantzitsua da, izan ere organismoan zehar barreiatuak izan behar dira eta hainbat egunetan zehar modu egonkor batean mantendu behar dira. Gainera sistema immunearen erasoak ekiditu behar dute. Honetarako lipido baten buru polarrean polietilenglikola (PEG) atxikituta duen lipidoa erabili genuen eta gangliosidodun nanoliposomen egonkortasuna *in vitro* eta *ex vivo*, mDC-tan, aztertu genituen (4. eta 5. Irudiak).



4. Irudia. Nanoliposomen egonkortasuna *in vitro* eta *ex vivo*. A) PEG lipidodun portzentaia desberdinetako nanoliposomak mDC-aren bidezko harrapaketa duen eragina. Geziak hurrengo sailaketarako erabiliko den nanoliposoma mota adierazten du. B) PEG portzentaiadun nanoliposoma horiek duten egonkortasuna sero portzentaia desberdinen aurrean.

Nanoliposomen konposaketan PEG-dun lipidoak izatea mDC bidezko harrapaketa eragina eduki dezakeela espero genuen, PEG-aren egiturak nanoliposoman dauden gangliosidoen sialil-laktosa molekula ezkuta baitezake, hortaz zenbat eta PEG gehiago eduki, harrapaketa portzentaia murrizten da (4A irudia). Erabilitako portzentaia artean %1,25 PEG ehunekoak, PEG-rik gabeko nanoliposomen harrapaketa maila berean aurkitzen zenez, eta *in vitro* saiok nanoliposoma hauek egonkorak zirela adierazten zuten (4B irudia), aurrerantzean portzentaia hori erabili genuen gainerako frogetan.



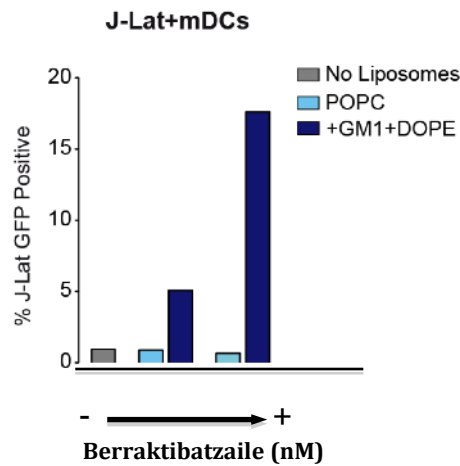
5. Irudia. Nanoliposomen harrapaketa eta denbora zeharreko erretentzioa mDC-tan. Nanoliposomak mDC-rekin kontaktuan jarri eta gero denboran zehar aurkezten duten erretentzio maila adierazten da. Gorriz nanoliposomak eta urdinez nukleoa.

Nanoliposoma egonkor hauek mDC-en barruan aurkezten duten erretentzio-denbora ikertu nahian, harrapaketa osteko denbora-tarte desberdinetan zelula barruan aurki genezakeen nanoliposomen seinalea mikroskopio konfokalez behatu genuen. Zelula hauek antigenoen aurkezleak izanik, barneratutako nanoliposoma edota birus kantitate bat degradatuak izatera bideratuko du, geroxeago antigenoen aurkezpena egin ahal izateko; beraz denboraren poderioz seinale murrizketa espero da. Hori bai, Birusarekin gertatzen zen bezala (Izquierdo-Useros/Naranjo, et al., 2009) luzaroan mantentzen dira nanoliposomak. Eraitza honek nanoliposomen funtzionaltasunari buruzko ideia bat ematen digu; luzaroan gure nanoliposomak mDC-tan mantenduko dira T zelulekin elkarrekintzak emateko probabilitatea handituz.

3.3. Erreaktibazio eta erretrovirus aurkako konposatuen txertaketa

Erretentzio handiko eta egonkorak diren nanoliposomak garatu eta gero, latentziazko berraktibatzaileak txertatzea izan zen hurrengo pausua. Kasu honetan aukeratutako berraktibatzaileak gaur egun OMEK onarturiko konposatuak dira. Bere izaera hidrofobikoei esker nanoliposomaren mintzean txertatuta geratzea

espero genuen. Eginiko lehen saio batek berraktibatzaileak, mDC-ak harrapatu ostean, CD4+T zelula ereduak berraktibatzeke gai direla adierazten digu (6. Irudia).



6. Irudia. Nanoliposomen bidezko CD4+ T zelula ereduaren berraktibazioa. Berraktibazioa nanoliposomen konposaketa eta berraktibatzailearen kontzentrazioaren arabera da.

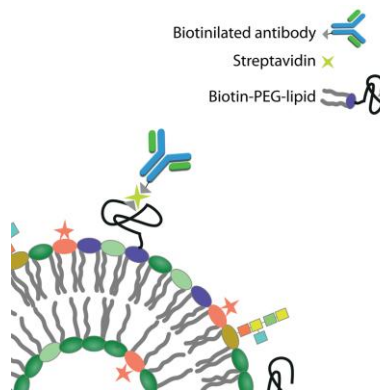
4. Ondorioak

Nanogarraiatzaile sistema egonkorra garatu dugu. Odol periferikoan zein ehun limfatikoetan kokatuta dauden zelula mieloideoek daramaten Siglec-1-ekiko espezifiko den nanogarraiatzaile sistema hain zuzen ere. Teknologia honen bidez GIB-1 latentzia berraktibatzaileak txertatu eta CD4+T zelulak berpiztea lortu dugu. Zelula latenteak berpiztea gaur egungo erronka nagusi bat bihurtzen ari baita GIB inguruko ikerketa munduan.

Garrantzitsua da ohartzea garatutako sistema honen bidez mDC-ak edozein farmako ituratu dezakela organo linfoideetara, kasu honetan GIBaren aurkakoa, baina bestelako gaixotasun mieloideotara estrapola liteke.

5. Etorkizunerako iradokitzen den norabidea

Lortutako nanogarraiatzaileak mDCarekiko espezifikoak dira baldin eta bere baitan GM badaramatzate; baina CD4+ T zeluletara ituratzeko espezifikotasuna garatzea falta zaigu. Nanoliposomen ituraketa CD4+ T zeluletara izan dadin, antigorputza espezifikoak daramatzaten immunonanoliposomak garatu behar ditugu (7. Irudia). CD4 hartzaile ezagutu, estekatu eta endozitosia piztuko duen antigorputz bat nanoliposometan lotzean datzana.



7. Irudia. Immunoliposomen garapena

Bestalde zelula latenteak berpizterakoan zelula horiek suntsitu behar dira. Hortarako CD8+T ren erantzun zitotoxikoa piztu egin behar da. GIB-1-tik eratorritako proteinak beste nanoliposometan kapsulatu nahi

ditugu. mDCak antigenoen aurkezleak izanik, prozesatutako proteinak euren mintz plasmaticoan antigeno moduan erakutsiko dituzte, CD8+ T zelulen GIB-1 aurkako erantzun zitotoxikoa piztuz.

6. Erreferentziak

- Brügger B, Glass B, Haberkant P, Leibrecht I, Wieland FT eta Kräusslich HG. (2006) The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(8):2641-6.
- Chan R, Uchil PD, Jin J, Shui G, Ott DE, Mothes W eta Wenk MR. (2008) Retroviruses human immunodeficiency virus and murine leukemia virus are enriched in phosphoinositides. *J Virol*. 82(22):11228-38. doi: 10.1128
- Izquierdo-Useros N, Lorizate M, Contreras FX, Rodriguez-Plata MT, Glass B, Erkizia I, Prado JG, Casas J, Fabriàs G, Kräusslich HG eta Martinez-Picado J. (2012) Sialyllactose in viral membrane gangliosides is a novel molecular recognition pattern for mature dendritic cell capture of HIV-1. *PLoS Biol*. 10(4):e1001315. doi: 10.1371
- Izquierdo-Useros N, Lorizate M, McLaren PJ, Telenti A, Kräusslich HG eta Martinez-Picado J. (2014) HIV-1 capture and transmission by dendritic cells: the role of viral glycolipids and the cellular receptor Siglec-1. *PLoS Pathog*. 10(7):e1004146. doi: 10.1371
- Izquierdo-Useros N, Lorizate M, Puertas MC, Rodriguez-Plata MT, Zangger N, Erikson E, Pino M, Erkizia I, Glass B, Clotet B, Keppler OT, Telenti A, Kräusslich HG eta Martinez-Picado J. (2012) Siglec-1 is a novel dendritic cell receptor that mediates HIV-1 trans-infection through recognition of viral membrane gangliosides. *PLoS Biol*. 10(12):e1001448. doi: 10.1371
- Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gómez M, Archer J, Hatch SC, Erkizia I, Blanco J, Borràs FE, Puertas MC, Connor JH, Fernández-Figueras MT, Moore L, Clotet B, Gummuluru S eta Martinez-Picado J. (2009) Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood*. 113(12):2732-41. doi: 10.1182
- Kawasaki N, Vela JL, Nycholat CM, Rademacher C, Khurana A, van Rooijen N, Crocker PR, Kronenberg M eta Paulson JC. (2013) Targeted delivery of lipid antigen to macrophages via the CD169/sialoadhesin endocytic pathway induces robust invariant natural killer T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(19):7826-31. doi: 10.1073
- Lorizate M eta Kräusslich HG. (2011) Role of lipids in virus replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Oct 1;3(10):a004820. doi: 10.1101/cshperspect.a004820.
- Lorizate M, Sachsenheimer T, Glass B, Habermann A, Gerl MJ, Kräusslich HG eta Brügger B. (2013) Comparative lipidomics analysis of HIV-1 particles and their producer cell membrane in different cell lines. *Cell Microbiol*. 15(2):292-304. doi: 10.1111
- Simons K eta Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387(6633):569-72.
- UNAIDS 2012. <http://www.unaids.org/es/dataanalysis/>

7. Eskerrak eta Oharrak

Aurkezten zaizuen lan hau amfAR Mathilde Krim Fellowship 108676-55-RKRL bidez dago finantziatua. JA. Nieto-Garai Eusko Jaurlaritzako beka predoktoral baten onuraduna da.