



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (UnB)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE SAÚDE (FS)

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES
ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE CD4 MEDIADA POR
DIFERENTES ALELOS DA PROTEÍNA NEF DO HIV-1**

MARCOS VINÍCIUS PEREIRA GONDIM

ORIENTADOR: ENRIQUE ROBERTO ARGANARAZ

Brasília, 08 de setembro de 2011

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FACULDADE DE SAÚDE – FS

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES
ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE CD4 MEDIADA POR
DIFERENTES ALELOS DA PROTEÍNA NEF DO HIV-1**

MARCOS VINÍCIUS PEREIRA GONDIM

ORIENTADOR: ENRIQUE ROBERTO ARGANARAZ

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade de Brasília, como
requisito parcial para obtenção
do título de Mestre**

Brasília, 08 de setembro de 2011

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE SAÚDE – FS

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES
ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE CD4 MEDIADA POR
DIFERENTES ALELOS DA PROTEÍNA NEF DO HIV-1**

Banca Examinadora

Prof. Dr. Enrique Roberto Argañaraz (orientador) - Universidade de Brasília

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro – Universidade de Brasília

Profª. Drª. Andréia Motoyama – Universidade de Brasília

“Para cada esforço disciplinado há uma retribuição múltipla.”

Jim Rohn

“Se você não mudar a direção, terminará exatamente onde começou”

Antigo provérbio chinês

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Anair e Éder, em especial, minha querida e amada mãe, por sempre me incentivar e nunca me deixar desistir, e por me levantar todas as vezes que cai. Vocês me serviram, servem e continuarão servindo como exemplo.

À minha noiva, Déborah, que esteve ao meu lado desde o início desta jornada e que me apoiou, compreendeu , esperou e acima de tudo sempre me fez sentir amado.

Aos meus irmãos, Sarah e Raphael, e amigos por fazer meus dias mais felizes.

A todos meus familiares.

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao meu orientador e colega, Prof. Dr. Enrique Roberto Argañaraz, por estar sempre me pressionando, fazendo ver que minhas limitações estão onde eu quero que elas estejam, e que sempre posso melhorar. Por acreditar no meu trabalho e na minha capacidade, me proporcionando a oportunidade de abrir os meus horizontes e crescer tanto profissionalmente quanto espiritualmente. Pela grande chance de mostrar meu trabalho no exterior. Por se dedicar esses quase dois anos, também, ao meu ensino. A tudo isto e muito mais, meus sinceros e profundos agradecimentos. *Obrigado professor.*

- ✓ Ao meu companheiro de churrasco, grande anfitrião, chefe singular, parceiro de trenó, o Prof. Dr. Michael Schindler do Instituto Heinrich Pette de Hamburgo-Alemanha, que me ensinou, acolheu, ajudou em momentos difíceis e me fez sentir em casa mesmo tão longe. *vielen Dank für all Freund .*

- ✓ À minha noiva amada por estar sempre do meu lado, ter compreendido e me apoiado nas minhas decisões, mesmo que algumas fossem nos separar fisicamente. Por sempre me receber com um sorriso e trazer alegria ao meu coração quando estou cabisbaixo, me fazendo sentir o homem mais feliz. Por atravessar o mundo para me encontrar, me buscar e me aceitar em casamento. *Te amo.*

- ✓ Aos meus pais e irmãos, esta família que esteve sempre do meu lado, nos bons e maus momentos, acompanhando e fazendo parte do meu crescimento como homem. A estes quem devo meu caráter e minha educação. Em especial, agradeço a minha mãe por me ensinar que o bom de viver é viver. Por ser uma vencedora e me ensinar o caminho para ser um vencedor. A vocês; mãe, pai, irmão e irmã. *Muito obrigado pelo amor, carinho e compreensão!*

- ✓ A todos os amigos que fiz no Instituto Heinrich Pette. Principalmente ao Marcel, Carina, Herwig, Kristin, Nicole, Sarah e Alicja, que me acolheram tão e me trataram tão bem. *Dank Kollegen.*

- ✓ À minha sogra, Jovânia de Oliveira, pelo apoio, palavras de incentivo e acima de tudo, por ter cuidado do bem mais valioso que tenho quando eu estava fora. *Muito obrigado.*

- ✓ À minha madrinha Hildete Ramthum, pelo tanto que apoiou meus estudos, ajudou na minha viagem e em toda minha vida. A quem considero como uma segunda mãe e me tratou e trata como um filho. *Muito obrigado.*
- ✓ À Elenice Argañaraz, por ter acreditado em mim e me apresentado ao professor. *Obrigado por abrir a porta do meu futuro.*
- ✓ Aos meus familiares que sempre se lembraram de mim quando estava longe.
- ✓ Aos meus amigos e padrinhos Shila e Thiago, pela presença em minha vida, pelo carinho e apoio. *Valeu gente.*
- ✓ À minha querida amiga Lisa Minari, pelo apoio e preocupação.
- ✓ Ao meu primo Juliano por ter me ajudado nos preparativos da viagem.
- ✓ Aos meus amigos do laboratório; Ricardo, Mariana Roll, Marthina, Nayara, Thiago, Rômulo, Érica Alves, Érica Sampaio, Federico, Biatriz, Monique e Mariana. Pelo carinho e amizade que recebi nestes últimos anos.
- ✓ Especialmente a Ieler por tanto ter me ajudado, apoiado e por sua amizade fiel.
- ✓ Ao meu grande amigo Mikael, que tanto me ajudou e tantas memórias divertidas de dentro e fora do laboratório.
- ✓ À Luana pela amizade tanto no laboratório, quanto fora dele e pelos ótimos conselhos de viagem.
- ✓ À querida Cristina Simeoni (Cris) pela ajuda profissional, pelos bons momentos de conversas e pela grande amizade.
- ✓ À Rilva Grigório, por ter me ensinado, ajudado e pela compreensão.
- ✓ À Prof^a. Dr^a. Andréia Motoyama, por sempre estar disposta a tirar dúvidas e me ajudar em tudo o que precisei.

- ✓ À Profª. Drª. Marie Togashi, pelos bons conselhos e pela ajuda quando necessitei.
- ✓ À todas as secretárias(os) do programa de pós graduação em ciências da Saúde, em especial, Edigrês, Francisca, Thais e Karla por toda a sua ajuda e paciência .
- ✓ Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Prof. Dr. Franciso de Assis, por me fazer ver que sempre devo mostrar o meu melhor e nunca me contentar em mostrar apenas o suficiente.
- ✓ Ao Prof. Dr. Luís Simeoni, por se preocupar e aconselhar sobre a viagem.
- ✓ Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Prof. Dr. Bergmann Morais, pela oportunidade de obter o título de doutor e dar continuidade a minha jornada no caminho da ciência.
- ✓ Aos integrantes do laboratório de Biologia Molecular do IB, que me ajudaram muito no início da minha jornada como cientista.
- ✓ Aos integrantes da banca examinadora; Prof. Dr. Enrique Roberto, Prof. Dr. Franciso de Assis, Prof. Dr. Bergmann Morais e Profª Drª. Andréia Motoyama, por aceitarem o convite e por toda a compreensão, educação e cortesia
- ✓ Enfim, a todos aqueles que de alguma forma me auxiliaram no desenvolvimento deste projeto. Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A diminuição da expressão do receptor CD4 na superfície das células infectadas é um dos mais importantes eventos durante a infecção pelo HIV-1. Foi observada uma clara relação entre a degradação do receptor viral, o aumento da infectuosidade e a replicação viral, sugerindo a participação deste fenômeno na patogênese e progressão da infecção. Para vencer os efeitos negativos exercidos pela expressão da molécula CD4, o HIV possui três proteínas: *Nef*, *Vpu* e *Env*, sendo *Nef* a proteína mais relevante neste fenômeno. *Nef* agiria na superfície celular como um conector da cauda citoplasmática da molécula CD4, com membros do complexo adaptador heterotetramérico de clatrina, redirecionando a molécula CD4 para vesículas endocíticas. Uma bomba de prótons vacuolar (V-ATPase) e a proteína Epsn15 foram envolvidas no aumento da força de ligação entre *Nef* e a subunidade $\mu 2$ de AP-2. Com a finalidade de evitar a reciclagem de CD4 para a superfície celular, uma segunda conexão entre CD4 e a proteína β -COP é estabelecida por *Nef*, o que permite direcionar o receptor para degradação lisossômica. Adicionalmente, duas proteínas foram também envolvidas no mecanismo a tioesterase humana II (hTE-II) e a dinamina 2 (Dyn2). Experimentos para validar o papel dessas proteínas celulares e sua relevância fisiológica não foram conclusivos. Por esse motivo nos propomos neste trabalho a caracterizar as interações entre algumas das proteínas celulares e diferentes alelos da proteína *Nef*. Os níveis de interação entre as proteínas celulares hTEII, CD4, V1H, β -COP, AP1 σ , AP2 μ e AP2 σ e diferentes alelos da proteína *Nef* do HIV-1 e de SIV (*Nef*.NA7, NL4.3 e Mac239, respectivamente), assim como mudança de localização intracelular foram avaliados pelas técnicas de transferência relativa de energia de fluorescência (FRET) e microscopia confocal. As proteínas hTEII, AP2 μ e β -COP, embora tenham mostrado elevados níveis de interação com os alelos de *Nef* NL4.3, NA7 e Mac239, demonstraram importantes diferenças por FRET e confirmados por microscopia confocal, sendo que algumas proteínas tiveram também sua localização intracelular alterada. Resultados similares foram observados quando analisadas as interações entre as proteínas celulares e o alelo Mac239 de SIV, detectando-se elevados níveis de interação entre este alelo e a proteína celular AP2 μ , assim como uma mudança na localização da proteína celular. Já as proteínas V1H, AP1 σ e AP2 σ AP1 não evidenciaram níveis significativos de interação com os alelos de *Nef* por ambas as técnicas. As proteínas AP2 μ e β -COP e o receptor CD4 mostraram uma significativa interação, mas não foi observado mudanças na localização das mesmas. Adicionalmente, foram construídos vetores lentivirais codificando RNAs de interferência (RNAsi) contra as diferentes proteínas celulares e virais, com o intuito de avaliar o impacto fisiológico das mesmas na degradação de CD4 no contexto da infecção viral. A eficiência dos diferentes vetores no silenciamento gênico foi confirmada, entretanto, experimentos exploratórios para avaliar o impacto da inibição da expressão das proteínas celulares na degradação de CD4 mediada por *Nef* não foram conclusivos, precisando-se realizar experimentos adicionais com mudança nas condições experimentais.

Palavras-chave: Alelos *Nef*, FRET, HIV-1, SIV-1, Diminuição da expressão de CD4, Patogênese CD4.

ABSTRACT

The reduction of the receiver's expression CD4 in the infected cells surface is one of the most important events during the infectious process by HIV-1. It was observed a clear relationship among the viruses' receiver degradation, the increase of infectious and virus' replication, suggesting the participation of this phenomenon in infection pathogenesis and progress. To overcome the negative effects carried on by the molecular expression. CD4, HIV has three proteins: *Nef*, *Vpu* and *Env*, being *Nef* the most relevant protein in this phenomenon. *Nef* could act in cell surface as a link of the molecular cytoplasmic tail CD4 with the members of the complex adapter hetero tetramer of clathrin, redirecting the CD4 molecule to the endocytic vesicles. A bomb of vacuole protons (V-ATPase) and the protein Espn 15 were involved in the increase of bond strength between *Nef* and the subunit $\mu 2$ of AP-2. In order to avoid CD4 recycling to cell surface, another connection between CD4 and β -COP proteins is established by *Nef*, which allows direct the receiver to the lysosomal degradation. Additionally, two proteins were also involved in this mechanism, human histone deacetylase II (hTERT) and the dynamin 2 (Dyn2). Experiments to validate the role of these cell proteins and its physiological relevance were not conclusive. For this reason we propose in this work characterize the interactions between some cell proteins and *Nef*'s protein different alleles. In both, the interactions and the location levels among some cell proteins as: hTERT, CD4, V1H, β -COP, AP1 α , AP2 μ and AP2 α and different alleles of *Nef* protein of HIV-1 and SIV (*Nef*. NA7, NL4.3 and Mac 234, respectively), were evaluated by the techniques Relative transference of fluorescence energy (FRET) and Confocal microscopy. The proteins hTERT, AP2 μ and β -COP, although have shown high levels of interaction with *Nef* NL 4.3, NA7 and mac 239 alleles, demonstrated important differences among them. These levels of interaction were detected by FRET and confirmed by Confocal microscopy, of which some proteins also had their intracellular locations changed. Similar results were observed when interactions have happened between cell proteins and similar alleles Mac 239 of SIV, detecting high levels between this allele and the cell protein AP2 μ , observing a change in the location of the protein, too. On the other hand, the proteins V1H, AP1 α and AP2 α , AP1 did not evidence significant levels of interaction with *Nef* alleles for both techniques. The analysis of interactions between cell proteins and CD4 receiver showed a significant interaction with AP2 μ and β -COP proteins, but they did not induce changes in their location. Furthermore, there were lentiviral vectors encoding Interference RNAs (RNAs) against different cell proteins and viral. For the purposes of evaluate the physiological impact of CD4 degradation in viral infection context. The efficiency of different vectors in gene silencing was confirmed, however, exploratory experiments to rate the impact of inhibition in cell protein expression. in CD4 degradation, mediated by *Nef*, were not conclusive. It is necessary carry out additional experiments with change of experimental conditions.

Key words: Alleles *Nef*, FRET, HIV-1, SIV-1, CD4 down-modulation, pathogenesis.

Lista de Figuras

Figura 1.1. Numero estimado de indivíduos portadores de HIV no ano de 2009.....	5
Figura 1.2. Estrutura genômica do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1).....	8
Figura 1.3. Estrutura da partícula viral do HIV-1.....	14
Figura 1.4. Ciclo de replicação do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1).....	15
Figura 1.5. Mecanismos envolvidos na diminuição da expressão de CD4 da superfície da célula pelo HIV-1.....	22
Figura 1.6. Localização de motivos funcionais na estrutura da proteína Nef do HIV-1.....	24
Figura 1.7. Alinhamento de diferentes alelos da proteína Nef do HIV-1 e a localização de seus motivos funcionais.....	26
Figura 3.1. Esquema de clonagem das sequências dos diferentes genes nos vetores de expressão pECFP/YFP.....	43
Figura 3.2. Construção do vetor lentiviral pNL-SIN-PGK-EGFP-NEO.....	45
Figura 3.3. Construção do vetor lentiviral pNL-SIN-PGK-EGFP-NEO-RNAi.....	46
Figura 3.4. Estratégia para medir FRET por FACS.....	51
Figura 4.1. Confirmação da construção de vetores de expressão pECFP contendo as diferentes sequências correspondentes aos genes celulares.....	55
Figura 4.2. Expressão e localização celular de proteínas de fusão.....	56

Figura 4.3. Caracterização da interação entre as proteínas celulares e a proteína Nef Na7 por FRET.....	58
Figura 4.4. Níveis de interação direta entre as proteínas celulares e a proteína Nef NL4.3 por % de FRET.....	60
Figura 4.5. Níveis de interação direta entre as proteínas celulares e a proteína Nef Mac239 por % de FRET.....	62
Figura 4.6. Níveis de interação direta entre as proteínas celulares e a proteína celular CD4 por % de FRET.....	63
Figura 4.7. Caracterização da localização celular das proteínas celulares parceiras de Nef na presença da variante Nef NA7 do HIV-1.....	69
Figura 4.8. Caracterização da localização celular das proteínas celulares parceiras de Nef na presença da variante Nef Mac239 de SIV.....	71
Figura 4.9. Caracterização da localização celular das proteínas celulares parceiras de Nef na presença do receptor de superfície celular CD4.....	73
Figura 4.10. Confirmação da construção de vetores lentivirais codificando RNAsi contra diferentes proteínas celulares.....	75
Figura 4.11. Bloqueio da expressão de proteínas celulares fusionadas a CFP mediante o uso de RNAi.....	76
Figura 4.12. Quantificação de partículas virais codificando RNAsi.....	77
Figura 4.13. Inibição da expressão endógena por RNAi de proteínas celulares envolvidas na degradação de CD4 mediada por Nef.....	78
Figura 4.14. Níveis de expressão do receptor CD4 em células Jurkat transduzidas com vetores lentivirais expressando RNAi.....	79

Figura 4.15. Plot correspondente às células transduzidas com vetores lentiviral-RNAi e infectada com HIV-1.....81

Figura 4.16. Média de Intensidade de Fluorescência CD4-APC em células Jurkat.....82

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Relação dos genes do HIV-1 e algumas de suas funções.....	12
Tabela 1.2. Descrição das interações entre Nef e proteínas celulares.....	28
Tabela 3.1. Sequências de <i>primers</i> para amplificação de proteínas celulares e alelos de Nef.....	40
Tabela 3.2. Listagem de anticorpos.....	48
Tabela 4.1. Porcentagem de interações entre as proteínas celulares, os alelos de Nef e a proteína CD4, determinados por FRET.....	66
Tabela 4.2. Níveis de interação/co-localização observados pela microscopia confocal.....	74

Sumário

CAPÍTULO 1. Introdução

1.1. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.....	2
1.1.1. Um breve histórico.....	2
1.1.2. Epidemiologia.....	4
1.1.3. Perspectivas no controle da AIDS.....	5
1.2. Diagnóstico, Manifestações Clínicas e Tratamento.....	6
1.2.1. Diagnóstico.....	6
1.2.2. Manifestações Clínicas.....	6
1.2.3. Tratamento.....	7
1.3. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1).....	8
1.3.1. Um breve histórico.....	8
1.3.2. Classificação Filogenética.....	13
1.3.3. Estrutura.....	14
1.4. Ciclo de vida do HIV – “Uma extraordinária viagem pela célula”.....	15
1.5. Patogênese da AIDS.....	18
1.5.1. A depleção de LT Auxiliares.....	18
1.5.2. Diminuição da expressão do receptor viral CD4 e sua relevância na patogênese da infecção pelo HIV-1.....	20
1.6. Estrutura de Nef e interação com as proteínas celulares.....	24
1.6.1. A proteína acessória Nef.....	24
1.6.2. Os parceiros celulares de Nef na degradação de CD4.....	27
1.6.2.1. A molécula de CD4.....	29
1.6.2.2. As proteínas adaptadoras de complexos (APs).....	29
1.6.2.3. Proteína VIH.....	30
1.6.2.4. Proteína COP-1.....	31
1.6.2.5. Proteína hTEII.....	31
1.6.2.6. Proteína Eps15.....	32
1.6.2.7. Proteína Dyn 2.....	32
1.7. Técnicas para caracterização de proteínas.....	32
1.7.1. A técnica FACS/FRET.....	32

1.7.2. A técnica de RNAi.....	33
-------------------------------	----

CAPÍTULO 2. Relevância da Pesquisa e Objetivos

2.1. Relevância da Pesquisa.....	36
2.2. Objetivos	
2.2.1. Objetivo geral.....	37
2.2.2. Objetivos específicos.....	37

CAPÍTULO 3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens celulares.....	39
3.2. Construção de vetores de expressão.....	39
3.2.1. Desenvolvimento de vetores de fusão codificando proteínas celulares e alelos da proteína Nef.....	39
3.2.1.1. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).....	39
3.2.1.2. Estratégia de clonagem.....	43
3.2.1.3. Clonagem.....	44
3.2.2. Desenvolvimento de vetores lentivirais codificando RNA de interferência para proteínas celulares e alelos de Nef.....	43
3.3. Produção de partículas virais.....	46
3.3.1. Transfecção de células e quantificação de partículas virais.....	46
3.4. Bloqueio da expressão gênica das proteínas celulares por RNAi.....	47
3.4.1. Transdução de células.....	47
3.4.2. Preparação do extrato protéico.....	47
3.4.3. Anticorpos utilizados.....	48
3.4.4. Eletroforese, Sorting, e Immunoblotting.....	48
3.4.5. Citometria de Fluxo/Sorting.....	49
3.5. Infecção/Superinfecção.....	49
3.6. Determinação dos níveis de CD4.....	50
3.7. Frequência Ressoante de Energia Transferida – FRET.....	50
3.7.1. Transfecção de células para FRET.....	50
3.7.2. Frequência Ressoante de Energia Transferida (FRET/FACS).....	50
3.8. Microscopia Confocal.....	51
3.8.1. Transfecção de células.....	51
3.8.2. Imagens de microscopia confocal.....	52

CAPITULO 4. Resultados e Discussão

4.1. Construção de vetores.....	55
4.1.2. Construção de vetores de expressão de proteínas de fusão.....	55
4.2. Expressão de proteínas celulares fusionadas.....	56
4.3. Caracterização da interação entre proteínas celulares e virais.....	57
4.3.1. Interação entre proteínas celulares e o alelo NA7 da proteína Nef.....	57
4.3.2. Interação entre proteínas celulares e o alelo NL4.3 da proteína Nef.....	59
4.3.3. Interação entre proteínas celulares e o alelo Mac239 da proteína Nef do SIV.....	61
4.3.4. Interação entre proteínas celulares e o receptor CD4.....	63
4.4. Análise de co-localização das proteínas celulares por microscopia confocal.....	67
4.4.1. Caracterização de interação entre proteínas celulares e o alelo Nef NA7 por microscopia confocal.....	67
4.4.2. Caracterização de interação entre proteínas celulares e alelo Nef Mac239 por microscopia confocal.....	70
4.4.3. Caracterização de interação entre proteínas celulares e o receptor CD4 por microscopia confocal.....	72
4.5. Avaliação do bloqueio das proteínas celulares induzido por RNA de interferência.....	74
4.5.1. Construção dos vetores codificando RNA de interferência.....	74
4.5.2. Silenciamento exógeno das proteínas celulares.....	75
4.6. Produção de partículas virais, infecção e superinfecção.....	77
4.6.1. Quantificação de p24.....	77
4.6.2. Silenciamento endógeno das proteínas celulares.....	78
4.6.3. Relevância fisiológica de proteínas celulares na degradação do receptor CD4 mediada por Nef.....	79

CAPITULO 5. Conclusões e Perspectivas

5.1. Conclusões.....	85
5.2. Perspectivas.....	86

CAPITULO 6. Referências Bibliográficas.....

87

CAPITULO 7. Anexos

7.1. Alinhamentos das proteínas celulares fusionadas.....	107
7.2. Lista de vetores fusionados a CFP/YFP.....	110
7.3. Lista de plasmídeos para produção de partículas virais.....	111

Lista de Siglas e Abreviaturas

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência	IN - integrase
AP1 σ – proteína adaptadora 1 subunidade sigma	Kb - kilobases
AP1 γ – proteína adaptadora 1 subunidade gamma	kDa - kilodalton
AP2 μ – proteína adaptadora 2 subunidade mu	LT – Linfócitos T
AP2 σ – proteína adaptadora 2 subunidade sigma	LTRs - <i>Long Terminal Repeat Sequences</i>
AP3 μ – proteína adaptadora 3 subunidade mu	MHC-I - Complexo de Histocompatibilidade do tipo I.
ARV - AIDS - <i>Associated Retrovirus</i>	miRNA- Micro RNA
AZT - zidovudina	OMS - Organização Mundial da Saúde
CA - capsídeo	pb - pares de base
CD4 – <i>Cluster of differentiation 4</i>	PBMC - células mononucleares de sangue periférico
DNA - ácido desoxirribonucléico	PR - protease
dsRNA – RNA de dupla fita	RE - retículo endoplasmático
Dyn 2 – Dinamina 2	RNA - ácido ribonucléico
Eps 15 – Substrato de Crescimento Epidermal 15	RNAi – RNA de interferência
FACS – <i>Fluorescence activated cell sorting</i>	RNAm – RNA mensageiro
FRET - <i>Fösters resonance energy transfer</i>	SDS - <i>Sodium dodecylsulfate</i>
gp120 - glicoproteína 120	siRNA – Pequenos RNAs de interferência
HAART - <i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i>	V1H – proteína vacuolar 1 subunidade H
Hck – kinase	β -COP – <i>coatomer protein subunit beta</i>
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana	
HIV-1 - Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1	
HIV-2 - Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2	
hTE – Tioesterase humana II Humana	
ICTV - <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>	

Capítulo 1. Introdução

1.1. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

1.1.1. Um breve histórico

A Síndrome da imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immune Deficiency Syndrome – AIDS*) é proveniente do vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus - HIV*). O principal quadro da progressão para esta síndrome começa na diminuição da expressão de linfócitos T auxiliares CD4⁺ (LTh) até sua total depleção no sistema imunitário [1-2]. A causa mais comum de óbito resultante desta síndrome é acompanhada por infecções oportunistas. O estágio clínico da infecção é crônico e a progressão à síndrome é lenta [3].

Os primeiros casos de infecção pelo HIV-1 foram relatados na década de 80 e rapidamente se tornou uma pandemia. Os problemas relacionados aos níveis de mortalidade causados pela infecção tiveram impactos diretos refletidos na economia quanto nos recursos de atendimento aos portadores do vírus. Em dezembro de 2009 a *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS* [4] relatou que mais de 25 milhões de pessoas já haviam morrido em decorrência da AIDS, em todo seu histórico desde 1981, sendo que só no ano de 2009 foram diagnosticados aproximadamente 33 milhões de pessoas vivendo com o vírus no mundo.

Levando em consideração os pontos apresentados pela *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*, percebe-se a importância dos esforços para o controle e combate à AIDS, uma vez que ainda não existe imunização profilática ou cura para essa enfermidade. Entretanto, avanços importantes foram alcançados nessa área.

Em 1983, por meio de pesquisas básicas de isolamento de agentes etiológicos, foram encontrados vastos números de dados os quais tiveram grande peso na identificação do HIV como sendo o vírus responsável pela progressão a AIDS. Já em 1986 este mesmo vírus foi dividido em dois tipos diferentes: HIV-1 e HIV-2, sendo que o primeiro, além de mais virulento, é o principal responsável pela disseminação da pandemia da AIDS. Enquanto que o HIV-2, além de menos patogênico, é encontrado apenas na região oeste da África [5] [6].

O estudo mais aprofundado do HIV-1 mostrou uma maior compreensão na transmissão deste patógeno, além do que auxiliou no desenvolvimento desenvolvimento

de drogas inibidoras da atividade viral [7].

O surgimento do sequenciamento de DNA abriu uma grande porta para a pesquisa sobre o HIV-1, com esta técnica foi possível montar diferentes bancos de dados a partir da análise do genoma viral, com isso possibilitou uma maior compreensão do comportamento do vírus no *in vivo* [8].

Os primeiros casos de AIDS foram relatados em 1981 e foram associados principalmente ao homossexualismo masculino. Por outro lado, a progressão à síndrome era relacionada ao câncer Sarcoma de Kaposi, ou a uma série de outras doenças oportunistas que afetavam diretamente aqueles indivíduos infectados [3].

Devido ao número de casos registrados HIV-1 positivos, a AIDS rapidamente alcançou proporções pandêmicas. A evidência desta síndrome em diferentes populações como; homens homossexuais ou heterossexuais, usuários de drogas, portadores de hemofilia, crianças e receptores de transfusões de sangue mostrou a presença de um mesmo agente responsável pela patologia, que tinha uma mesma forma de transmissão, por meio de fluídos corporais das pessoas sadias com as infectadas [8].

Provavelmente os dois pesquisadores principais responsáveis pela identificação e isolamento do HIV-1, foram Luc Montagnier, do Instituto Pasteur, em Paris/França, e Robert Gallo, do Centro para Controle e Prevenção de Doenças (*Centres for Disease Control and Prevention* - CDC), dos Estados Unidos. Outras importantes descobertas derivadas do isolamento do HIV foram; o isolamento da enzima transcriptase reversa [9] [10] e a descoberta da interleucina-2 [11], fator de crescimento essencial à cultura de células de linfócitos T necessárias à replicação do HIV *in vitro* [3].

Segundo Gallo, em 1980, o HTLV-1 foi o primeiro retrovírus humano (human T-cell lymphotropic vírus type 1 - HTLV-1). Este retrovírus seria o causador de leucemia em humanos. Esta descoberta (HTLV-1) foi de grande importância no processo de isolamento do HIV, o qual foi posteriormente confirmada por Yoro Hinuma e colaboradores em 1981[12]. Já em 1982 Gallo relatou um novo retrovírus humano denominado HTLV-II. E estes pesquisadores associaram a AIDS sendo causada por um vírus da mesma família do HTLV, por apresentar um mecanismo de transmissão muito parecido com o do HTLV.

Por sua vez, Luc Montagnier, em 1983, mostrou um retrovírus humano diferentes

de HTLV-I e HTLV-II, tendo sua morfologia semelhante à de um lentivírus. A partir da biópsia de um paciente infectado linfadenopatia, protocolo previamente estipulado por Gallo em 1982, Montagnier foi capaz de isolar este vírus [13], e ao haver notado no cultivo de linfócitos T dessa amostra, traços de transcriptase reversa, enzima esta presente em retrovírus, estes vírus isolados em cultura receberam a denominação de vírus associado à linfadenopatia (*lymphadenopathy associated virus* – LAV) [14]. Onde diferentemente de HTLV, estes vírus causavam a morte de linfócitos T auxiliares. Já Gallo, neste mesmo período, relatou um novo vírus com características diferentes dos vírus da família HTLV e denominou este de HTLV-III.

Jay Levy e colaboradores, em 1984, conseguiram isolar o vírus a partir de pacientes em quadro assintomático, mostrando o quadro clínico do portador viral, e denominando-o de retrovírus associado à AIDS (*AIDS-associated retrovirus* - ARV). Ainda em 1984, a relação do HIV como agente etiológico da AIDS foi aceita pela comunidade científica e médica [7], [14], [3].

Para padronizar a nomenclatura do vírus responsável pela progressão a AIDS, em 1986 o Comitê Internacional para Taxonomia dos Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses* - ICTV) decidiu nomear esse agente de *Vírus da Imunodeficiência Humana* (HIV) [15]. E ainda no mesmo ano foram criados testes comerciais para detecção do HIV (estratégia que diminuiu significativamente a transmissão do vírus por transfusão de sangue). Outros pontos que marcaram a história da AIDS trazendo grades melhorias para a vida dos portadores de HIV-1, foram a descoberta do AZT (1987) e o desenvolvimento da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) (1995) [7].

1.1.2. Epidemiologia

- Em 2009 foram relatadas aproximadamente 33 milhões de pessoas infectadas pelo HIV no mundo [4]
- Sendo que aproximadamente 2,6 milhões de pessoas foram infectadas pelo vírus apenas no ano de 2009 [4]
- Foram relatados mais de 1,8 milhões de óbitos, em 2009, advindos da AIDS [4]
- A UNAIDS mostrou que em 2009 havia uma média de 7000 pessoas infectadas por dia pelo HIV [4]

➤ Cerca de 97% dos recém-infectadas são provenientes de países pobres e possuem uma idade superior a 15 anos, sendo que 51% a 85% das pessoas infectadas são do sexo feminino [4].



Figura 1.1. Número estimado de indivíduos portadores de HIV no ano de 2009 [4].

1.1.3. Perspectivas no controle da AIDS.

A AIDS certamente é uma das patologias humanas que mais despertam medo, preocupação e ansiedade de respostas por parte da sociedade. O desenvolvimento de novas drogas e de novas estratégias para controle e redução do número de pessoas infectadas se faz necessário e urgente. Em 2006, na XVI Conferência Internacional de AIDS, ficou claro que é necessário o empenho de toda população mundial para que possa se lograr o controle e até a cura desta síndrome.

Um dos grandes problemas no controle da AIDS está no surgimento de variantes resistentes aos inibidores presentes no coquetel antirretroviral, a permanência de reservatórios virais latentes e a presença de efeitos tóxicos colaterais causados pelo tratamento e o alto custo das drogas disponíveis no mercado. Dessa forma, a pesquisa de mecanismos básicos de patogênese volta a desempenhar um papel crucial na identificação de novos alvos farmacológicos e consequentemente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de vacinas eficientes e seguras.

1.2. Diagnóstico, Manifestações Clínicas e Tratamento

1.2.1. Diagnóstico

O diagnóstico para detecção da infecção pelo HIV é realizado por meio de testes laboratoriais que envolvem a detecção de anticorpos por ensaio imunoenzimático (ELISA), entretanto, este exame pode ser reativo devido à alta sensibilidade do teste, fazendo-se necessário o uso de métodos mais específicos, como “western blotting”, imunofluorescência e diagnóstico molecular, em caso de janela imunológica, como a reação de polimerização em cadeia (PCR) usada em pesquisas [6].

Os testes utilizados são incapazes de identificar pessoas recentemente infectadas, uma vez que após a infecção, demora-se de 6 a 12 semanas para que haja a produção de anticorpos (soroconversão), período este denominado janela imunológica. Os testes utilizados apresentam geralmente níveis de até 95% de positividade nos primeiros seis meses após a infecção [16].

1.2.2. Manifestações clínicas

A infecção pelo HIV pode ser dividida em dois diferentes estágios ou fases: fase aguda e fase crônica. Na fase aguda, que pode ser assintomática, a contagem de linfócitos T CD4 é superior a 500 células/mm³. Quando presentes os sintomas, que só aparecem durante o pico de viremia e no início da resposta imunitária (apresentados em sintomas como gripe, febre, linfadenopatia, certa perda de peso, náusea, vômito e hepatoesplenomegalia), é possível que também surjam doenças oportunistas como candidíase oral, meningoencefalite, tuberculose, pneumonia e síndrome de Guillain-Barré [6].

Na fase crônica ou tardia, a contagem de linfócitos T CD4 cai drasticamente entre 50 a 200 células/mm³. Nessa fase os pacientes estão muito mais susceptíveis a infecções oportunistas causadas por vírus, bactérias, fungos e protozoários, como exemplos tem-se: pneumonia decorrente da infecção por *Pneumocystis carinii*, criptosporidíase, encefalite por *Toxoplasma Gondii*, e alguns tipos de neoplasia, como sarcoma de Kaposi e linfoma não Hodgkin [6].

1.2.3. Tratamento

O surgimento da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) proporcionou ao paciente drástica supressão da replicação viral, aumentando-lhe o tempo e a qualidade de vida. Atualmente, os diversos antirretrovirais licenciados têm como alvo molecular, principalmente, as enzimas transcriptase reversa (RT), protease (PR) e integrase (IN).

Após o uso do coquetel antirretroviral por mais de uma década, o tratamento mostrou ter sérias limitações: ineficácia na erradicação da infecção, dada à persistência de reservatórios virais, o surgimento de variantes resistentes, devido a mutações e finalmente, por apresentar sérios efeitos colaterais, como alterações no metabolismo de lipídeos que redundam, em alguns casos, em acidentes cardiovasculares, lipodistrofia muscular e ainda alterações neurológicas [17], [18]. Dentro dessa nova realidade e graças aos novos conhecimentos trazidos pela pesquisa básica, novas drogas e abordagens terapêuticas estão sendo desenvolvidas.

Uma nova tendência no tratamento antirretroviral é a indução de resposta imunitária capaz de complementar o tratamento. Dessa forma, mediante o fenômeno chamado de “autoimunização”, conseguido pela interrupção temporária da terapia, busca-se estimular a resposta imune específica em pacientes submetidos à terapia antirretroviral.

Grande parte das mais promissoras drogas que estão sendo testadas em ensaios clínicos visa inibir a interação entre as proteínas virais e celulares. Estas drogas agem, basicamente, nos três diferentes estágios da entrada do vírus na célula hospedeira.

As drogas mais promissoras são as que agem no último estágio, onde ocorre a fusão das membranas virais e celulares. A mais promissora, dentre elas, é o inibidor T-20 [19], que foi aprovado pela “US Food and Drug Administration”.

Todavia, o uso dessas novas drogas ainda é demorado e requer grandes investimentos por parte das companhias farmacêuticas e por parte dos consumidores destes produtos. Além disso, deve-se ressaltar que muitas delas já não são eficazes para muitas pessoas infectadas pelo vírus. Frente a isso, o desenvolvimento de novas formas de terapia faz-se necessário.

1.3. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1)

1.3.1. Um breve histórico

O genoma do HIV (Figura 1.2) é relativamente grande, apresentando um número maior de genes quando comparados a outros retrovírus [20].

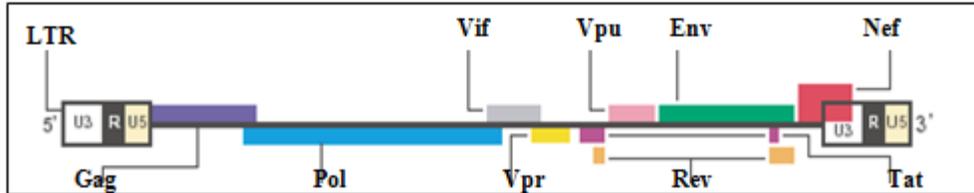


Figura 1.2. Estrutura genômica do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1). Os genes *gag*, *pol* e *env* (barras lilás, azul e verde respectivamente) codificam proteínas estruturais. Os genes *Tat* e *Rev* (barras roxas e laranjas respectivamente) codificam proteínas regulatórias. Os genes *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* (barras vermelhas, cinzas, amarelas, rosas e azul claras, respectivamente) codificam proteínas acessórias. Nas terminações 3' e 5', encontram-se as sequências repetitivas longas, chamadas de LTRs [21].

As partículas virais possuem duas cópias de RNA de polaridade positiva, sendo que os “*virions*” podem ser descritos como diplóides. Estas duas moléculas estão presentes dentro dos “*virions*” na forma de um dímero, formado por pareamento entre bases complementares. Dentro das partículas virais são encontrados ainda uma molécula de RNA transportador ($\text{tRNA}^{\text{lys-3}}$ no caso do HIV-1 e HIV-2) proveniente da célula hospedeira, que interage por complementaridade de bases a uma região do RNA viral conhecida como “*primer binding site*” (PBS) [22].

O genoma do HIV-1 contém nove genes diferentes, sendo três deles comuns a todos os retrovírus: “*gag*” (que codifica as proteínas estruturais), “*pol*” (que codifica as enzimas virais protease (PR), transcriptase reversa (RT) e integrase (IN), além de “*env*” (que codifica as glicoproteínas do envelope, gp120 e gp 41). Esses genes são considerados estruturais. Os genes *gag*, *pol* e *Env* são traduzidos em poliproteínas precursoras, que são posteriormente clivadas por proteases celulares e por uma protease viral [23], [8].

Diferentemente dos demais retrovírus, o genoma do HIV possui ainda os genes regulatórios, *Tat* e *rev*, além de quatro genes acessórios: *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*. Essa denominação de genes acessórios está baseada no fato de que as proteínas oriundas desses genes não são essenciais para a replicação do vírus *in vitro*, entretanto, desempenham importante papel *in vivo*, principalmente em relação a aspectos

relacionados à evasão e manipulação da resposta imunológica adaptativa e inata [24].

A diferença genômica entre o HIV-1 e o HIV-2 está na presença do gene *Vpx* no HIV-2. A proteína Vpr de HIV-2 compartilha a habilidade de induzir parada no ciclo celular em G2 com Vpr de HIV-1, mas *Vpx* de HIV-2 não possui efeito algum sobre o ciclo celular. Entretanto, *Vpx* é essencial em células que não estão se dividindo (*non-dividing cells*), como macrófagos e células dendríticas. Devido à origem evolucionária comum, alto grau de homologia e a divergência de funções, *Vpx* e Vpr de HIV-1 são considerados parálogos [25] [26] [27] [28]. Flanqueando as extremidades 3' e 5' do provírus, são encontradas longas sequências repetidas denominadas de LTRs (*long terminal repeats*), que regulam a integração do vírus ao genoma hospedeiro, a expressão gênica e a replicação (Figura 1.3) [29], [6].

O gene *Gag* é traduzido em uma poliproteína precursora de 55 kDa, denominada p55 Gag. Essa é clivada pela protease viral em quatro proteínas menores: p17, que forma a matriz; p24, que constitui o capsídeo; p7, que constitui o nucleocapsídeo; p6, que tem função de intermediar a incorporação da proteína Vpr aos “vírions”; e dois peptídeos espaçadores p1 e p2. Essas proteínas são encontradas nas partículas virais maduras do HIV-1 [30], [29].

O gene *pol* codifica uma poliproteína precursora das enzimas virais PR, RT e IN. A sequência do gene *pol* não possui um códon de iniciação. Assim, não pode ser traduzida de forma independente. As poliproteínas Pol e *Gag* são traduzidas de maneira fusionada, formando um precursor denominado Gag-Pol. A protease viral cliva o polipeptídeo Pol, separando-o de Gag, e, posteriormente, cliva Pol para gerar PR, RT e a IN. Porém, é somente no meio extracelular, após a liberação do vírus da célula hospedeira, que a protease viral sofre autoativação e inicia o processo de clivagem, tornando infecciosa a partícula viral. Todos os produtos do gene *pol* podem ser encontrados dentro das partículas virais do HIV-1 [29], [22], [8].

O gene *Env* codifica uma poliproteína precursora, que é sintetizada na forma de um trímero, com ligações não covalentes entre as subunidades gp120 e gp41 [23], [31].

O gene *Tat* codifica um transativador transcricional que é essencial à replicação do HIV-1. *Tat* é uma proteína originalmente descrita como um ativador do promotor LTR do HIV-1, tendo sido mostrada posteriormente sua capacidade de regular a transcrição

reversa, o que afeta a expressão de vários genes celulares e virais. *Tat* liga-se ao RNA, reconhece uma sequência em forma de *loop*, denominada elemento de resposta à transativação (*transactivation response element- TAR*), localizada na extremidade 5' de todos os RNA's mensageiros do HIV-1. Algumas proteínas celulares ligam-se à TAR, dentre elas uma quinase, que fosforila componentes do complexo da RNA polimerase II. Como resultado dessa ligação, há o aumento na taxa de produção de transcritos virais primários de pelo menos 1000 vezes [29], [23], [8].

O transcrito completo do HIV possui múltiplos sítios de processamento alternativo (*splicing*). O processamento alternativo dos RNA's mensageiros é requerido para expressão eficiente dos genes virais. As proteínas *Tat*, *Rev* e *Nef* são processadas na fase inicial da infecção e acumulam-se devido à ativação transcricional produzida por *Tat*. O acúmulo da proteína *Rev* é responsável pela mudança da fase inicial para a fase tardia do ciclo de replicação do HIV-1. *Rev* é uma proteína que se liga ao RNA e reconhece um elemento estrutural específico na região de *env*, denominado elemento de resposta à *Rev* (*Rev -Response Element- RRE*). Essa proteína ativa a exportação nuclear de transcritos não processados completos ou parcialmente processados, ou seja, que não sofreram processamento e contêm o elemento RRE. Dessa forma, *Rev* facilita a síntese das proteínas virais estruturais e garante a viabilidade do genoma completo de RNA do HIV-1. *Rev* também está envolvida no transporte dos transcritos de fase tardia dos genes *vpr*, *Vpu* e *Vif* para o citoplasma da célula hospedeira. No entanto, esses mRNAs só saem do núcleo após múltiplas cópias de *REV* ligarem-se nestes mRNAs [32], [29], [23], [22].

O gene *nef* (*negative factor*) originalmente recebeu esse nome devido à uma informação incorreta de que seria responsável por regular negativamente a transcrição dos vírus. No entanto, *nef* promove a persistência viral e leva a uma progressão mais rápida para a AIDS. *Nef* constitui-se numa proteína que interage com outras proteínas da célula hospedeira para facilitar sua resistência à ação do sistema imune e diretamente contribuir para a infectuosidade do vírus [33].

A proteína viral *U* ou *Vpu* é essencial à maturação e liberação das partículas virais. Da mesma forma que *Vif* e *Vpr*, *Vpu* tem como alvo para degradação proteínas celulares da célula hospedeira, utilizando como via as ubiquitinas ligases [34], [35], [36]. *Vpu* também forma canais iônicos em membranas celulares [37]. Através desses atributos, ele

antagoniza os fatores celulares capazes de restringir a liberação dos vírions nascentes das células infectadas. Um dado recente indica que um desses fatores de restrição celular é a proteína transmembrana BST-2/CD317 (*Tetherin*), que retêm vírions na superfície da célula [38], [39].

A proteína viral regulatória “R” ou VPR é incorporada à partícula viral pelo peptídeo p6 de Gag. *Vpr* foi caracterizada como um importante regulador de apoptose na célula infectada, existindo fortes evidências de que ela esteja envolvida na sobrevivência viral e progressão à AIDS. Entretanto, esta proteína desempenha outras funções vitais ao ciclo viral, tais como: (i) aumento da eficiência do processo de transcrição reversa; (ii) transativação do promotor do HIV-1 (*long-terminal repeat*, LTR); (iii) facilitação da importação do complexo de pré-integração viral (PIC); (iv) interrupção do ciclo celular no estágio G₂ e modulação da sinalização do receptor de célula T (TCR) (T-cell receptor). [40], [41].

A proteína viral *Vif*, fator de infectuosidade viral (*viral infective factor*), tem papel importante na infecção e na replicação do vírus em células não permissivas, sendo essencial para infecções *in vivo*. A principal função de *Vif* é neutralizar a atividade antiviral de membros da família de citidina deaminases celulares, APOBEC3B, APOBEC3F e APOBEC3G. Na ausência de *Vif*, APOBEC3G é empacotado nos vírions, resultando na deaminação de citidina em uracila durante a replicação viral, culminando na produção de provírus não funcionais [42], [43]. As duas últimas proteínas citadas serão analisadas de maneira mais detalhada a seguir. As funções desses genes estão resumidas na Tabela 1.1.

<i>Proteína</i>	<i>Função</i>
Gag	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Proteína do Capsídeo se liga ciclofilina “A”. ➤ Proteína Matriz (MA), por miristol auxilia <i>Gag</i> para <i>lipid raft</i> e importa (PIC) para fosforilação. ➤ Proteína associada ao RNA - auxilia no brotamento, interage com Vpr, PTAP-TGS101.
Transcriptase Reserva	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Responsável pela transcrição reversa, com função de DNA polimerase. RNA dependente, RNase H e DNA polimerase – DNA dependente.
Protease	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Realiza o processamento das poliproteínas precursoras virais.
Integrase	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Realiza a integração do DNA proviral.
Envelope (Env)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Clivada no retículo endoplasmático em gp120(SU) e gp41(TM). <ul style="list-style-type: none"> • gp120 se liga a CD4 e ao receptor da quimiocina (CCR5 e CXCR4). • Gp41 medeia fusão com a membrana citoplasmática. • Contém elementos responsivos ao RNA (RRE) que liga a Rev.
Ativador transcricional (Tat)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Liga-se a região de ativação transcricional (TAR). <ul style="list-style-type: none"> • Associa-se ao W da ciclina T1 e CDk9. • Aumenta a extensão da RNA Pol II.
Regulador da expressão viral (Rev)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Liga-se ao RRE. <ul style="list-style-type: none"> • Inibe o splicing do RNA viral. • Exporta RNA spliced incompleto do núcleo.
Fator de regulação negativa (Nef)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Modulação de CD4/MHC I. <ul style="list-style-type: none"> • Bloqueia apoptose. • Aumenta a <i>infeciosidade</i> viral. • Altera o estado da ativação celular. • Aumenta patogênese.
Fator de <i>infeciosidade</i> viral (Vif)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Supera os efeitos inibitórios da célula do hospedeiro. <ul style="list-style-type: none"> • Estabiliza o complexo RT. • Aumenta a <i>infeciosidade</i> viral. • Auxilia a síntese do DNA proviral e/ou empacotamento viral.
Proteína viral “R” (Vpr)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Retarda a fase G2. <ul style="list-style-type: none"> • Facilita a infecção de Macrófagos.
Proteína viral “U” (Vpu)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Promove a degradação de CD4. <ul style="list-style-type: none"> • Auxilia a liberação do vírus.
Proteína viral “X” (Vpx)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Auxilia na infecção

Tabela 1.1. Relação dos genes do HIV-1 e algumas de suas funções.

1.3.2. Classificação Filogenética

O HIV-1 é um típico membro do gênero *Lentivirus* da família *Retroviridae*. O nome é derivado do latim *Lente*, uma referência ao longo período de incubação nos hospedeiros e sua capacidade de persistir e replicar-se por muitos anos, antes de causar sinais clínicos da doença.

Os *Lentivirus* apresentam como características principais: (i) causar efeitos citopáticos; (ii) provocar deficiências imunológicas, desordens hepáticas e nervosas; (iii) deixar o indivíduo suscetível a doenças autoimunes. Apresentam ainda contínua mutação viral e capacidade de integração de uma cópia do DNA viral no DNA do hospedeiro. O vírus passa a ser denominado provírus, após seu genoma ser integrado no genoma da célula hospedeira [44]. Trata-se de um vírus constituído de RNA fita simples, e por ser um retrovírus, utiliza a enzima transcriptase reversa para a transcrição do RNA em DNA. Além de possuir características gerais dos retrovírus, como a presença dos genes estruturais, *gag*, *pol* e *env*, os *Lentivirus* codificam proteínas acessórias (Nef, Vif, Vpr e Vpu) e regulatórias (*Tat* e *Rev*) da replicação viral. A descoberta do HIV estimulou a caracterização de vários outros *Lentivirus*, como aqueles isolados de primatas não humanos, SIV (“*simian immunodeficiency virus*”) [45], [23], [8].

A análise de diversas sequências isoladas do HIV-1 permitiu a distinção de três grandes grupos: M (*major*), O (*outlier*) e N (non M, non O) [8] [45]. Acredita-se que cada grupo seria resultado de um evento de transferência independente, de lentivirus de primatas não humanos para humanos. No caso do HIV-1, teria ocorrido a transferência do vírus SIV_{cpz} (chimpanzé) para seres humanos e oito linhagens de HIV-2 surgiram a partir da infecção por SIV_{sm} (*sooty mangabeys*). O grupo M do HIV-1 tem a maior prevalência entre os casos de AIDS no mundo, principalmente o subtipo B, o de maior prevalência também no Brasil (Morgado *et al.*, 1998). O grupo *major* (M) pode ser subdividido em subtipos A, B, C, D, E, F, G, H, J e K e suas formas recombinantes CRFs (*circulating recombinant forms*) [8]

1.3.3. Estrutura

O *vírião* ou partícula viral possui um diâmetro que varia entre 80nm - 110 nm, um genoma de aproximadamente 9,8 kb e um envelope, oriundo da célula hospedeira. As glicoproteínas virais são derivadas de um precursor gp160, que é clivado por proteases celulares, produzindo as glicoproteínas gp120 de superfície (SU) e gp41, a glicoproteína transmembrana (TM). Na superfície do *vírião*, é possível detectar a presença de *spikes*, trímeros de gp41-gp120, em uma média de 14 por *vírião*. No interior do envelope, encontra-se outro envoltório, a matriz, que é constituída pela proteína p17. O capsídeo, que possui formato cônico é formado pela proteína p24, e no interior dele encontram-se as duas cópias do genoma de RNA fita simples, com polaridade positiva, formando o nucleocapsídeo. As enzimas virais transcriptase reversa (RT), integrase (IN) e protease (PR) também são encontradas dentro da partícula viral. Pode ocorrer ainda a presença de proteínas oriundas da célula hospedeira, como o MHC-II (MHC de classe 2) associado ao envelope e à ciclofilina A associada ao capsídeo (Figura 1.3) [22], [29].

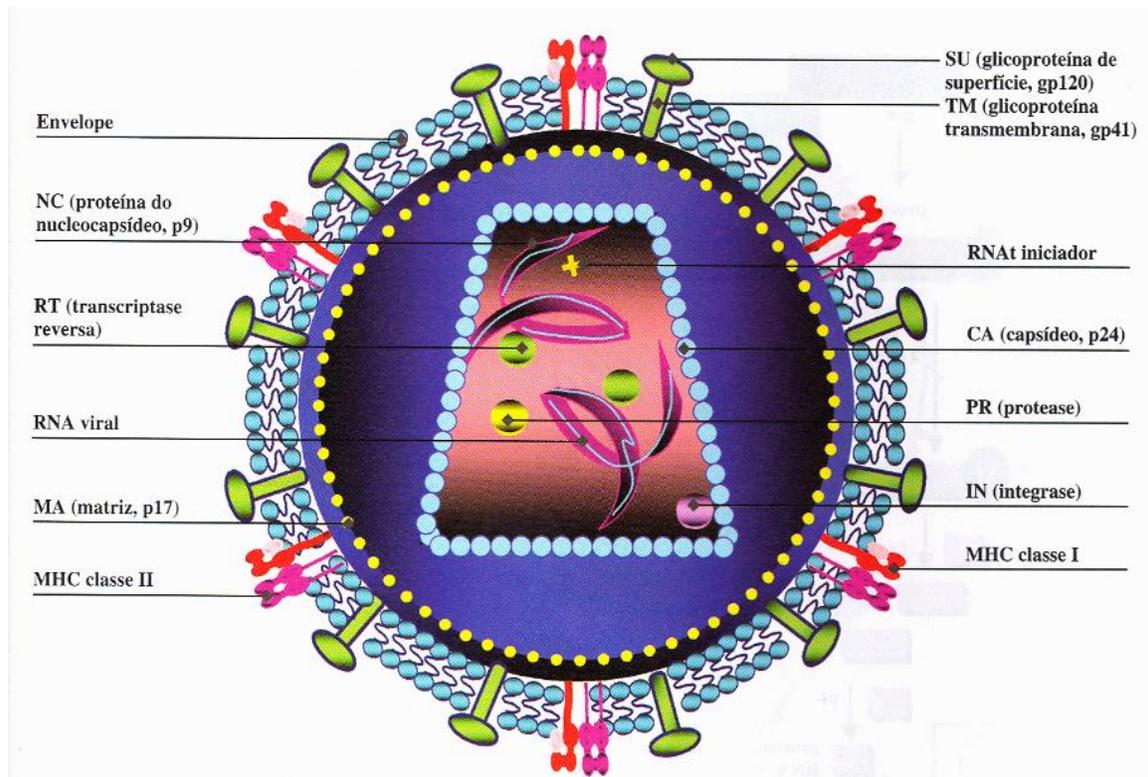


Figura 1.3. Estrutura da partícula viral do HIV-1. O HIV-1 é envolto por um envelope de natureza lipoprotéica. Em sua face interna, localiza-se a matriz, e na porção central da partícula viral, encontra-se o capsídeo com formato cônico. O genoma viral é constituído por duas fitas de RNA estabilizadas pelas proteínas do nucleocapsídeo. No interior do capsídeo, encontram-se as enzimas Protease (PR), Transcriptase Reversa (RT), Integrase (IN) e as proteínas (Nef, Vif e Vpr) [6].

1.4. Ciclo de vida do HIV – “Uma extraordinária viagem pela célula”

Da mesma maneira que outros vírus, o HIV replica-se dentro da célula do hospedeiro para garantir sua permanência no mesmo. Para que isso ocorra, precisa passar por um longo caminho desde sua entrada até o núcleo da célula alvo, onde integrará seu material genético (Figura 1.4).

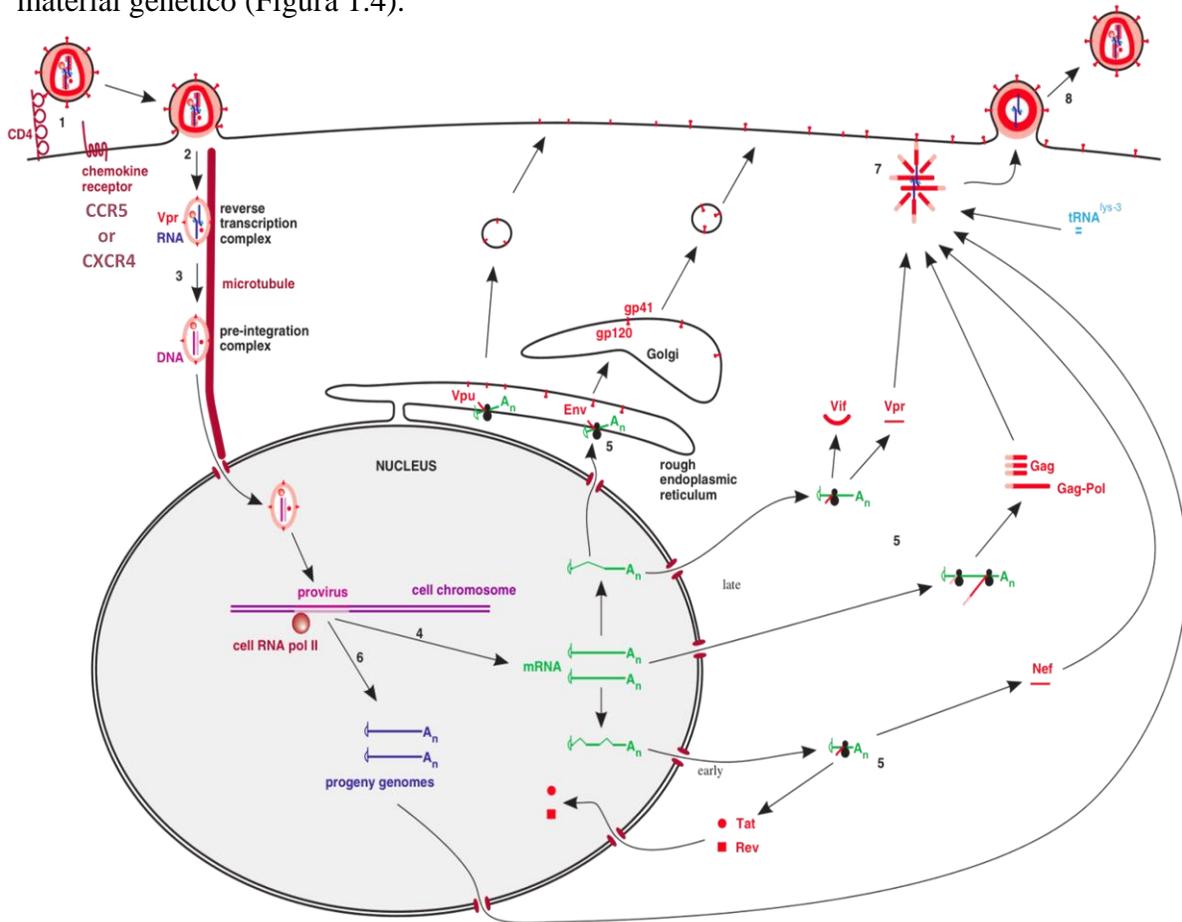


Figura 1.4. Ciclo de replicação do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1) [46].

1-Ancoramento

2-Entrada

3-Transcrição reversa

3.1-Integração

4-transcrição

5-Tradução

6-Replicação do genoma viral

7-Montagem da partícula viral

8-Saída

A infecção da célula hospedeira inicia-se pelo reconhecimento do receptor CD4 pela glicoproteína de superfície do vírus, gp120. Em seguida, como consequência de mudanças conformacionais induzidas pela ligação CD4-gp120, outra glicoproteína também presente na superfície viral, a gp41, reconhece um correceptor, um dos receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4, e esse processo resulta na fusão de ambas as membranas [47]. A fusão permite que o capsídeo viral alcance o citoplasma. A maioria das linhagens do HIV-1 usa CCR5 como correceptor, sendo conhecidos como vírus R5. Infectam preferencialmente macrófagos e não induzem a formação de sincícios. As linhagens de vírus que usam o co-receptor CXCR4 são conhecidas como vírus X4 e infectam principalmente linfócitos, induzindo a formação de sincícios. O receptor de quimiocina CCR5 encontra-se na superfície das principais células alvo, como LT CD4⁺, macrófagos e células dendríticas e o co-receptor CXCR4 é encontrado em linfócitos [48], [46]. Em metade das infecções causadas pelo vírus do subtipo B, o surgimento do co-receptor CXCR4 está associado à progressão da doença [49].

Uma vez dentro da célula, o vírus abre o capsídeo, por um processo pouco entendido, mas que provavelmente envolve proteínas celulares e virais, como a ciclofilina “A” [50], Nef e *Vif* [51], [52]. Logo depois, forma-se um complexo, que recebe o nome de complexo de pré-integração (PIC), o qual compreende as moléculas de RNA viral, molécula de tRNA^{Lys-3} e as proteínas virais: transcriptase reversa, integrase, matriz, nucleocapsídeo, Vpr, *Vif* e duas proteínas do hospedeiro, HMGI (Y) e a barreira de autointegração (BAF), que se ligam ao DNA viral e auxiliam na sua integração [53], [54]. A RT viral é a responsável pela síntese do DNA dupla fita do vírus.

O PIC se move em direção ao núcleo usando a rede de microtúbulos da célula. Neste processo, a interação de Nef com a proteína celular Vav (um fator de intercâmbio de guanina ou GEF (*guanine nucleotide exchange factor*)) desencadearia uma série de funções efetoras, culminando com o reordenamento do citoesqueleto e consequentemente facilitando a migração do PIC para o núcleo [55], [56]. Uma vez na vizinhança do núcleo, o PIC deve enfrentar outro obstáculo, atravessar um poro nuclear significante menor que o seu tamanho. Neste processo, algumas proteínas virais teriam um papel chave, como a

proteína viral MA (matriz), que está envolvida neste fenômeno, caracterizando assim um sinal de localização nuclear (NLS), que é reconhecido pelas importinas a e b, as quais fazem parte da via clássica de importação de proteínas para o núcleo.

Após passar por todos esses obstáculos, o DNA proviral se integra em diferentes locais no genoma do hospedeiro, podendo levar a um estado de latência ou de replicação, dependendo do local e da disponibilidade de fatores transcripcionais. A integração eficaz do DNA viral dentro do cromossomo, em regiões próximas a genes ativos após a infecção pelo HIV, é mediada pelos integrantes do PIC, citados anteriormente (proteína viral IN e duas proteínas celulares identificadas, como HMGI(Y) e a barreira da autointegração (BAF) [57]. Os provírus da maioria retrovírus são constituídos por uma dupla fita de DNA. Mas o HIV e outros lentivírus possuem uma estrutura conhecida como *DNA flap*, que consiste na formação de um domínio triplo-helicoidal no DNA durante o processo de transcrição reversa e foi descrito como um importante fator na migração do PIC, com papel vital nos estágios iniciais de infecção [58] [22].

A transcrição do DNA viral é dirigida pelo 5' LTR (*long terminal repeat*), o qual possui sequências promotoras e sítios de ligação a fatores de transcrição, incluindo AP-1 e Sp-1. *Upstream* a essas sequências são encontrados sítios para a ligação de outros fatores como NF- κ B e NFAT. Uma transcrição eficiente é promovida após a ligação da proteína viral *Tat* com uma sequência localizada em LTR, que recebe o nome de *TAR* (*Tat Activating Region*). Essa, por sua vez, possui um sítio de interação com a ciclina T. *Tat* também se liga a ciclina T, e então a proteína quinase Cdk9 é recrutada e interage com a ciclina T. Essa interação ativa Cdk9, que hiperfosforila o domínio C-terminal da RNA polimerase II, aumentando a elongação dos transcritos virais do HIV-1. Outras proteínas celulares participam do processo de ativação da transcrição por *Tat* [59].

As funções das proteínas virais *Tat* e *Rev* estão relacionadas à transcrição viral. *Tat* liga-se aos transcritos nascentes e garante que todo o genoma do vírus seja transcrito. *Rev* liga-se ao RNA viral que sofreu "*splicing*" incompleto e ao RNA que não sofreu "*splicing*" e auxilia seu transporte para o citoplasma, enquanto as proteínas virais tardias são traduzidas. *Rev* é reciclado para ser utilizado novamente no núcleo [22]. A transcrição do genoma viral gera vários transcritos primários, alguns como os codificantes para *Tat*, *Nef* e *Rev*, os quais são processados na ausência de sequências

inibitórias de RNA de “*splicing*” e são transportados para o citoplasma [60]. Outros são processados de forma incompleta ou não são processados, devido à carência de sítios de “*splicing*” nos transcritos, e a efeitos inibitórios da proteína viral *Rev*, que interage com alguns fatores celulares [61]. Estes transcritos codificam algumas proteínas estruturais e proporcionam o genoma viral necessário para ser empacotado dentro do capsídeo. Dessa forma, o equilíbrio entre estes dois mecanismos, “*splicing*” total e parcial, é requerido para a propagação da infecção.

Alguns genes virais apresentam expressão na fase tardia de replicação do vírus, como *Gag* e a poliproteína *Gag-Pol*, traduzidos a partir de transcritos que não sofreram “*splicing*”. As demais proteínas virais (*Vif*, *Vpr*, *Vpu* e *Env*) são traduzidas com base em transcritos que sofreram processo de *splicing* de maneira independente. *Env* e *Vpu* são traduzidos no retículo endoplasmático rugoso.

Os vírions são montados no citoplasma da célula hospedeira e têm como principais componentes as proteínas virais *Nef*, *Vpr*, *Vif*, *TR* e *IN*, além de um dímero de RNA. Moléculas de *Gag* e *Gag-Pol* formam um arranjo ordenado, e seus domínios ligam-se ao genoma do vírus e em proteínas que serão incorporadas aos vírions “nascentes”. Os domínios básicos do NC ligam-se ao genoma viral, inicialmente em um domínio conhecido como ψ , que é essencial no sinal de “empacotamento”. Os domínios do CA ligam-se a proteína da célula hospedeira ciclofilina A, enquanto a região p6 de *Gag* liga-se a proteína viral *Vpr*. Moléculas da proteína *Vif* são também incorporadas nos vírions. *Vif* tem um papel muito importante na degradação das citidinas deaminases APOBEC3G e APOBEC3F, que poderiam interferir negativamente na replicação do vírus na próxima célula hospedeira. Após a formação do dímero *Gag-Pol*, a protease sofre um processo autocatalítico de clivagem para a formação das enzimas virais PR, RT e a IN. Em seguida, a protease cliva as poliproteínas de *Gag* nos constituintes dos vírions maduros. Após o recrutamento de proteínas celulares, relacionadas com a formação dos corpos multivesiculares (MVBs), a particular viral utiliza a via de exocitose para formar vesículas intraluminais [62], o que culmina no brotamento das partículas virais englobadas em uma porção da membrana plasmática da célula.

1.5. Patogênese da AIDS

1.5.1. A depleção de LT Auxiliares

Logo após a descoberta da AIDS em 1981, ficou evidente que o número de LT-CD4⁺ decrescia à medida que a infecção progredia [1]. Entretanto, quase 30 anos depois e apesar dos enormes esforços realizados pela comunidade científica, os motivos para tal depleção e o porquê do HIV evoluir para a síndrome continuam sendo motivos das mais diversas especulações e hipóteses.

Dentre as diferentes linhas de raciocínio, pode-se citar as que se baseiam no mecanismo patogênico direto, onde a perda dos LT-CD4⁺ ocorreria devido à lise ocasionada pela infecção viral, hipótese esta que encontra suporte na relação direta no grau de depleção de LT-CD4⁺ [63].

Uma hipótese bastante aceita sugere que a depleção de LT-CD4 obedeceria a uma resposta exagerada e descontrolada do sistema imune, a qual levaria a total exaustão do sistema imunitário. Essa linha de raciocínio baseia-se em evidências relacionadas à prematura destruição da população de linfócitos nas placas de Peyer a que seria responsável pela passagem de diversos peptídeos que ocasionam em última instância uma permanente ativação policlonal específica do sistema imune [64]. Outra forte evidência a favor deste mecanismo está relacionada à incapacidade da proteína viral *Nef* das cepas presentes no HIV-1 de degradar a molécula CD3 da superfície de linfócitos CD4⁺, correceptor este crítico na ativação linfocitária, diferentemente do verificado com as variantes de *Nef* presentes em vírus simianos que não ocasionam doença em seus hospedeiros naturais [65]. Por outro lado, tendo por base evidências que tanto as células infectadas como as não infectadas são depletadas durante a infecção, mecanismos apoptóticos direcionados por proteína virais, como Vpr, Vif e Nef, também foram envolvidos na patogênese da doença [66].

Neste cenário, diversas evidências obtidas nos últimos anos ajudaram a melhorar o entendimento dos possíveis mecanismos que levam à depleção do sistema imune. Assim, Douek e colaboradores [67], demonstraram que os LT-CD4⁺ específicos para o HIV-1, são preferencialmente infectados, demonstrado pelo allzgo de uma maior frequência de DNA proviral integrado em LT-CD4⁺ de memórias específicas para

epítomos do vírus, que o presente em linfócitos de memória com outras especificidades. Este estudo proporciona uma possível explicação para a perda de LT-CD4⁺ HIV específico e conseqüentemente para a perda do controle da infecção [67].

Embora exista ampla evidência em favor da capacidade do HIV em estimular e manter uma resposta imune, torna-se cada vez mais claro que os aspectos pró-inflamatórios desta resposta podem ser prejudiciais.

Assim, muito provavelmente, a crescente ativação contribui diretamente para depleção das células CD4⁺, talvez como uma consequência da exaustão e acelerado “envelhecimento” do sistema imune [68] e[69]. Curiosamente, Emu e colaboradores (2005), sugerem que o controle virológico está associado à preservação da produção de duas citocinas, IFN- γ e IL-2, produzidas por LT-HIV específico, mas incompletamente diferenciados e com baixos níveis de proliferação. Esse estado imunológico pode ser definido, como um estágio em que o sistema imune mantém a capacidade de responder ao HIV se expandindo, pela ação da IL-2, mas não chegando a se exaurir, ou seja, se manteria num estágio relativamente quiescente. Esses dados trazem um novo paradigma na regulação da resposta imune, onde a produção de IL-2 pode ser benéfica, já que diminuiria os níveis de reposição dos “LT naive”. Este novo modelo encontra sustentação no trabalho de Sereti e colaboradores [70], onde, a administração da IL-2 levou a um aumento no número de células T foxP3⁺, o que poderia exercer uma leve supressão da ativação policlonal de “LT naive”[71].

Em resumo, o controle da viremia na fase crônica requer manutenção duradoura de LT de memória, mas em ausência de ativação generalizada.

1.5.2. Diminuição da expressão do receptor viral CD4 e sua relevância na patogênese da infecção pelo HIV-1

O HIV-1 se liga ao receptor CD4 presente na superfície de linfócitos e macrófagos através da glicoproteína gp120 presente no envelope do HIV-1. Após a interação com CD4 a gp120 sofre mudanças conformacionais que culminam na fusão das membranas virais e celulares [72], [73]. Momentos após o evento de entrada viral, vários processos são iniciados com o objetivo de assegurar a integração do genoma pró-viral e conseqüente produção de partículas virais infecciosas. Dentro deste contexto a

diminuição da expressão do receptor viral CD4 é um dos mais importantes eventos durante a infecção pelo HIV-1, sendo conservada tanto no HIV-1, HIV-2, como no SIV[74], [75].

Dentre os nove genes virais, três deles: *nef*, *Env* e *Vpu* participam deste processo, demonstrando que a modulação do receptor viral da superfície celular possui papel crítico no ciclo de replicação destes retrovírus. De fato, níveis de CD4 levemente superiores aos observados nos linfócitos primários podem vir a saturar a maquinaria viral [76]. Destas três proteínas, *Nef* é a única empacotada no *vírion* e expressa logo após a infecção, sendo seus transcritos os mais abundantes nesta fase, desempenhando o papel mais relevante na modulação de CD4[77], [78]. Assim, seu efeito pode ser detectado entre 12 a 16 horas após a infecção [76], porém a contribuição de *Env* e *Vpu* na modulação de CD4 é detectada apenas em estágios tardios da infecção [79].

Os efeitos de *Nef* (produto precoce) e *Vpu/Env* (produtos tardio) são quantitativa e qualitativamente distintos [78]. A modulação de CD4 (Figura 1.5) acontece em três diferentes níveis e localizações: na membrana plasmática, no retículo endoplasmático (ER) e em menor grau no aparelho de Golgi. Na membrana, *Nef* age como conector ligando o domínio citoplasmático do receptor viral CD4 ao complexo heterotetramérico adaptador de clatrina, AP-2 [80]. Essa interação leva à formação de vesículas endocíticas, que são direcionadas para o endossoma [81], [82] e posteriormente para degradação lisossômica via interação com a proteína β -COP [83]. Também foi proposto que *Nef* direcionaria as moléculas de CD4 presentes no trans-Golgi para os endossomas precoces e tardios por meio de interações com as subunidades *mu* (μ) dos complexos AP-1 e AP-3, contribuindo assim com a degradação de proteínas recém sintetizadas [82], [84] e [85].

As outras duas proteínas virais, *Vpu* e *Env*, agem no RE bloqueando o transporte das moléculas recém- sintetizadas. Assim, e devido à sua alta afinidade, a gp160 liga-se fortemente à molécula CD4 proporcionando a formação de agregados que bloqueiam o transporte do receptor viral para a superfície celular[86], [87].

Posteriormente, *Vpu* que é uma proteína viral muito conservada entre os diversos isolados virais, mas ausente em HIV-2 e na maioria dos vírus da imunodeficiência simiana (SIV) [88] age de forma similar a *Nef*, como conector entre o domínio citoplasmático de CD4 e a proteína β TrCP, membro do complexo proteico de ubiquitinação, Skp1p-CDc53-F-boxE3, que direciona o CD4 para a degradação proteossômica [34].

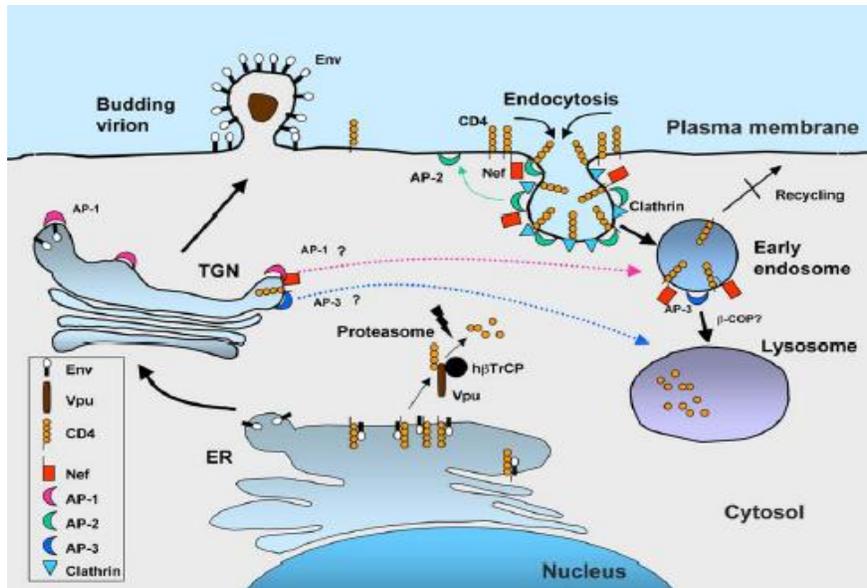


Figura 1.5. Mecanismos envolvidos na diminuição da expressão de CD4 da superfície da célula infectada pelo HIV-1. A modulação de CD4 ocorre em diferentes locais da célula infectada e envolve as proteínas virais *Nef*, *Vpu* e *Env*. *Nef* age como um conector na superfície da célula ligando o domínio citoplasmático de CD4 com o complexo proteico adaptador da clatrina AP-2, induzindo a formação de vesículas endocíticas, que posteriormente por recrutamento da proteína β -Cop, são direcionadas ao lisossoma para degradação. Já as proteínas *Vpu* e *Env* redirecionam as moléculas CD4 recém-sintetizadas presentes no RE, para degradação proteossômica [79].

Existem diversas hipóteses relacionadas a relevância fisiológica deste fenômeno na patogênese da AIDS, dentre as mais aceitas podem-se citar: a) evitar a ligação cruzada da molécula CD4 na superfície de células infectadas, para evitar a transdução de sinais inibitórios, os quais podem inibir a transcrição do DNA viral a partir do “*Long Terminal repeat*” (LTR); b) inibir a indução de apoptose e efeitos citopáticos, antes que a liberação viral aconteça [89],[90],[91]; c) impedir a superinfecção, o que poderia pôr em perigo a produção viral [92]; d) favorecer a liberação de partículas virais [93],[94] e finalmente, evitar a diminuição da infectuosidade das partículas virais liberadas [95], [76], [79]. Porém, vale ressaltar que estas hipóteses não são excludentes podendo ocorrer concomitantemente, aumentando a eficiência do processo infeccioso.

Os primeiros trabalhos mostrando os efeitos inibitórios da expressão de CD4 na replicação viral foram de Marshall *et al* (1992)[96]. Posteriormente, trabalhos de Lama *et al* (1999), mostraram que a superexpressão do receptor viral CD4 levava a diminuição da infectuosidade e liberação das partículas virais e que as proteínas *Nef* e *Vpu* por meio da participação na diminuição da expressão do receptor da superfície viral, eram capazes de impedir os efeitos inibitórios mediados por CD4[95]. Por outro lado, a eliminação dos efeitos inibitórios mediante o uso de partículas virais pseudotipadas, com as glicoproteínas dos vírus da estomatite vesicular (VSVg) ou com a do vírus da leucemia viral murina (MLV), mostraram claramente que este fenômeno requeria a interação da molécula CD4 e a glicoproteína de superfície viral, a gp120. Entretanto, estes estudos foram realizados em células 293T previamente transfectadas com vetores expressando a molécula CD4, o que pode levar a maior expressão da que é observada nas células infectadas naturalmente, já que estas células não expressam a proteína de transmembrana Lck, a qual se associa a CD4 na superfície viral. Com o objetivo de abordar estas questões, Cortes *et al* (2002) realizaram os mesmos estudos de inibição em linhagem de células Jurkat, que expressam Lck, com altos e baixos níveis de expressão de CD4. Desta forma, foi possível observar a diminuição da infectuosidade entre 75-85%, ainda em células com baixos níveis de CD4, o que mostrava que pequenas quantidades de CD4 eram prejudiciais para a infectuosidade viral. Já em células expressando altos níveis de CD4 os níveis de inibição atingiram 95%[76].

Estes estudos em conjunto mostraram claramente que a inibição da infectuosidade podia acontecer em condições fisiológicas de expressão de CD4 e bem abaixo dos níveis de expressão requerida para inibir a liberação de partículas virais. A independência entre estes dois fenômenos foi demonstrada pelo mapeamento de domínios diferentes na molécula CD4, para a verificação de ambos os fenômenos [94].

Evidências proporcionadas pelos trabalhos de Cortes *et al*[76] e posteriormente pelos de Argañaraz *et al*[79], onde foram detectados níveis de incorporação da molécula CD4 na superfície das partículas virais, levaram a sugerir inativação funcional da gp120 como consequência da coexpressão de ambas as proteínas na superfície do vírus.

1.6. Estrutura de Nef e interação com as proteínas celulares

1.6.1. A proteína acessória Nef.

Nef é uma proteína não enzimática miristoilada que possui entre 27 e 34 kDa, expressa exclusivamente no vírus da imunodeficiência humana (HIV - 1 e 2) e no vírus da imunodeficiência simiana (SIV). Esta proteína possui, em sua estrutura terciária, domínios específicos de ligação para diferentes proteínas celulares (Figura 1.6).

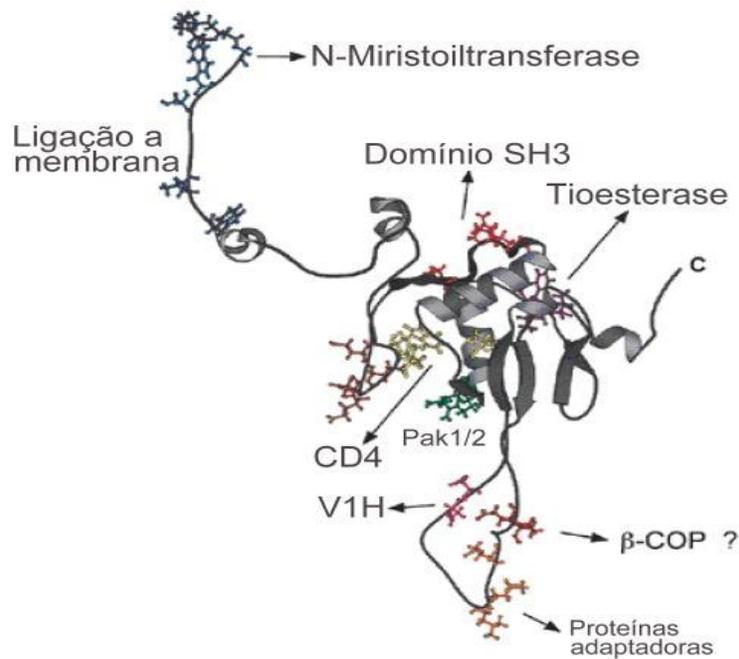


Figura 1.6. Localização de motivos funcionais na estrutura da proteína Nef do HIV-1. Representação dos motivos funcionais de Nef para interação com fatores celulares como: Tioesterase, CD4, V1H, proteínas adaptadoras de clatrina, PAK 1, PAK 2, Vav (SH3), Lck (SH3), Hck (SH3) e possivelmente β -Cop. A região N-terminal da proteína é a região de ancoramento à membrana, devido principalmente à ação da N-miristoiltransferase [97].

A região N-terminal desta proteína, de aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos, apresenta grande diversidade genética e flexibilidade estrutural, sendo responsável por sua ancoragem à membrana. Essa região é seguida de um domínio C-terminal (domínio central), de aproximadamente 130 aminoácidos, é bastante conservada e caracterizada pela presença de estrutura terciária estável. Entre esses dois domínios existe um sítio de clivagem para protease viral e uma região enrolada de aproximadamente 30 resíduos aminoácidos projetada para fora do domínio central. Precisamente, o sítio de clivagem *pelab* protease do HIV 1 se encontra entre os resíduos

dos aminoácidos W57 e L58. Estes aminoácidos são altamente conservados, principalmente o triptofano 57. *Nef* ainda possui um domínio SH3 que está envolvido na interação com proteínas de sinalização intracelular como, por exemplo, *Hck*, *Vav* e *Lck*, sendo que estas interações são fundamentais para a ativação celular mediada por *Nef* [98], [55] e conseqüentemente para a replicação viral. *Nef* é modificada após a tradução por fosforilação, além da miristoilação, na porção N-terminal [99], [100], [101]. Também apresenta em sua estrutura região onde se liga a cinase p21 ativada (PAK) 1 e 2, tioesterase, CD4, uma ATPase vacuolar V1H (NBP1), proteínas adaptadoras de clatrina (AP) e uma região possivelmente de interação com β -Cop [97] (Figura 1.6).

A N-miristoilação de *Nef* é necessária para sua associação com a membrana celular, característica esta crítica para todas as funções biológicas da proteína, tais como: modulação de CD4, modulação de MHC I, infectuosidade e ativação de PAK [97].

A fosforilação possivelmente está envolvida na interação entre o grupo mirístico e os seis primeiros resíduos do N-terminal de *Nef*. A introdução de carga negativa dentro da região de ancoragem pode bloquear a estável associação com a membrana devido a repulsão desencadeada pela carga negativa da região polar dos fosfolipídeos presentes na membrana [99].

Na figura 1.8 se encontram detalhadas as sequências de aminoácidos de três alelos de *Nef* das cepas NL43 e NA7 presentes em primatas humanos e Mac239, presentes em primatas não humanos, com os diferentes domínios de ligação as proteínas celulares.

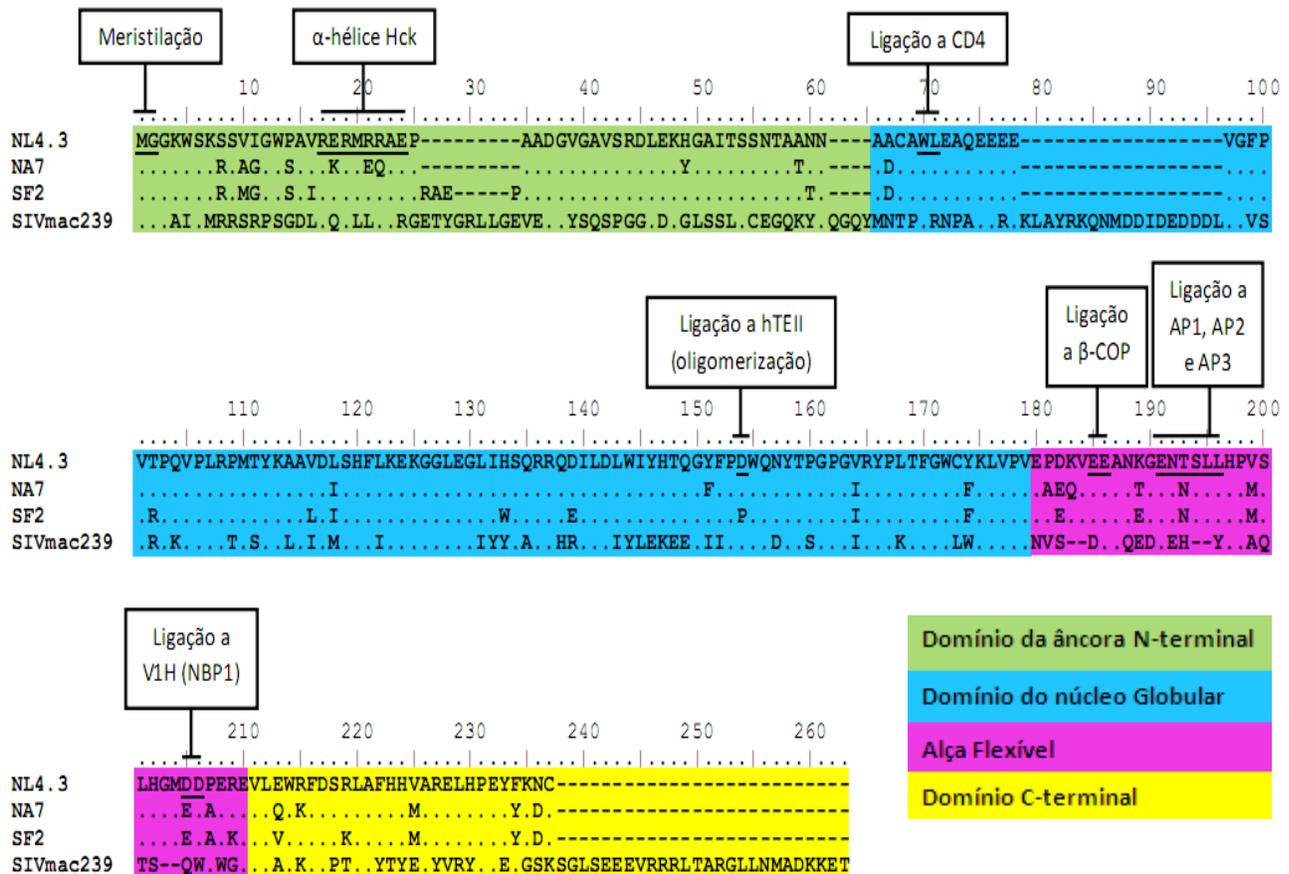


Figura 1.7. Alinhamento de diferentes alelos da proteína Nef do HIV-1 e localização de seus motivos funcionais. Representação dos motivos funcionais de Nef, em diferentes alelos, para interação com fatores celulares como: Tioesterase, CD4, V1H, proteínas adaptadoras de clatrina, Hck (SH3) e β-Cop. A região N-terminal da proteína é a região de ancoragem à membrana, devido principalmente a ação da N-miristoiltrasferas.

Além de ser um dos fatores de virulência e patogenicidade mais importantes, as diversas funções desta proteína ainda são pouco compreendidas. A importância biológica de *Nef* para a replicação viral e desenvolvimento da doença foi demonstrada, “in vivo”, em macacos infectados com SIV [102] e confirmada através da observação da falta de progressão à doença em pacientes infectados por vírus apresentando mutação ou deleção total de Nef [64], [103]. “In vitro”, a falta desta proteína leva à diminuição da replicação e infectuosidade viral [104] e [81]. Mesmo sendo pouco conhecidos os efeitos de *Nef* “in vivo”, sabe-se que “in vitro” *Nef* está envolvida no aumento da replicação e da infectuosidade viral em células primárias, na alteração do estado de ativação de células T, na interferência das vias de transdução de sinais de macrófagos e na indução da

modulação de moléculas de superfície celular tais como: CD4, MHC I, MHC-II, CXCR4 e CD28 [105], [106], [107], [108] e [109]

1.6.2. Os parceiros celulares de Nef na degradação de CD4

O mecanismo de ação de *Nef* tem sido estudado extensivamente e, até o momento, acredita-se que *Nef* atue na superfície celular como um conector da cauda citoplasmática da molécula CD4 com a proteína clatrina AP-2, pertencente ao complexo adaptador heterotetramérico [83, 110]. Essa conexão possibilita a formação de vesículas endocíticas contendo o receptor CD4 [85, 111]. Por outro lado, outras duas proteínas foram envolvidas na estabilização da ligação entre *Nef* e *Ap2*. Uma subunidade da bomba de prótons vacuolar (V-ATPase) ou (NBP-1) e a proteína Epsn15 um membro do sistema endocítico-interactosomo, aumentando a força de ligação de *Nef* a subunidade μ 2 de AP-2 [112-113] (Tabela 1.2).

Com a finalidade de evitar a reciclagem de CD4 para a superfície celular, uma segunda conexão entre CD4 e a maquinaria de tráfego celular é estabelecida por *Nef*, o que permite direcionar o receptor para degradação lisossômica. Foi proposto que nesse último passo *Nef* interagiria com Ap1, Ap3 e β -COP, uma subunidade da proteína de revestimento COP-1, o principal componente das vesículas não revestidas por clatrina [83, 114]. Adicionalmente, uma tioesterase humana *hTE-II*, que hidrolisa ligações tioéster de acil-CoA *in vitro*, também foi envolvida na degradação de CD4 por *Nef* com o alelo NL4. [115-116]. A habilidade de algumas mutantes de *Nef* em modular negativamente CD4 foi correlacionada com a capacidade das mesmas de se ligar a *hTE-II* [115, 117], entretanto, seu papel fisiológico ainda é desconhecido. Finalmente, a proteína dynamin2 (Dyn2), outra proteína também reguladora do tráfego vesicular, mostrou ligar-se a *Nef* e aumentar infectuosidade e degradação de CD4 [118] (Tabela 1).

Proteína Celular (domínio)	Métodos de Detecção	Domínio de Nef	Ref
CD4 (cauda citoplasmático)	<i>NMR, Yeast 2-hybrid, Co-IP, Fluorescence spectroscopy, BRET</i>	WL ₅₈	[119], [120], [121], [122], [123], [124], [125], [126]
AP-1 (hemicomplex)	<i>Yeast 2-hybrid, Yeast 3-hybrid, GST pulldown, Co-IP</i>	EXXXLL ₁₆₅	[112], [127], [128], [129], [97], [130], [131], [132], [133], [134]
AP-2 (hemicomplex)	<i>GST pulldown, Co-IP</i>	EXXXLL ₁₆₅	[135], [100], [130]
AP-3 (hemicomplex)	<i>Yeast 2-hybrid, Yeast 3-hybrid, GST pulldown, Co-IP</i>	EXXXLL ₁₆₅	[127], [128], [130], [131], [132], [133], [134]
β-COP (C-terminal)	<i>Yeast 2-hybrid, GST pulldown, Co-IP</i>	EE ₁₅₅	[136], [137], [138], [83]
V1H (aa 133-363 e 402-283)	<i>GST pulldown, Co-IP</i>	EXXXLL ₁₆₅ e DD ₁₇₅	[97]
hTEII (C-terminal)	<i>Yeast 2-hybrid, GST pulldown, Co-IP</i>	D ₁₂₃	[115]
Hck (α-hélice)	<i>Yeast 2-hybrid, GST pulldown, Co-IP</i>	RERMRAE ₂₄	[55, 98, 124, 139-141]

Tabela 1.2. Descrição das interações entre Nef e proteínas celulares. São descritas as proteínas celulares parceiras da proteína Nef do HIV-1 e as sequências de aminoácidos correspondentes aos domínios de ligação presentes em Nef.

Recentemente, foi descrito que a ubiquitinação de *Nef*, fenômeno conservado em todas as linhagens de HIV e SIV, seria crítica na degradação de CD4 [142]. Nesse estudo, a deleção dos resíduos de lisina tornou a proteína viral incapaz de modular CD4, e o aminoácido K144 mostrou ser necessário e suficiente para que modulação de CD4 ocorra, mesmo com a ausência de outros resíduos. É importante ressaltar que esse sítio e as sequências vizinhas a ele (FK144LVP) são conservadas entre as sequências de HIV-1 e SIVcpz. O mesmo estudo sugere que a ubiquitinação de *Nef* é necessária para a distribuição do complexo CD4-NEF AP-2 nas vias endocíticas intracelulares.

Até o momento nenhuma atividade catalítica foi atribuída à proteína *Nef*, corroborando a hipótese de que as funções desta proteína viral são mediadas por interações específicas com seus parceiros celulares, interações estas que foram comumente caracterizadas em ensaios de “duplo híbrido” (two-hybrid-system), realizados em leveduras, e posteriormente validados com experimentos de imunoprecipitação e colocalização em células de mamífero. Devido à dificuldade em

neutralizar a expressão endógena destes genes, a relevância fisiológica destas interações não foi confirmada. Experimentos realizados para avaliar o papel destes parceiros celulares de *Nef* usualmente foram realizados como auxílio de versões negativas das diferentes proteínas celulares [143]. Evidências adicionais têm sido obtidas correlacionando os efeitos das mutantes dos parceiros celulares com a habilidade de *Nef* de modular a expressão de CD4. Entretanto, nenhum destes estudos tem apresentado evidências conclusivas com relação ao envolvimento destas proteínas celulares na diminuição de CD4 mediada por *Nef*, uma vez que as estratégias experimentais se basearam somente na superexpressão de proteínas mutantes, o que pode levar a resultados confusos. Por outro lado, nos trabalhos descritos anteriormente o papel das diferentes proteínas celulares não foram avaliados na presença dos diferentes alelos de *Nef*, fator este de extrema importância, levando em consideração a grande diversidade de sequências apresentada pelas diferentes cepas do HIV, o que sugere a utilização de mecanismos alternativos na degradação do receptor CD4.

1.6.2.1. A molécula CD4

A molécula de CD4 é uma glicoproteína integral com 55 kDa encontrada na superfície de linfócitos T e macrófagos (Stewart *et al.*, 1986; Thomas *et al.*, 1983). Esta proteína está envolvida na adesão celular (Doyle & Strominer, 1987), sinalização molecular durante a ativação celular (Rosoff *et al.*, 1987) e também serve como receptor para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Dalgleish *et al.*, 1984). A molécula de CD4 possui 5 resíduos de cisteína espalhados pelos domínios citoplasmáticos e transmembrânicos. Dois destes resíduos, C420 e C422, fazem parte dos oito resíduos de aminoácidos presentes na parte citoplasmática da molécula envolvida na ligação de CD4 com a proteína *Nef* do HIV-1 (Shaw *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 1990).

Nef liga-se à CD4 e utiliza da maquinaria celular de reciclagem endógena do receptor para reduzir a expressão deste na célula (Roeth, J. *et al.*, 2006).

1.6.2.2. As proteínas adaptadoras de complexos (APs)

Estas proteínas são responsáveis pela formação de complexos vesiculares que mediam o tráfego intracelular de proteínas [144]. As APs são seletivamente recrutadas

pelas proteínas por ligações com motivos lineares contendo os aminoácidos tirosina ou dileucina canônicos em domínios citoplasmáticos.

A especificidade do recrutamento de AP baseia-se, em parte, na distribuição subcelular do complexo AP. Por exemplo, AP-1 se localiza no trans-Golgi (TNG), AP-2 na membrana plasmática e por sua vez AP-3 em endossomos, sendo diretamente mediados em cargo da seleção local [145], [146], [147], [148].

Há algumas sobreposições na atividade das APs, portanto, proteínas acessórias são recrutadas dependendo de sua especificidade. Por exemplo, anfifisina, endofilina, epsina, AP180, e Hip1/Hip1R são associadas com AP-2 [149]. Epsina R[150], entoprontina [151], e proteínas possivelmente associadas ao Golgi [145], participam com AP-1. Estes complexos multiproteicos formados por AP-1 e AP-2 e suas respectivas proteínas acessórias permitem a formação de moléculas com revestimentos de clatrina com facilidade [152]. Em contraste, AP-3 mostrou-se capaz de mediar a formação tanto de moléculas revestidas por clatrina como moléculas vesiculares [153].

Finalmente, a localização e composição lipídica, também estão diretamente relacionadas ao recrutamento AP, por exemplo; as kinases lipídicas têm sido utilizadas como transportes vesiculares em várias localizações intracelulares [152].

1.6.2.3. Proteína VIH

A subunidade H (VIH) da ATPase vacuolar de membrana é uma enzima que media a acidificação de organelas intracelulares eucarióticas. Essa acidificação faz-se necessária em vários processos intracelulares, tais como: seleção de proteínas, ativação zimogênica, reciclagem de receptores mediados por endocitose e vesícula sináptica para geração de gradiente de prótons [154], [155].

A proteína VIH é composta por um domínio V1 citosólico e um domínio V0 transmembrânico. O domínio V1 consiste em subunidades; A, B, G, C, D, E, F e H, este domínio possui o sítio de ATPcatalítico. A subunidade H é a responsável pela regulação do domínio V1, que é necessário para a catálise de ATP[73],[156].

VIH se liga no sítio da cadeia “ μ ” de AP-2, e está descrito interagir na ligação com CD4 pelo complexo AP-2 clatrina [157], [112],[158].

1.6.2.4. Proteína COP-1

A proteína COP-1 é um “*coatomer*”(proteína de revestimento) que desempenha um papel relativamente definido na segmentação retrógrada das proteínas do retículo endoplasmático (RE), assim como selecionar vesículas transportadoras no Golgi [159]. Outra interessante, mas ainda não muito elucidada atividade de COP-1 é na participação na movimentação dos endossomos. COP-1 vem sendo mostrado como capaz de se ligar às membranas de endossomos, de maneira pH-dependente [160], [122], e se envolver na reciclagem endocítica [161], na biogênese do comportamento multivesicular [162], formação de fagossomos [163], [164], e no transporte retrógrado da membrana plasmática para o RE [165],[166].

A interação entre *Nef* e β -COP, um componente de COP-1, foi identificada por Benichou, S. *et al* em 1994 [136], e há evidências que esta interação está diretamente correlacionada com a acidificação de endossomos tardios, responsáveis pela degradação de CD4 via *Nef*[167].

Devido ao grande número de parceiros *Nef* teria capacidade de controlar o transporte intracelular de várias proteínas em diferentes níveis. De fato, foram descritas anormalidades na morfologia endossomal de vários grupos de proteínas induzidos por *Nef* [114], [138], [168], e a expressão de *Nef* aumentaria a quantidade de endossomos, lisossomos e corpos multivesiculares [168], [169], [79], [170], [171], [108], [105],[172].

1.6.2.5. Proteína hTEII

A tioesterase humana II (hTE) também foi envolvida no processo de endocitoses de CD4 mediado por *Nef* [115]. Entretanto, a participação desta proteína no mecanismo de modulação de CD4 foi questionada desde que alguns alelos de *Nef*, como os presentes nas cepas SF2 do HIV-1 e mac239 no SIV, não interagem com esta proteína celular, mas continuam diminuindo eficientemente a expressão da molécula CD4 [116]. O resíduo D123 de *Nef* foi descrito como crítico na interação com hTE, assim como na dimerização da proteína viral na modulação de CD4 e do complexo de histocompatibilidade do tipo I (MHC I) [115].

Ornelas (2007), mostrou que o bloqueio desta proteína, aumentaria os níveis de expressão de CD4 independentemente da presença da proteína *Nef*, o que confirmaria a

importância de hTEII para a reciclagem endógena do receptor de superfície CD4 [173].

1.6.2.6. Proteína Eps15

Esta proteína é um componente da via Receptores de Fatores de Crescimento Epidermal (EGFR). E está presente em vesículas formadas por clatrina, envolvidas na endocitose de receptores de superfície. A Eps15 é um fator importante na formação, envaginação e fusão de complexos endocíticos de clatrina mediado pela proteína AP2 [174].

Não há relatos da participação desta proteína na modulação de CD4 mediada por Nef, entretanto, já está bastante elucidado seu papel na degradação de receptores de superfície [175].

1.6.2.7. Proteína Dyn 2

Proteína da família de GTPases, possui no N-terminal um domínio GTP, responsáveis por se ligarem e hidrolisarem a molécula de guanosina trifosfato. A Dinamyna 2 (Dyn2), é um importante fator no processo de endocitose e mobilidade intracelular [176].

Foi descrita, por exercer um importante papel no aumento na infectuosidade viral Nef dependente, embora não interaja diretamente com a proteína viral [177], [178].

1.7. Técnicas para a caracterização de proteínas

1.7.1. A técnica FACS/FRET

Uma das poucas técnicas, não evasivas, para o estudo de interação entre proteínas seria a técnica de *Fösters resonance energy transfer* (FRET) [179], [180]. A técnica FRET é baseada sobre a transferência de energia de um fluoróforo doador excitado para um fluoróforo aceptor próximo, resultando no aumento de fluorescência emitida pelo aceptor [181]. Entretanto, esta técnica é baseada por microscopia de fluorescência, o que além de tedioso, essencialmente impede a análise de interação entre proteína em ensaios com grande número de células, *high-throughput-screening* (HTS) [179], [180].

A técnica de *Fluorescence activated cell sorting* (FACS), além de não evasiva, é uma técnica sensível e quantitativa, que permite medir um grande número de células em um período de tempo razoável [182].

Em 2010, Banning, *et al.*, mostrou que estas duas técnicas podem ser utilizadas em conjunto no estudo de interação entre proteínas. Estes estabeleceram um versátil ensaio de FACS, baseado em FRET, usando como padrão positivo para FRET o par CFP/YFP [183]. Ensaio que puderam demonstrar a aplicabilidade da técnica em ensaios de HTS, pela seleção de células FRET positivas [184].

1.7.2. A técnica de RNAi

Um dos grandes avanços nas últimas décadas na biologia molecular foi a descoberta de que as moléculas de RNA podem regular a expressão de genes [185]. Por muitos anos as moléculas de RNA eram conhecidas apenas por participar em processos clássicos como transcrição, processamento e tradução. Porém estes conceitos começaram a ser mudados quando em 1998 cientistas descreveram um novo mecanismo de inibição da expressão gênica induzido pela presença de RNA de dupla fita (dsRNA), conhecido como silenciamento da expressão gênica por RNA de interferência (RNAi) [185]. Este fenômeno foi inicialmente caracterizado como um mecanismo de defesa celular contra infecção viral e mobilização de transposons que funcionavam através da inibição traducional por dsRNA [186]. Desde então, este mecanismo também foi descrito em plantas, protozoários, nematóides e insetos. Mostrando sua conservação através da evolução das espécies [187].

O mecanismo de RNAi se tornou poderosa ferramenta para estudo das funções gênicas e bloqueio de infecções pela introdução de dsRNA homólogas ao RNAm alvo [188], [189], [190], [191].

O uso de RNAi também tem sido utilizado no combate a doenças como câncer, diabetes e outras doenças que envolvem patógenos como vírus, bactérias, fungos e protozoários [192], [193], [194], [195], devido o RNAi ter o poder de bloquear a expressão de genes possivelmente envolvidos nos processos patogênicos.

Apesar de que os genes virais possam servir como alvos para terapia gênica utilizando RNAi, genes do hospedeiro também podem representar bons alvos, já que

possuem maior estabilidade em seus processos de transcrição e tradução. Desta forma, a modulação do receptor CD4, que é um importante evento durante a infecção pelo HIV-1, pode ser um bom campo de estudo para a utilização de RNAi como terapia gênica.

Capítulo 2. Relevância da Pesquisa e Objetivos

2.1. Relevância da Pesquisa

Aproximadamente 20 anos após o desenvolvimento e implementação de terapia antirretroviral (HAART), a pesquisa em HIV / Aids atingiu uma encruzilhada. O surgimento de variantes virais resistentes às drogas antirretrovirais [196], o estabelecimento dos reservatórios virais latentes e resistentes ao HAART e à resposta imune do hospedeiro [197], [198], [199] e os efeitos citotóxicos causados por este tratamento, fizeram com que a descoberta de novas abordagens terapêuticas se tornassem uma prioridade na pesquisa relacionada ao HIV / Aids.

Diversos achados evidenciaram a importância da diminuição da expressão do receptor CD4 na patogênese da doença *in vivo*. As evidências mais diretas da participação deste fenômeno na progressão da doença foram obtidas de grupos de pacientes não-progressores, onde foi possível verificar a presença de vírus deficientes nesta função, na modulação do receptor CD4 mediada por *Nef* [200], [201]. Por outro lado, em estudo realizado por nosso grupo foi possível demonstrar que a maior infectuosidade observada em vírus isolados nos estágios finais da infecção se devia, ao menos em parte, à maior eficiência destas variantes virais em diminuir a expressão de CD4 [79].

Esses estudos sugerem fortemente que a capacidade de diminuir a expressão do receptor viral CD4 pode contribuir para o aumento da carga viral observada em pacientes aidéticos, o que nos levou à hipótese de que a inibição desta função viral poderia vir a retardar a progressão da doença e conseqüentemente melhorar o quadro clínico de pacientes HIV positivos.

Para nosso conhecimento, a modulação do receptor CD4 induzida pelo vírus HIV ainda não foi considerada como um alvo terapêutico. Entretanto, nosso grupo iniciou esforços para avaliar o impacto fisiológico que essa nova abordagem terapêutica poderia ter na replicação viral. Dessa forma, estudos preliminares mostraram que a liberação de expressão de moléculas de CD4 insensíveis à modulação induzida por *Nef* reduz dramaticamente a infectuosidade e a replicação viral [202].

Baseando-nos nestes dados encorajadores, lança-se a hipótese de que a caracterização e posterior bloqueio do mecanismo responsável pela diminuição da expressão de CD4, através da identificação e inibição dos parceiros celulares de *Nef*

envolvidos nesta função, poderia constituir uma nova e efetiva abordagem terapêutica.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo geral:

Caracterizar a interação das proteínas celulares envolvidas na degradação de CD4 mediada por diferentes alelos da proteína Nef do HIV-1.

2.2.2. Objetivos específicos

1. Desenvolvimento de vetores que expressem as diferentes proteínas celulares fusionadas aos genes repórteres pECFP/YFP e vetores lentivirais que expressem moléculas de RNAi contra as diferentes proteínas celulares;
2. Avaliar a interação entre as proteínas celulares com diferentes alelos de *Nef* e CD4 pela técnica de Frequência Relativa de Energia Transferida –FRET.
3. Confirmar a eficiência dos vetores lentivirais na inibição da expressão das proteínas celulares.

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens celulares

Neste trabalho foi utilizada a linhagem celular aderente de fibroblastos de rim humano denominada 293T. Por outro lado, células não aderentes também foram utilizadas, essas foram células imortalizadas derivadas de leucemia, a linhagem celular de linfócitos T CD4 denominada Jurkat E6.1. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em meio de cultura Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal inativado (SBF) (Gibco), 2 mM de L- Glutamina (Gibco) e 1% de penicilina/streptomicina (Gibco).

3.2. Construção de vetores de expressão

3.2.1. Desenvolvimento de vetores de fusão codificando proteínas celulares e alelos da proteína Nef

No primeiro momento foram construídos vetores de fusão para seis proteínas celulares, possíveis parceiras da proteína *Nef* na degradação de CD4, (hTEII, Ap1 σ , Ap2 σ , Ap2 μ , V1H, β -COP), três alelos da proteína *Nef* presentes em primatas humanos (NA-7, Sf2, NL4.3), um em primatas não humanos (Smm. Mac239) e para o receptor celular CD4.

3.2.1.1. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

As sequências dos genes correspondentes às diferentes proteínas foram amplificadas por PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para cada proteína contendo os sítios para as enzimas de restrição *Nhe* I e *Age* I, e a sequência necessária para posterior clonagem e fusão destes genes nos vetores de expressão pECFP e pEYFP (proteína de fluorescência “cyan” e proteína de fluorescência “yellow” respectivamente).

Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir da sequência de nucleotídeos de cada uma das proteínas, obtidas no site do *National Center for Biotechnology Information* (ncbi) www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/HIVInteractions/nef.html. (Tabela 3.1).

Nome	Sequências	Nº de bp
5'hTEII-Nhe I	TGCGGCTAGCATGtcgtccccgcagg	1188bp
3'hTEII-Age I	TCGACCGGTGCACCTGCTCCcaggtctcagagag	1188bp
5'CD4-Nhe I	TGCGGCTAGCATGaaccggggagtgccc	3134bp
3'CD4-Age I	TCGACCGGTGCACCTGCTCCaaagaaagtgg	3134bp
5'VH1-Nhe I	TGCGGCTAGCATGaccaaaatggatatac	1449bp
3'VH1-Age I	TCGACCGGTGCACCTGCTCCgcttcgggcggcagcgg	1449bp
3'AP1 γ -Age I	TGCGGCTAGCATGcagtttatgttgcttttag	2468bp
5'AP1 γ -Nhe I	TCGACCGGTGCACCTGCTCCtgctcagccaatttcttc	2468bp
5'AP2 σ -Nhe I	TGCGGCTAGCATGatccgctttatctcatccagaaccgggc	428bp
3'AP2 σ -Age I	TCGACCGGTGCACCTGCTCCctccaggactgtagcatcagc	428bp
5'AP2 μ -Nhe I	TGCGGCTAGCATGattggagcgttattcatc	1301bp
3'AP2 μ -Age I	TCGACCGGTGCACCTGCTCCgcagcgagtttcataaatgccactgc	1301bp
5'AP3 μ -Nhe I	TGCGGCTAGCATGatccatagctttttcttgatca	1256bp
3'AP3 μ -Age I	TCGACCGGTGCACCTGCTCCggttcgaacttgaactcccagctttgg	1256bp
5' β -COP1-Nhe I	TGCGGCTAGCATGacggcggctgagaacgtatg	2861bp
3' β -COP1-Age I	TCGACCGGTGCACCTGCTCCtatactagttttcttctg	2861bp
Nef. NL4.3-Nhe I	TGCGGCTAGCATGggtggcaagtggtc	618bp
Nef. NL4.3-Age I	TCGACCGGTGCACCTGCTCCacttcaagaactgc	618bp
Nef. NA-7 -Nhe I	TGCGGCTAGCATG ggtggcaagtggtc	618bp
Nef. NA-7 -Age I	TCGACCGGTGCACCTGCTCCacttcaagaactgc	618bp
Nef. SF2-Nhe I	TGCGGCTAGCATGggtggcaagtggtc	618bp
Nef. SF2-Age I	TCGACCGGTGCACCTGCTCCacttcaagaactgc	618bp
Nef. Mac.239-Nhe I	TGCGGCTAGCATGggtggcaagtggtc	618bp
Nef. Mac.239-Age I	TCGACCGGTGCACCTGCTCCacttcaagaactgc	618bp

Tabela 3.1. Sequências de primers para amplificação de proteínas celulares e alelos de Nef. As sequências de *primers forward* e *reverse* para as diferentes proteínas celulares e alelos da proteína *Nef* do HIV-1 são descritos em caixa baixa, já as sequências em caixa alta são respectivas sítios de fusão às proteínas de expressão, juntamente com sítios específicos para clivagem.

Para amplificação dos diferentes genes juntamente com a sequência necessária para a fusão dos mesmos nos vetores de expressão, foram desenhados dois diferentes programas de PCR dependendo do número de pares de bases dos genes. O primeiro

programa de PCR (programa 1) foi elaborado para genes de tamanho maior a 1.400 pares de bases (CD4, VH1, AP1 γ e β -COP1). Já o segundo programa de PCR (programa 2) foi utilizado para amplificação de genes com menos de 1.400 pares de bases (hTEII, AP2 σ , AP2 μ e os diferentes alelos da proteína Nef do HIV-1; *Nef* NL4.3; *Nef* NA7; Nef SF2 e o alelo do SIV, *Nef* Mac.239)

Em ambas as reações de amplificação das proteínas celulares, foi utilizado como “*template*” o banco de cDNA extraído de células HeLa (células de adenocarcinoma cervical humano). Já no caso da amplificação dos alelos de *Nef*, foi utilizado como “*template*” plasmídeos (cedidos gentilmente pelo Dr. Michael Schindler do Heinrich Pette Institut – Hamburgo, Alemanha) carregando a versão selvagem da proteína *Nef* de diferentes cepas do HIV-1 (SF2, NA7, Mac239 e NL4.3). Em todas as reações foi usada a enzima polimerase utilizada foi a “*Phusion High-Fidelity DNA Polymarese*”, uma Taq polimerase de alta fidelidade e processamento (índice de erro 50 vezes menor que a *Taq* DNA Polymerase e 6 vezes menor que a “*Pyrococcus furiosus*” DNA Polymerase e com atividade exonuclease de “*proofreading*” 3’- 5’)

Condições do primeiro programa de PCR: 1X “*Phusion High-Fidelity Buffer*”; 10 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato; 1 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO); 0,75 μ M de cada “*primer*”; uma unidade (0,5 μ l) de “*Phusion® High-Fidelity DNA “Polymarese”*” (“*New England Bio Labs*”) e, por fim, quantidade de água mili Q suficiente para um volume final de 50 μ l.

➤ **1º Programa de PCR.**

96°C – 5 min
 96°C – 60 seg
 52°C – 60 seg
 72°C – 8 min
 72°C – 10 min
 4°C – ∞

} 37 ciclos

CD4 - *Nhe* I : 5’ - TGCGGCTAGCATGtctccccgcagg - 3’
 CD4 - *Age* I : 3’ - TCGACCGGTGCACCTGCTCCcaggtctcagaGag - 3’

} 3134 pb

VH1 - *Nhe* I : 5' - TCGGGCTAGCATGaccaaatggatgc - 3' }
 VH1 - *Age* I : 3' - TCGACCGGTGCACCTGCTCCgcttcggggcggcagcgg - 3' } 1449 pb

AP1 γ - *Nhe* I : 5' - TCGGGCTAGCATGcagtttatgttgccttttag - 3' }
 AP1 γ - *Age* I : 3' - TCGACCGGTGCACCTGCTCCtgcagtcacaatttcttc - 3' } 2468 pb

β -COP1 - *Nhe* I : 5'-TCGGGCTAGCATGacggcggtgagaacgtatg - 3' }
 β -COP1 - *Age* I : 3'-TCGACCGGTGCACCTGCTCCtatactagtttcttctg - 3' } 2861 pb

Condições do segundo programa de PCR: 1X Phusion High-Fidelity Buffer; 10 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato; 0,5 μ M de cada *primer*; uma unidade (0,5 μ l) de *Phusion® High-Fidelity DNA Polymarese* (New England Bio Labs) e, por fim, quantidade de água mili Q suficiente para um volume final de 50 μ l.

➤ **2º Programa de PCR.**

96°C – 5 min
 96°C – 60 seg }
 52°C – 60 seg } 35 ciclos
 72°C – 4 min }
 72°C – 8 min }
 4°C – ∞

hTEII - *Nhe* I : 5' - TCGGGCTAGCATGtctgccccgcagg - 3' }
 hTEII - *Age* I : 3' - TCGACCGGTGCACCTGCTCCcaggtctcagaGag - 3' } 1188 pb

AP2 σ - *Nhe* I : 5'-TCGGGCTAGCATGatccgctttatcctcatccagaaccgggc - 3' }
 AP2 σ -*Age*I:3'-TCGACCGGTGCACCTGCTCCctccagggactgtagcatcagc-3' } 428 pb

AP2 μ - *Nhe* I : 5' - TCGGGCTAGCATGattggaggettattcacc - 3' }
 AP2 μ -*Age*I:3'-TCGACCGGTGCACCTGCTCCgcagcaggtttcataaatgccactgc-3' } 1301 pb

Nef NL4.3 - *Nhe* I : 5' - TGCGGCTAGCATGggtggcaagtggc - 3' }
 Nef NL4.3 - *Age* I : 3' - TCGACCGGTGCACCTGCTCCacttcaagaactgc - 3' } 618 pb

Nef NA-7 - *Nhe* I : 5'- TGCGGCTAGCATGggtggcaagtggc - 3' }
 Nef NA-7 - *Age*I : 3'- TCGACCGGTGCACCTGCTCCacttcaagaactgc -3' } 618 pb

Nef SF2 - *Nhe* I : 5' - TGCGGCTAGCATGggtggcaagtggc - 3' }
 Nef SF2- *Age*I : 3'- TCGACCGGTGCACCTGCTCCacttcaagaactgc -3' } 618 pb

Nef Mac239 - *Nhe* I : 5' - TGCGGCTAGCATGggtggcaagtggc - 3' }
 Nef Mac239 - *Age* I : 3'- TCGACCGGTGCACCTGCTCCacttcaagaactgc -3' } 618 pb

3.2.1.2. Estratégia de clonagem

Os produtos de PCR contendo os sítios de restrição para as enzimas *Nhe* I e *Age* I foram digeridos com as mesmas enzimas, purificados do gel de agarose por meio de coluna de cromatografia para extração de DNA em gel de agarose (Promega) e clonados nos vetores de expressão pECFP e pEYFP (Figura 3.1).

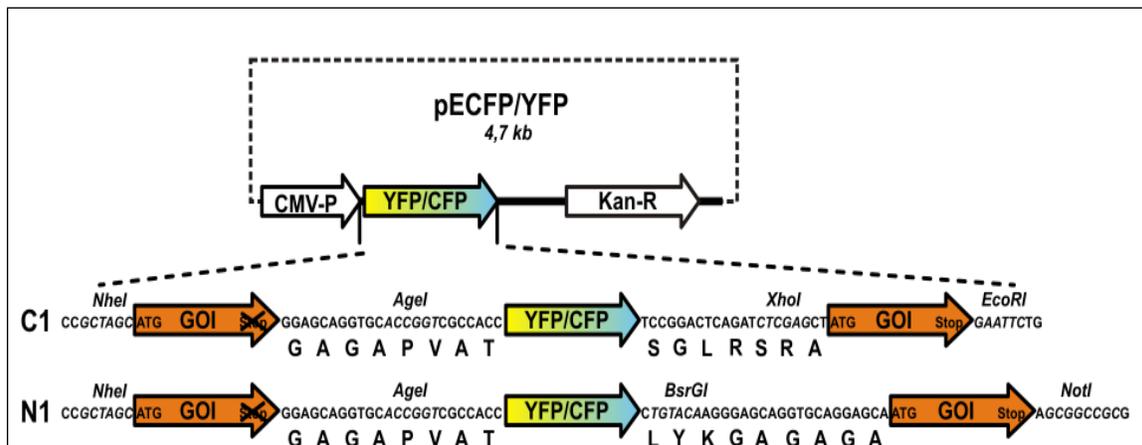


Figura 3.1. Esquema de clonagem das sequências dos diferentes genes nos vetores de expressão pECFP/YFP. As sequências de clonagem como os sítios de restrições *Nhe* I e *Age* I, são descritas no esquema acima, onde C1 corresponde a ligação do incerto amplificado no vetor, de expressão CFP, enquanto N1 corresponde à ligação do incerto amplificado no vetor, de expressão YFP. A sequência de aminoácidos GAGAPVAT é necessária para a ligação e fusão das proteínas celulares com os vetores pECFP/YFP, estas foram inseridas pelos *primers* no final da sequência, dos oligonucleotídeos.

3.2.1.3. Clonagem

A reação de ligação foi realizada utilizando-se 0,5 µg de vetor digerido, 5µl de produto de PCR digerido, 10 unidades de T4 DNA ligase (Fermentas) juntamente com *Taq* DNA ligase (New England BioLabs) - para aumentar eficiência de formação de pontes fosfodiéster entre o extremo 5' fosfato com 3' hidroxil - e tampão da enzima T4 DNA ligase na concentração final de 1X. A solução de ligação foi incubada a 20°C durante 3 horas.

Para obtenção de clones contendo os genes das proteínas celulares e os diferentes alelos de *Nef* fusionados aos genes *reporters*, bactérias One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* foram transformadas com a reação de ligação pela técnica de choque térmico e posteriormente plaqueadas em meio LB-ágar (1,5% de ágar bacteriológico, suplementado com 100 µg/ml de kanamicina). Após incubação à 37°C por 16 horas as colônias resultantes da seleção por antibiótico foram crescidas em 7 ml de meio LB líquido suplementado com 100 µg/ml de kanamicina e submetidas a extração de DNA plasmideal por coluna pelo GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Cat: #K0501).

A confirmação da clonagem dos diferentes genes, previamente digeridos, foi realizada por eletroforese em gel de agarose, com posterior sequenciamento e análise de homologia em banco de dados BLAST - Basic Local Alignment (em anexo).

3.2.2. Desenvolvimento de vetores lentivirais codificando RNA de interferência para proteínas celulares e alelos de *Nef*.

Os vetores lentivirais contendo as sequências dos RNAs para as diferentes proteínas foram construídos em duas etapas. Num primeiro momento, vetor pSUPER-PGK-EGFP-NEO foi digerido com as enzimas de restrição *Xho* I e *Bam*H I, juntamente com o vetor lentiviral pNL-SIN-CMV-BLR (gentilmente cedidos pelo Dr. Bryan R. Cullen do Howard Hughes Medical Institute). Um cassete foi liberado pelo vetor pSUPER, correspondendo à sequência PGK-EGFP-NEO. O vetor lentiviral pNL-SIN liberou o fragmento correspondente ao promotor CMV e à sequência que confere resistência ao antibiótico blastomicina (BLR). Em seguida, o cassete liberado pelo vetor plasmidial pSUPER foi ligado no vetor lentiviral pNL-SIN, obtendo-se o vetor lentiviral pNL-SIN-PGK-EGFP-NEO (Figura 3.2).

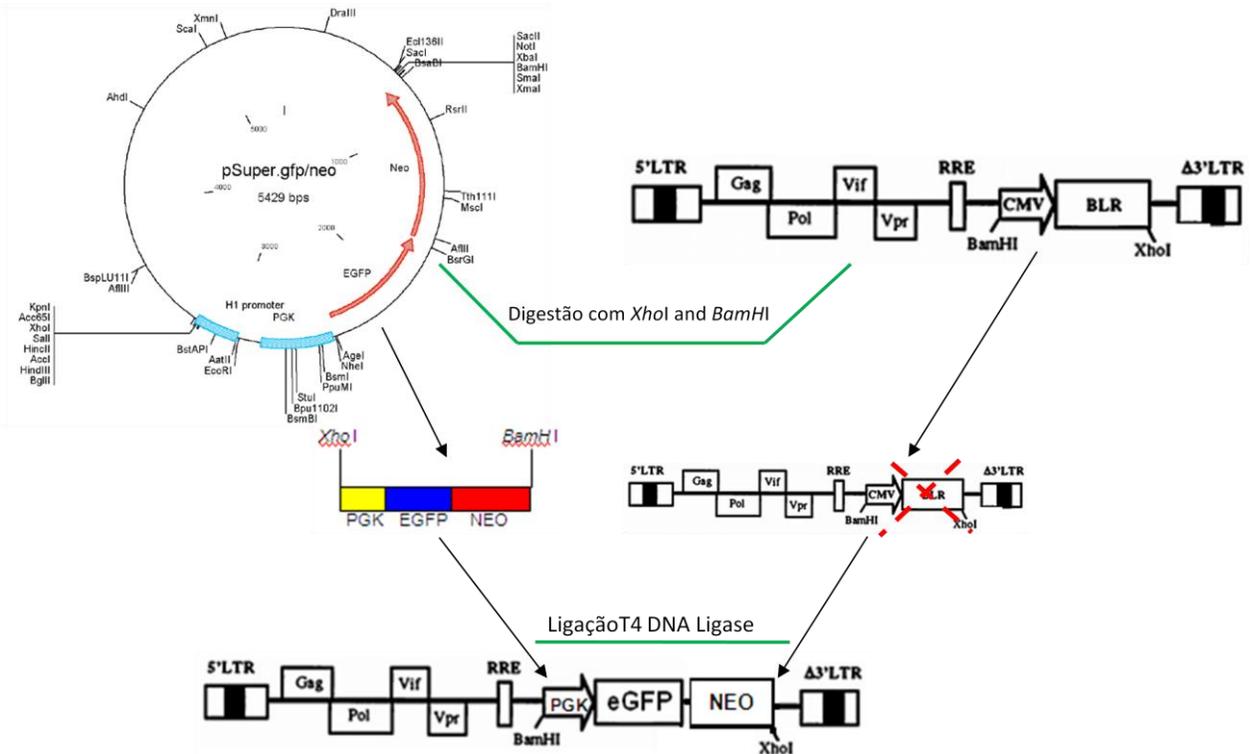


Figura 3.2. Construção do vetor lentiviral pNL-SIN-PGK-EGFP-NEO. Digestão dupla dos vetores, plasmidial pSUPER-PGK-EGFP/NEO e lentiviral pNL-SIN-CMV-BLR com *Xho I* e *BamH I*, seguida da ligação do cassete PGK-EGFP-NEO no vetor lentiviral pNL-SIN, formando o vetor lentiviral pNL-SIN-PGK-EGFP-NEO.

Posteriormente os vetores pSUPER-H1-RNAi codificando os RNAs para as diferentes proteínas foram clonados no vetor lentiviral pNL-SIN-PGK-EGFP-NEO nos sítios *Xba I* e *Cla I* originando o vetor lentiviral pNL-SIN-EGFP-NEO-RNAi, carregando os RNAs específicos correspondentes à cada proteína (Figura 3.3). Os protocolos de clonagem utilizados se encontram descritos no tópico “3.2.1.3. Clonagem”

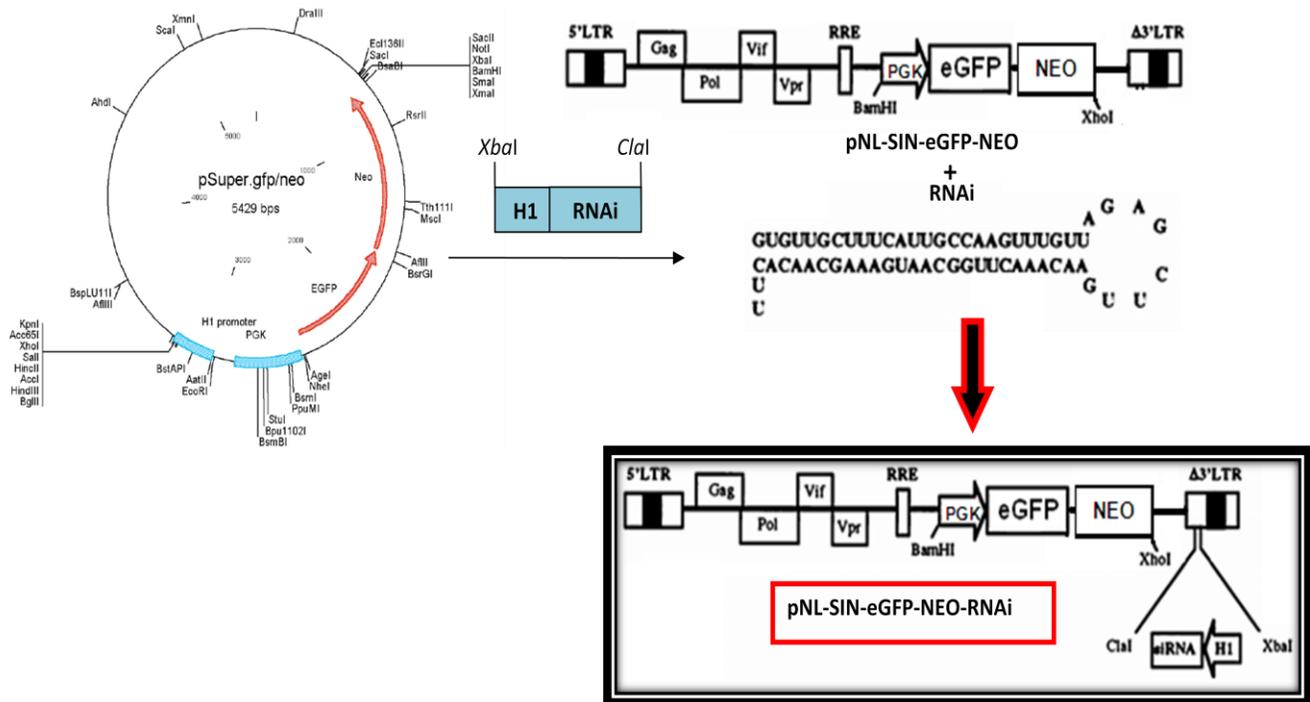


Figura 3.3. Construção do vetor lentiviral pNL-SIN-PGK-EGFP-NEO-RNAi. Após digestão dupla dos vetores, plasmidial pSUPER-PGK-EGFP/NEO e lentiviral pNL-SIN-CMV-BLR com as enzimas *Xba* I e *Cla* I os fragmentos contendo o promotor H1 e os correspondentes-RNAis foram clonados no vetor lentiviral pNL-SIN, formando o vetor lentiviral pNL-SIN-PGK-EGFP-NEO-RNAi.

3.3. Produção de partículas virais

3.3.1. Transfecção de células e quantificação de partículas virais.

A transfecção das células 293T foi realizada pela técnica de precipitação de fosfato de cálcio. Resumidamente, 24 horas antes do experimento as células eram ressuspensas em solução de tampão fosfato (PBS) 1X e colocadas em placas de transfecção de seis poços a densidade de 4×10^5 células/poço em 2 ml de meio de cultura DMEM suplementado.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para cada poço, 5 ug (quantidade total) de DNA plasmidial, distribuídas entre o vetor lentiviral (carregando os RNAis para as proteínas celulares) ou o vetor pBR (carregando diferentes alelos de Nef), pCTAT, pCREV e pVSV-G (em uma razão de 4,8;0,25;0,25;0,15 reespectivamente), foram diluídos na mistura de 125 µl de água destilada e 125 µl de CaCl₂ 0,5 M. Paralelamente, para a formação dos cristais de fosfato de cálcio, a solução contendo o DNA plasmidial foi acrescentada gota a gota a 250 µl de uma solução 2X HBS (NaCl

280 mM; KCl 10 mM; Na₂HPO₄ 1.5 mM; dextrose 12 mM; Hepes 50 mM) sob agitação. Finalmente, a solução de transfecção foi espalhada gota a gota sobre a camada de células. Após 16 horas da transfecção, o meio de cultura antigo foi retirado e adicionado meio novo. Após 72 horas da transfecção, os sobrenadantes contendo as partículas virais foram recolhidos e estocados à -86°C.

A quantificação da produção das partículas lentivirais foi realizada pela técnica de ELISA utilizando o kit “*HIV-1 p24 Antigen ELISA*” (RETROtek ZeptoMetrix Corporation - USA) e anticorpo específico para a proteína viral p24.

3.4. Bloqueio da expressão gênica das proteínas celulares por RNAi

3.4.1. Transdução de células.

O procedimento de transfecção feito para a análise do bloqueio de expressão proteica foi o mesmo que o utilizado para produção de partículas virais “*3.4.1. Transfecção de células*”, entretanto os sobrenadantes não foram recolhidos para permitir que as partículas virais produzidas pelas células e liberadas no sobrenadante pudessem ser endocitadas novamente pelas mesmas células transfectadas, potencializando assim o nível de bloqueio das proteínas endógenas das células pelos siRNA transfectados e transduzidos.

3.4.2. Preparação do extrato protéico.

A extração de proteínas celulares foi realizada através da adição de tampão RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% NP-40; 0.25% deoxicolato de sódio; 150 mM NaCl; 1 mM EGTA; 1 mM PMSF; 1 µg/ml cada de aprotinina, leupeptina, pepstatina; 1 mM Na₃VO₄; 1 mM NaF) sob vigorosa agitação e subsequente centrifugação a 14.500 rpm para eliminação de restos celulares que ficaram no fundo do tubo.

As determinações das concentrações de cada extrato proteico foram realizadas pelo método descrito por “*Bradford Protocol – 1976*” utilizando-se albumina sérica bovina (Sigma®) como padrão.

3.4.3. Anticorpos utilizados.

Os anticorpos utilizados neste trabalho se encontram listados abaixo (tabela 3.2), assim como suas respectivas companhias.

Reagente	Produzido	Conjugado	Produzido	Número de catálogo
Anti CD4	camundongo	APC	BD Biosciences	555347
Anti hTEII	Coelho	-	Ab Cam	ab75070
Anti β -COP1	Coelho	-	Ab Cam	ab2899
Anti ATP6V1H	Coelho	-	GeneTex	GTX110778
Anti AP3 μ	Coelho	-	Ab Cam	ab87092
Anti AP2 μ	camundongo	-	Santa cruz	sc-99026
Anti AP1 γ	Coelho	-	USBiological	A2298-48B

Tabela 3.2. Listagem de anticorpos. Lista de anticorpos utilizados, demonstrando em que animal foi produzido, se o anticorpo está conjugado com alguma enzima ou fluorocromo, a companhia produtora do reagente e o número de catálogo.

3.4.4. Eletroforese, Sorting e Immunoblotting.

Aproximadamente 15 μ g dos diferentes extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sob condições desnaturantes e redutoras, conforme método originalmente descrito por “*Laemmli Protocol - 1970*”. Para isso utilizou-se o sistema de eletroforese vertical e os géis foram preparados com concentração de 10% para o gel separador e 4% para o gel concentrador (Current Protocols in Molecular Biology). As amostras foram diluídas em tampão de amostra 5x (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%; β -mercaptoetanol (2-Me) 15 mM e glicerol 10%) e fervidas por 5 min. antes de serem aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8; glicina 250 mM e SDS 0,1%) à voltagem constante de 70 V e de 150 V durante a passagem das amostras pelo gel concentrador e separador, respectivamente. Como padrão de massas moleculares para o experimento de eletroforese, utilizou-se o marcador comercial da Bio-Rad: Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (MW: 10 – 250 kDa).

Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema semisseco de transferência horizontal (Trans-Blot SD Semi-Dry

Transfer Cell, Bio-Rad), conforme as recomendações do fabricante. A transferência teve duração de 80 min. a corrente constante de $0,8 \text{ mA/cm}^2$, em tampão de transferência (Tris-HCl 48,4 mM; Glicina 39 mM; SDS 0,037% e Metanol 20%). Após a transferência, a membrana foi incubada em tampão de bloqueio (PBS 1X, Twen20 0,2% e Leite em pó desnatado 5%) por 1 hora a temperatura ambiente em agitação constante.

A membrana foi lavada três vezes em tampão de lavagem (PBS adicionado de Tween 20 0,2%) e então incubado com o anticorpo primário específico para cada proteína diluído 1:200 em PBS 1X contendo 1% de leite em pó desnatado (PBS-Leite), por 1 hora. Após duas lavagens de 10 min. cada, com tampão de lavagem, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, na diluição de 1:2000 em tampão PBS Leite por 1 hora à temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, de 10 min. cada, foi adicionado à membrana solução reveladora contendo 66 μl de p-nitro azul tetrazólico (NBT) (Gibco-BRL) e 33 μl de 5-bromo-4cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) (Gibco-BRL) em 10 ml de tampão Tris-HCl 100mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl_2 5 mM. A reação de revelação foi interrompida com lavagens sucessivas com água destilada. As massas moleculares das proteínas eram conferidas de acordo com o marcador utilizado no gel.

3.4.5. Citometria de Fluxo/Sorting

As células utilizadas para *immunoblotting* foram ressuspensas e lavadas duas vezes em PBS 1X e separadas pela máquina FACS ARIA *sorting*.

3.5. Infecção/Superinfecção

300.000 células Jurkat foram separadas em falcons de 15 mL, e lavadas duas vezes com PBS 1X. Em seguida foram ressuspensas com 1 mL aproximadamente 200 ng de p24 correspondentes às partículas virais carregando os vetores lentivirais codificando os RNAi para as proteínas celulares. Após 4 horas a 37°C com 5% de CO_2 , as células foram centrifugadas e o meio foi trocado por 2mL de meio RPMI+10%SFB, fresco. Passadas 20 horas pós-infecção estas células foram novamente lavadas e infectadas com 1 mL de partículas virais carregando os alelos de *Nef* (Mac239 e NL4.3), fusionadas com

a proteína repórter desRed (cedidos gentilmente pelo Dr. Michael Schindler do Heinrich Pette Institut – Hamburgo, Alemanha). Finalmente, após 96 horas pós-infecção, estas células foram recolhidas e analisadas por FACS.

3.6. Determinação dos níveis de CD4

Os níveis de expressão do receptor CD4 em células transduzidas com partículas virais carregando os diferentes RNAs e infectadas com vírus codificando os alelos de *Nef* foram quantificados por FACS 96h. após a infecção. Para isto as células foram lavadas duas vezes com solução de PBS 1X e incubadas por 45 min. no gelo com o anticorpo anti-CD4-APC em uma concentração de 5 µL/ml em PBS. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e ressuspensas em 200 µl de PBS+2%SFB. Os dados foram captados pela máquina FACS CANTO III, utilizando os seguintes canais: FL1(FITC), FL2(PE) e FL4(APC). Os resultados foram analisados com o programa Diva (BD Biosciences).

3.7. Frequência Ressoante de Energia Transferida – FRET

3.7.1. Transfecção de células para FRET

Células 293T foram transfectadas por técnica de fosfato de cálcio (técnica citada no tópico “3.4.1. *Transfecção de células*”), onde $1,5 \times 10^5$ células foram plaqueadas em placas de 12 poços com 1mL de meio de cultura DMEM suplementado. Para cada poço, 2,5 µg (quantidade total) de DNA plasmideal foram distribuídas, sendo 1,25 µg do vetor CFP e 1,25 µg do vetor YFP, fusionados às sequências de genes que expressam as diferentes proteínas celulares. Após 24-36 horas os sobrenadantes dos poços foram descartados e as células foram recolhidas e lavadas duas vezes com PBS+EDTA. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 200 µl de paraformaldeído 2% à 4°C.

3.7.2. Frequência Ressoante de Energia Transferida (FRET/FACS).

As medições de FACS/FRET foram feitas utilizando o aparelho FACS CANTO III (BD Bioscience) equipado com os lasers de 405 nm, 488 nm e 633 nm.

Para medir ECFP e FRET as células foram excitadas com o laser de 405 nm. O

resultado foi “plotado” no canal ECFP com o filtro padrão 450/40, enquanto o sinal de FRET foi medido com o filtro 529/24 (Semrock). Para medir EYFP, as células foram excitadas com o laser de 488nm, entretanto a emissão também era captada no filtro 529/24 (Semrock).

Na figura 3.4, abaixo, estão descritos os padrões utilizados para medir os níveis de FRET expressos pelas proteínas.

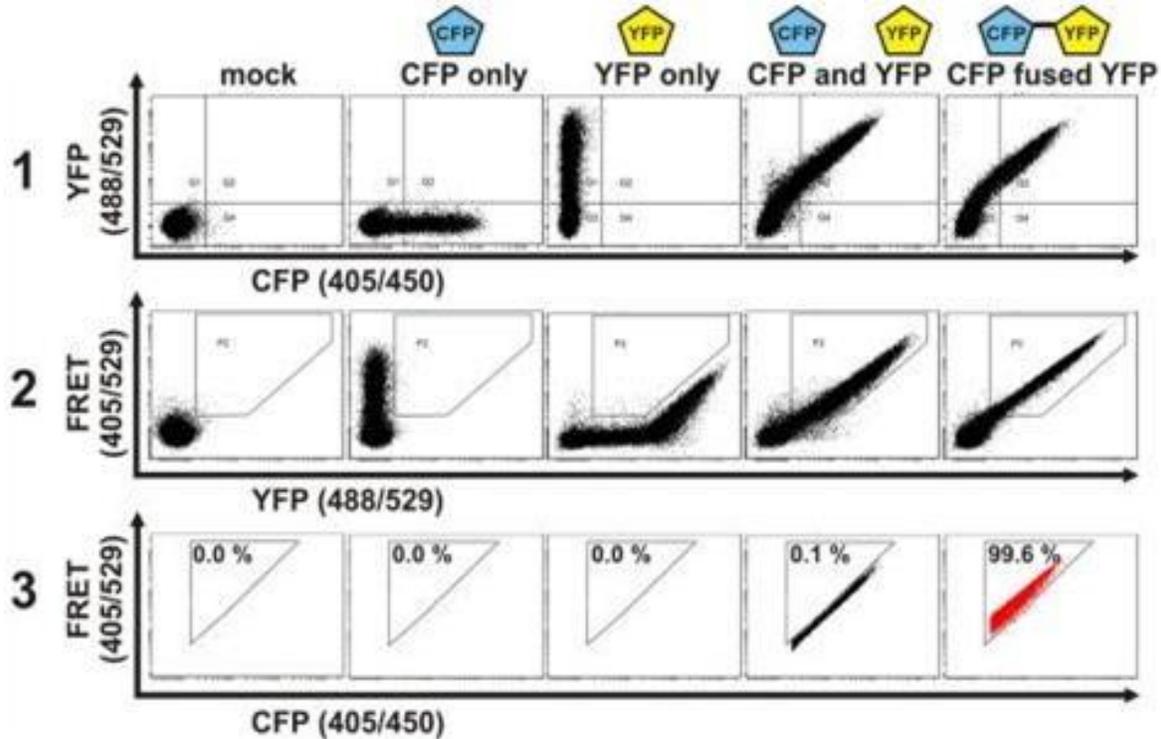


Figura 3.4. Estratégia para medir FRET por FACS. Células 293T transfectadas com os controles; apenas CFP, apenas YFP, CFP mais YFP e CFP-YFP fusionadas, foram analisadas por FACS. As células duplo-positivos foram captadas no painel 1, enquanto o falso positivo sinal de FRET, resultado da excitação de YFP ao laser de 405nm, foi excluída no painel 2. Os “plots” com as células restantes foram ajustados para conter apenas as células CFP-YFP fusionadas, controles para o sinal de FRET positivo.

3.8. Microscopia Confocal

3.8.1. Transfecção de células

Os experimentos de microscopia confocal foram realizados da seguinte maneira: antes das células serem plaqueadas para transfecção foram colocadas lamínulas circulares de vidro no fundo de cada poço de placas de seis poços. Posteriormente foram plaqueadas 500.000 células acima de cada lente e 24 horas mais tarde foram realizadas as transfecções, como descrito no tópico “3.6.1. Transfecção de células para FRET”. De 36

a 48 horas após as transfecções, as lentes foram recolhidas, lavadas em PBS+ paraformaldeído 4% tamponado a 4°C, e montadas em lâminas com solução de mowiol (2,4 g polyvinylalcohol, 6 g de Glicerina e 18 mL de PBS). As diferentes preparações foram mantidas ao abrigo da luz e umidade até análise, por até 15 dias.

3.8.2. Imagens de microscopia confocal

O microscópio utilizado para obter as fotos foi Zeiss LSM510 Meta, e o programa usado para a formatação e captura das imagens foi o software “ImageJ plug-in” [203].

Capítulo 4. Resultados e Discussão

A diminuição da expressão do receptor CD4 da superfície da célula infectada é uma das principais características de infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV-1) [204], [205]. Resultados obtidos por vários grupos inclusive o nosso, mostraram uma clara relação entre a capacidade de diminuir a expressão do receptor viral CD4 e o aumento da *infectiosidade* e replicação viral, observados nos estágios finais da infecção, sugerindo a participação deste fenômeno na patogênese e progressão da doença [76], [79]. Nosso grupo mostrou claramente que a inibição da modulação da expressão de CD4 mediada por Nef pode representar um novo alvo terapêutico [202]. Dos três genes virais estão envolvidos com esta função *nef* desempenha o papel mais importante na diminuição da expressão de CD4, aumentando a internalização da proteína CD4 sinalizando-la para degradação lisossomal [34], [206]. Diversas proteínas celulares foram envolvidas na modulação de CD4 mediada por Nef, dentre estas proteínas, o complexo adaptador de clatrina heterotetramérico AP-1 e AP-2 [110], [83], [85], a thioesterase humana (hTE), a ATPase (bomba de prótons) vacuolar V1H, a proteína adaptadora β -COP, a tirosina cinase, Hck e as proteínas Espn15 e Dynamina 2, foram descritas como essenciais neste mecanismo [116], [207], [113].

Experimentos para validar o papel de algumas destas proteínas neste contexto têm sido realizados usando versões mutantes dominantes, onde a superexpressão das mesmas levava a inibição da função das proteínas endógenas, a qual às vezes era acompanhada de uma alteração na degradação de CD4 mediada por Nef. No entanto estes estudos não foram validados quanto a sua relevância fisiológica no contexto da infecção viral.

Recentemente, a técnica de RNA interferência (RNAi) tem sido utilizada para o estudo da função de inúmeras proteínas em células de mamíferos, silenciando a expressão de genes específicos. Por outro lado, recentemente foi desenvolvida outra poderosa ferramenta para avaliar, quantificar, e caracterizar a interação entre proteínas. Esta técnica baseia-se na análise dos níveis de frequência relativa de energia transferida (FRET) por meio de citometria de fluxo (FACS) (FACS/FRET) [184].

Neste contexto, e mediante o uso das técnicas de RNA de interferência (RNAi) e (FACS/FRET) nós traçamos num primeiro momento e como objetivo geral deste trabalho, caracterizar a interação entre algumas das proteínas celulares envolvidas na degradação de CD4 e a proteína viral Nef do HIV-1.

4.1. Construção de Vetores

4.1.2. Construção de vetores de expressão de proteínas de fusão.

No primeiro momento os diferentes genes para cada proteína celular, hTEII, V1H, β COP, Ap1 σ , Ap2 σ , Ap2 μ e CD4, juntamente com alelos da proteína Nef (NA7, mac239, e NL4.3), foram fusionados aos genes codificando as proteínas fluorescentes CFP e YFP (fluorescência ciano e amarela respectivamente) e presentes nos vetores pECFP e pEYFP, respectivamente (gentilmente cedidos pelo Dr. Michael Schindler do Heinrich-Pette-Institut an der Universi*Tat* Hamburg).

A especificidade dos diferentes fragmentos amplificados correspondentes aos diferentes genes celulares e virais foi confirmada por eletroforese em gel de agarose posterior sequenciamento (dados não mostrados). A correta clonagem dos diferentes fragmentos amplificados foi confirmada por digestão dos vetores pEYFP / pECFP com as enzimas de restrição *Nhe* I e *Age* I e subsequente análise em gel de agarose, o que permitiu evidenciar a liberação de fragmentos de tamanho correspondente a sequência de cada gene clonado. (Figura 4.1).

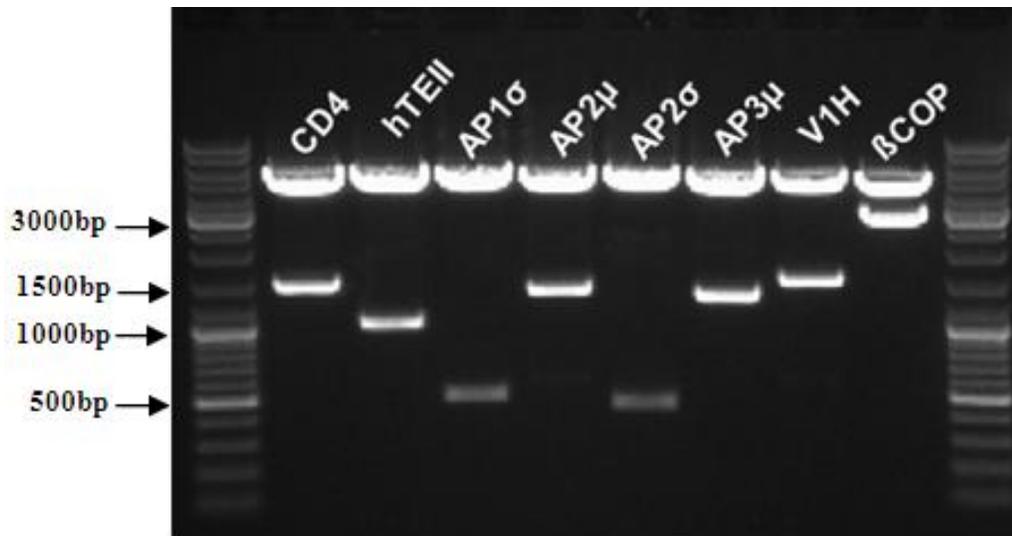


Figura 4.1. Confirmação da construção de vetores de expressão pECFP contendo as diferentes sequências correspondentes aos genes celulares. Os diferentes cDNAs correspondentes as diferentes proteínas celulares foram amplificadas por PCR usando oligonucleotídeos contendo sequências para as enzimas *Nhe*I e *Age*I. Após a amplificação os fragmentos foram digeridos e clonados nos vetores pEYFP e pECFP. A confirmação da clonagem foi obtida por digestão com as enzimas de restrição *Nhe*I e *Age*I e os fragmentos liberados tiveram seu peso molecular comparado com o marcador “*GeneRuler DNA Ladder Mix*”, o que mostrou os tamanhos de fragmentos esperados.

Depois de constatado os tamanhos corretos, das diferentes sequências de cDNA. As sequências foram confirmadas por posterior sequenciamento e alinhamento, juntamente com as sequências de aminoácidos da versão selvagem de cada proteína celular (Anexo I), obtendo-se assim a confirmação da correta amplificação e clonagem dos cDNAs que codificam as proteínas de interesse.

4.2. Expressão de proteínas celulares fusionadas

Para confirmar a correta expressão da localização das proteínas celulares, células 293T foram transfectadas, e analisadas após 36 horas, com as diferentes proteínas fusionadas a proteína CFP, por esta ser a fluorescência melhor captada na microscopia confocal e pelo mesmo motivo a fluorescência para a retratação foi em vermelho (Figura 4.2).

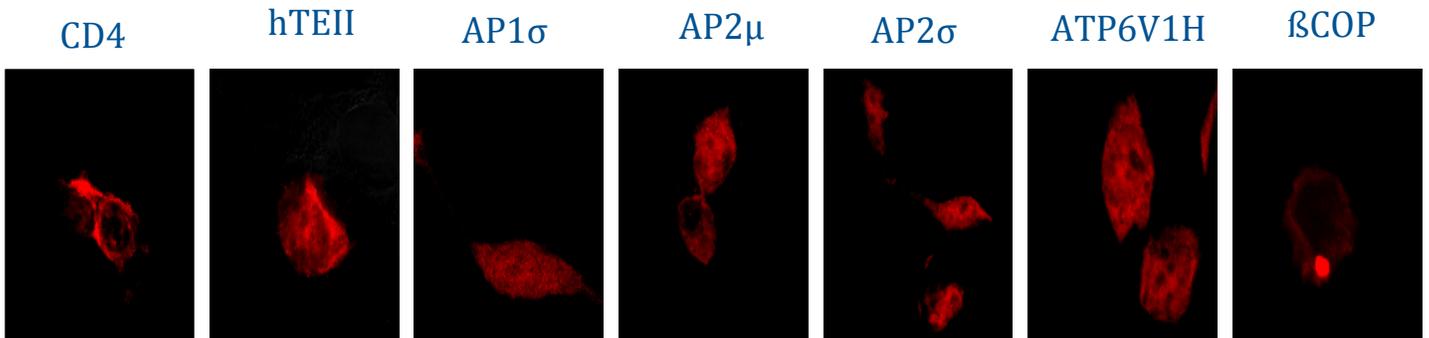


Figura 4.2. Expressão e localização celular de proteínas de fusão. Células 293T foram transfectadas apenas com DNAs dos vetores de expressão das proteínas celulares fusionadas à CFP. Na figura acima são mostradas fotos de Microscopia Confocal, nas quais retratam os níveis celulares em que as diferentes proteínas celulares se localizam dentro da célula.

Como pode ser observado na figura 4.2 foi possível confirmar a expressão e localização das proteínas de fusão com descrito na literatura [208], mostrando que a fusão à proteína “repórter” não afetou a localização endógena das proteínas celulares em estudo.

Enquanto as proteínas: hTEII, Ap1 σ , Ap2 μ , AP2 σ e V1H, mostraram uma expressão uniformemente distribuída no citoplasma da célula, as proteínas CD4 e β COP mostraram uma localização na membrana celular. Todavia, as células transfectadas com o vetor para expressão de CD4 mostrou uma concentração maior da proteína na membrana

celular, enquanto β COP mostrou uma maior concentração no núcleo da célula e uma pequena fração na membrana celular.

4.3. Caracterização da interação entre proteínas celulares e virais

Com o intuito de determinar o nível de interação das diferentes proteínas celulares com os diferentes alelos da proteína Nef e com a proteína CD4, foram realizados ensaios de FRET entre as proteínas celulares fusionadas a proteína ciano-fluorescente CFP e os alelos da proteína Nef (NA7, Mac239 e NL4.3) e o receptor celular CD4 fusionados a proteína amarelo-fluorescente YFP.

Tendo em vista que as proteínas de expressão CFP e YFP, não têm afinidade entre si, ou seja, estas foram transfectadas e utilizada como controle negativo em todos os experimentos de FRET, mostrando 0% de interação de FRET. Por outro lado, para obter um controle positivo mostrando o máximo de interação entre duas proteínas (100% de FRET), foram fusionadas as duas proteínas de expressão, CFP com YFP, e transfectadas em células 293T. Estes dois métodos foram adotados, neste trabalho, como parâmetros de mensuração de FRET (0% e 100%).

4.3.1. Interação entre proteínas celulares e alelo NA7 da proteína Nef

Como descrito anteriormente células 293T foram co-transfectadas com os vetores de expressão, expressando as proteínas celulares fusionada à fluorescência CFP juntamente com o vetor expressando o alelo NA7 de Nef fusionado a fluorescência YFP e após 36 horas a interação entre as proteínas celulares e a proteína Nef foi analisada por via FACS/FRET.

A figura 4.3 mostra os diferentes níveis de interação detectados entre cada proteína celular e o alelo NA7 de Nef expressos como porcentagem de interação. O baixo nível de interação entre o receptor CD4 e *Nef* NA7 (39%), pode ser devido a degradação de CD4 pela própria proteína viral, o que levaria a uma queda drástica do sinal detectado. Entretanto foi possível observar uma grande afinidade entre as proteínas *Nef* NA7 e a proteína responsável pela depalmitoilação do receptor CD4, a thioesterase II. A interação entre estas duas proteínas chegou praticamente a 90% de sinal de FRET positivo, quando comparada ao controle positivo CFP+YFP, o que traz uma informação importante a

respeito da interação de hTE com este alelo de Nef, dado que não existia informação até o momento na literatura [208], [115], [116], [209], [210], [211], [212]. A proteína formadora do complexo clatrina AP2 μ , uma das principais responsáveis pela reciclagem endógena do receptor CD4, também mostrou um nível significativo de interação com o alelo NA7 (45%). O que vem a confirmar dados da literatura que mostram a direta interação da subunidade desta proteína com a proteína viral [135], [100], [130].

Outra proteína que mostrou uma pequena, mas significativa, interação com Nef NA7 foi à proteína β COP (30%). É importante salientar que embora não existam dados conclusivos da participação desta proteína na degradação de CD4 mediada por Nef existe uma forte evidência de sua participação na reciclagem endógena de CD4 na formação de endossomos primários e secundários [136], [137], [138], [83].

Finalmente as proteínas AP1 σ , AP2 σ e V1H não mostraram uma interação relevante com *Nef* NA7. A ausência de interação entre *Nef* NA7 e as proteínas AP1 σ e AP2 σ , vem a confirmar dados da literatura no sentido de ausência de qualquer tipo de ligação entre estas proteínas celulares com alelos de Nef e a reciclagem endógena de CD4. Já a bomba de prótons ATP6V1H (V1H), foi descrita como uma importante parceira de Nef na degradação de CD4, sendo responsável pela acidificação dos endossomos que carregam moléculas de CD4 [97], [207] o que sugere que esta proteína celular poderia participar deste fenômeno não por interação direta com Nef, mas sim de uma forma indireta, talvez interagindo com proteínas presentes no complexo de degradação do CD4, como a proteína Ap2.

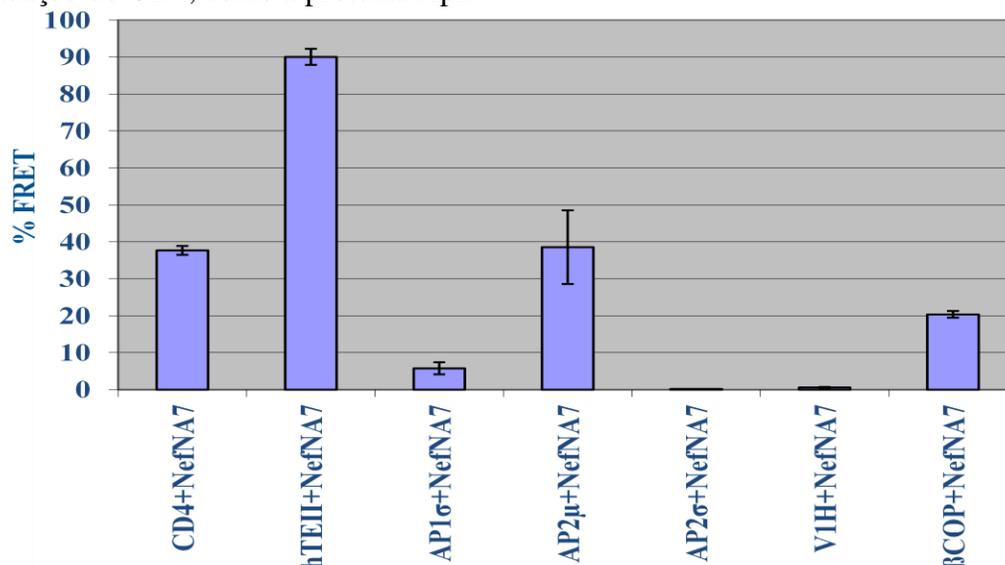


Figura 4.3. Caracterização da interação entre as proteínas celulares e a proteína Nef NA7 por FRET. Após co-transfecção de células 293T com vetores de fusão expressando as proteínas celulares e o alelo *Nef* NA7, foram medidos os níveis de FRET entre elas. As proteínas celulares CD4, hTEII, AP2 μ e β COP, mostraram diferentes níveis de interação com o alelo NA7 da proteína Nef (39%, 89%, 45% e 30%, respectivamente), enquanto AP1 σ , AP2 σ e V1H, não mostraram interação direta com o alelo de Nef.

4.3.2. Interação entre proteínas celulares e o alelo NL4.3 da proteína Nef

A figura 4.4 mostra os diferentes níveis de interação entre as proteínas celulares com o alelo NL4.3 da proteína Nef, cepa mais frequentemente encontrada em casos de infecção pelo subtipo B.

Embora o padrão de interação com as diferentes proteínas celulares tenha sido similar ao observado com o alelo NA7, os níveis foram significativamente menores.

A menor interação com a molécula CD4 (22%) poderia obedecer a uma menor afinidade deste alelo pela molécula CD4 ou uma maior capacidade deste alelo em degradar CD4.

Segundo Ornelas, a cepa NL4.3 da proteína Nef induz uma maior modulação da molécula de CD4, quando comparada a cepa *Nef* NA7 em células 293T transfectadas com plasmídeo codificando ambas as proteínas [173]. Esta informação reforça a idéia que a menor interação detectada entre o receptor CD4 e o alelo NL4.3 seria devido na verdade a uma maior degradação do receptor. Por outro lado embora o nível de interação com a hTE tenha sido substancialmente alto (64%), também foi menor ao observado com o alelo NA7. Sabendo que o sítio de ligação de hTEII, no alelo *Nef* NL4.3 (D₁₂₃) [115], é conservado em ambos os alelos [208], descarta-se a possibilidade de uma maior afinidade entre hTEII e *Nef* NA7 induzida por uma alteração na sequência de aminoácidos do alelo. No entanto, já se tem bem descrito na literatura que a modulação do receptor CD4, mediada por Nef, é resultado da interação entre o receptor CD4, o alelo de Nef e um complexo formado por proteínas celulares [204], o que sugere que mesmo hTEII tendo uma interação com *Nef* NL4.3 menor do que com *Nef* NA7, a maior degradação de CD4 por *Nef* NL4.3 pode-se dever a uma maior interação com outras proteínas celulares também envolvidas neste fenômeno, mas sem descartar a interação inicial entre CD4 e hTEII [116]. Uma alternativa seria que a interação entre este alelo e hTEII “*in vivo*” seja aumentada pela presença de outras proteínas celulares.

Similarmente aos resultados obtidos com as proteínas anteriores a interação com as proteínas AP2 μ e β COP (16% e 12%, respectivamente) foram menores aos observados com o alelo NA7, sendo a de β COP quase não significativa. Estes resultados, não significam que estas proteínas sejam menos importantes na modulação de CD4 mediada por este alelo, desde que existe uma importante evidencia na literatura a respeito da participação destas proteínas na degradação de CD4. [149], [152], [110], [213]. Com base nestes trabalhos embora a baixa interação detectada entre AP2 μ e β COP e o alelo *Nef* NL4.3 não seria possível descartar a participação das mesmas na modulação negativa do receptor CD4 por este alelo.

Os níveis de interação com as proteínas celulares AP1 σ , AP2 σ e V1H, foram negativos similarmente aos observados com o alelo NA7.

Na interpretação dos resultados acima descritos é importante se considerar que a baixa interação entre algumas proteínas celulares e os alelos de *Nef* do HIV-1 pode obedecer a ausência da molécula CD4, desde que as células 293T usadas nos ensaios não expressam este receptor, o qual poderia ser um fator potencializador, na interação das proteínas celulares e *Nef*.

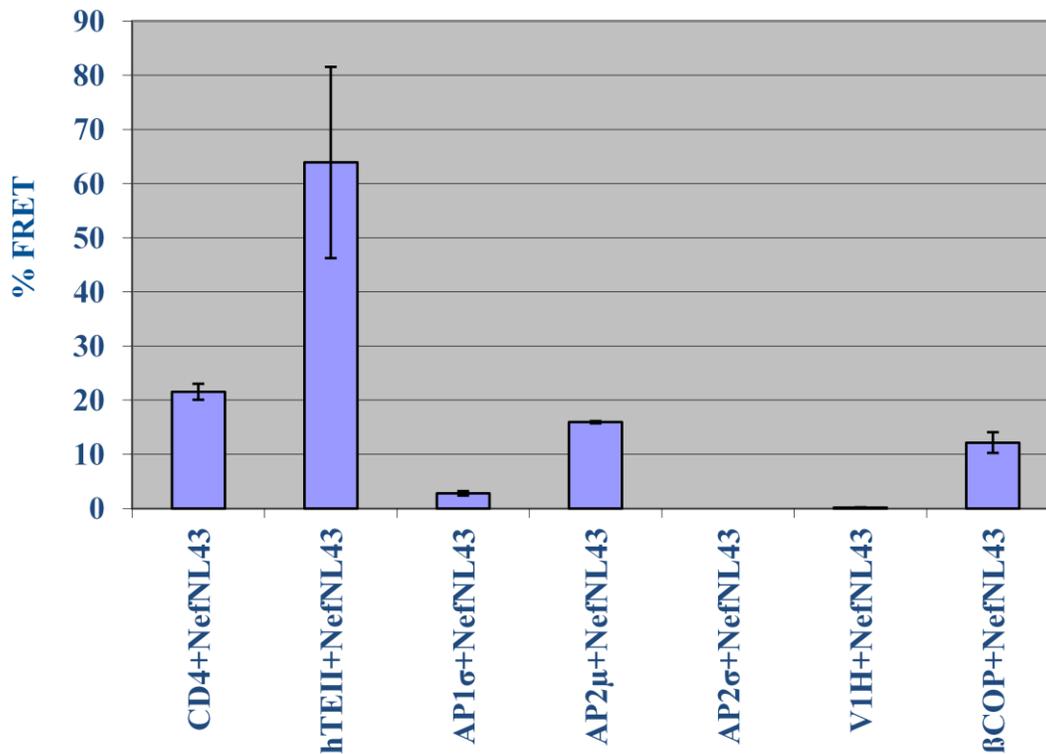


Figura 4.4. Níveis de interação direta entre as proteínas celulares e a proteína Nef NL4.3 por % de FRET. Co-transfecção de células 293T com vetores de fusão expressando as proteínas celulares e o alelo *Nef* NL4.3. O resultado da interação entre as proteínas celulares e o alelo NL4.3, medida por FRET, mostra de uma maneira geral uma redução desta interação pelas proteínas CD4, hTEII, AP2 μ e β COP, (22%, 64%, 16%, 12%, respectivamente) quando comparadas com o alelo *Nef* NA7, o que mostra uma menor interação com as proteínas celulares, entretanto talvez uma maior modulação de CD4.

4.3.3. Interação entre proteínas celulares e o alelo *Mac239* da proteína *Nef* do SIV

Também foram avaliados os níveis de interação das proteínas celulares com a variante *Mac239* de *Nef* presente no vírus da imunodeficiência simiana (SIV), a este alelo foi fusionado a fluorescência YFP e co-transfectado em células 293T, juntamente com as proteínas celulares fusionadas a fluorescência CFP.

Como podem ser observados na figura 4.5, os padrões de interação entre as proteínas celulares e esta variante de *Nef* foram diferentes aos obtidos com os variantes presentes no HIV-1. As únicas proteínas que mostraram relevante interação com este alelo foram CD4 e AP2 μ . Sendo que o nível de interação entre a proteína CD4 (13%) foi menor aos níveis observados com os outros alelos de *Nef*.

Por outro lado, quando comparada a sequência do alelo *Nef Mac239* de SIV com os demais alelos da proteína *Nef* do HIV-1 (NL4.3, NA7 e SF2), na figura 1.8, pode-se perceber alterações nos aminoácidos triptofano de posição 57 (W₅₇) e leucina na posição 58 (L₅₈), correspondentes ao sítio de ligação entre a proteína *Nef* e o receptor CD4, os quais são altamente conservados nos alelos da proteína *Nef* do HIV-1, [208]. Por outro lado em outras regiões desta sequência é possível observar um alto número de inserções/alterações de aminoácidos, como na posição inicial do triptofano em 70 (W₇₀), a alteração da leucina na posição 71 (L₇₁) por uma arginina (R₇₁), como mostrado por Roeth em 2006. Estas alterações podem estar diretamente relacionada com o alto nível de modulação de CD4 pelo alelo *Nef Mac239* de SIV (87%), observados por Ornelas, S., 2007 [173].

Outro fator que poderia ter influenciado na baixa interação entre este alelo e a proteína CD4 poderia ser a diferença nas sequências entre as versões da proteína entre primatas humanos e não humanos.

Entretanto, a interação detectada entre o alelo *Nef Mac239* e a proteína celular AP2 μ foi claramente maior à observada com os alelos anteriores (89%), o que poderia ser um fator importante na maior capacidade deste alelo de degradar CD4. Por outro lado

esta maior interação vem a confirmar dados da literatura a respeito do crítico papel desempenhado por esta proteína na endocitose de CD4 mediada por Nef [149], [152], [110], [213].

Esta maior afinidade entre o alelo *Nef* Mac239 e a proteína celular AP2 μ , talvez possa ser atribuída às diferenças apresentadas por este alelo na sequência de ligação a AP2. O domínio de ligação a proteína celular AP2 μ (EXXXLL₁₆₅) presente no alelo NL4.3 [135], [100], [130], encontra-se alterado no *Nef* Mac239 de SIV tanto em posições quanto em aminoácidos [208]. Já o sítio de ligação desta proteína em Mac239, se encontra da posição 187 à posição 192 com a deleção da leucina 191(-₁₉₁) e a alteração da leucina encontrada na posição 192 (L₁₉₂Y) por uma tirosina (Y₁₉₂), (EXXX-Y₁₉₂) [208], como pode ser confirmado no alinhamento da figura 1.8. Dessa forma estas alterações podem estar potencializando o nível de interação entre o alelo *Nef* Mac239 e a proteína celular AP2 μ , induzindo assim ao aumento do sinal de FRET.

Já a proteína hTEII, que mostrou ser a proteína celular com mais afinidade com os alelos de Nef do HIV-1, não mostrou interagir, ao menos diretamente, com a variante *Nef* Mac239, o que se explicaria por esta proteína ter sido identificada em primatas humanos, camundongos e leveduras, mas ainda não identificadas em primatas não humanos [214], [215]. Já a alta afinidade entre a proteína celular com variantes presentes no HIV-1, coloca em evidência a alta capacidade de adaptação deste vírus a diferentes hospedeiros usufruindo de novas proteínas celulares com objetivo de garantir uma alta eficiência em mecanismos patogênicos críticos a sua sobrevivência no novo hospedeiro.

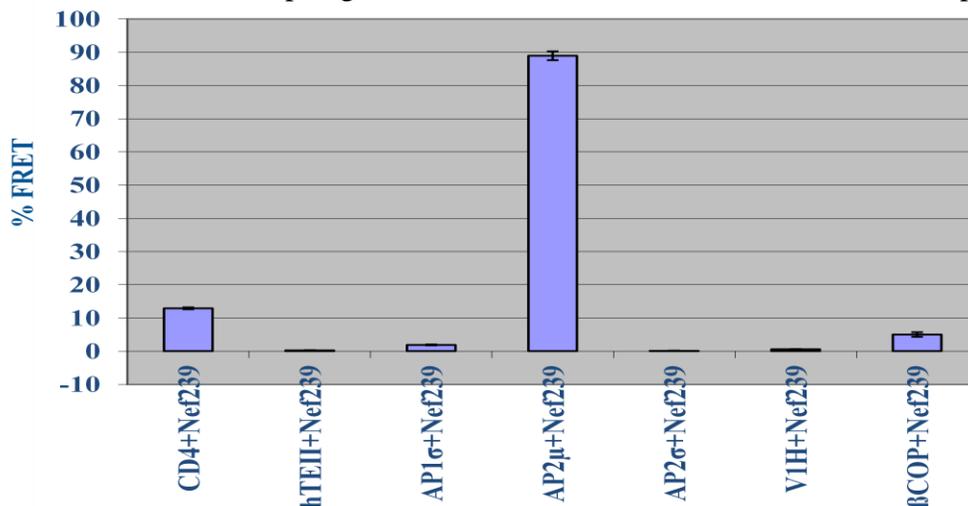


Figura 4.5. Níveis de interação direta entre as proteínas celulares e a proteína Nef Mac239 por % de FRET. Foi feita a co-transfecção de células 293T com vetores de fusão expressando as proteínas celulares

e a variante *Nef* Mac239 de SIV. Diferentemente dos experimentos anteriores, *Nef* Mac239 de SIV mostrou interação significativa apenas com CD4 e AP2 μ (13% e 89%, respectivamente), principalmente a última. Sendo que a interação com a proteína CD4 possa estar baixo justamente pelo nível de modulação do receptor celular ou também as variações na sequência de aminoácidos desta variante.

4.3.4. Interação entre proteínas celulares e o receptor CD4

Por fim e com objetivo de avaliar as possíveis interações entre o receptor celular CD4, e as outras proteínas celulares, células 293T foram co-transfectadas com a proteína CD4 fusionada a fluorescência YFP, juntamente com as proteínas celulares fusionadas a CFP, incluindo a própria molécula de CD4.(Figura 4.6).

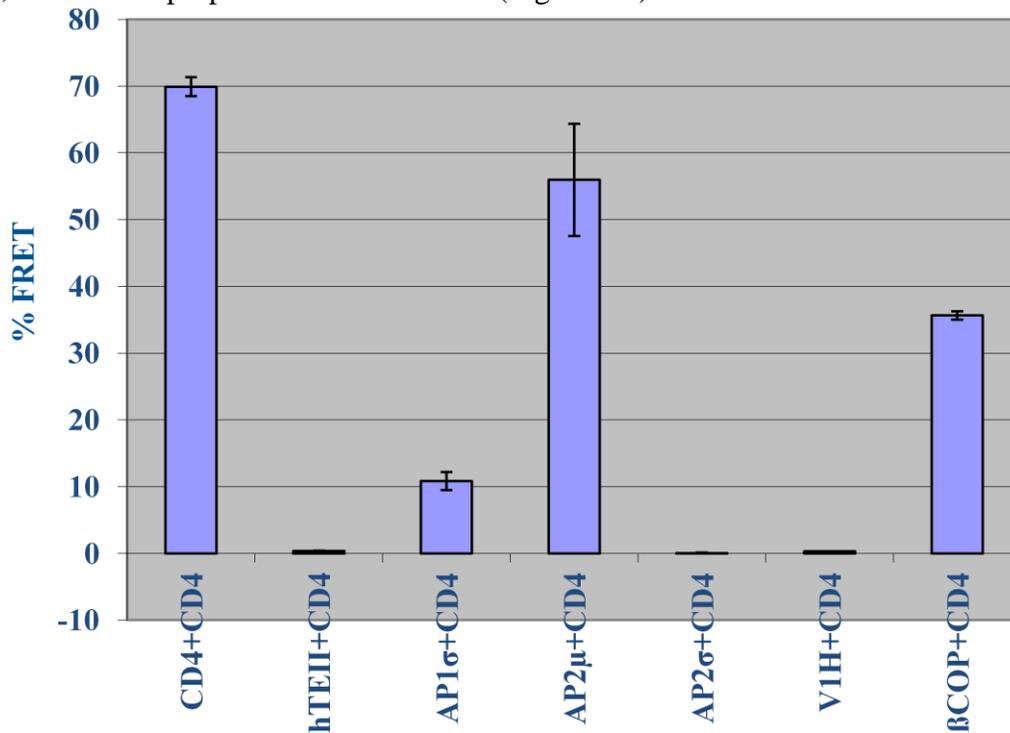


Figura 4.6. Níveis de interação direta entre as proteínas celulares e a proteína celular CD4 por % de FRET. 48 horas após a transfecção em células 293T, com a proteína CD4 fusionada a YFP juntamente com as diferentes proteínas celulares fusionadas a CFP, incluindo CD4. Foram obtidos grandes níveis de interação entre a proteína CD4 fusionada a CFP e a proteína CD4 fusionada a YFP (75%), por estarem sendo expressas no mesmo local e na concentração duas vezes maior que nos outros experimentos. A resposta quanto ao nível de interação da proteína AP2 μ com CD4 (50%) confirmou a existência de uma necessidade de ligação entre essas duas proteínas celulares. β COP (33%) pareceu ter uma maior ligação com CD4 do que os alelos da proteína *Nef*.

A alta interação observada entre as moléculas de CD4 (75%) pode obedecer a co-expressão de ambas as moléculas em sítios muito próximos na membrana plasmática o que levaria a um sinal de FRET que não refletiria necessariamente uma interação pelo que constituiria um falso positivo. Como mencionado anteriormente, a proteína AP2 μ é uma das principais proteínas envolvidas na reciclagem endógena de CD4, o que ficou

evidenciado pelos altos valores de FRET (50%), confirmando a idéia que AP2 μ pode ser uma das proteínas mais importantes tanto na reciclagem como na degradação de CD4 mediada por Nef.

Outra proteína que mostrou níveis elevados de interação com o receptor CD4 foi a proteína β COP (33%), confirmando a participação desta na reciclagem fisiológica do receptor CD4, na formação e direcionamento de endossomos. Já a proteína hTEII não mostrou interagir com o receptor CD4, à diferença do observado com as variantes NL43 e NA7 do HIV-1. Este resultado sugere que na presença da proteína Nef do HIV-1, hTEII poderia ser recrutada para potencializar a degradação da molécula de CD4 dependente de Nef, ao menos em seres humanos. Na literatura hTEII é descrita como uma enzima responsável por despalmitear a cauda transmembrânica da proteína CD4 para que esta seja sinalizada para reciclagem [216]. Entretanto, os resultados mostrados aqui sugerem que talvez esta proteína não interaja diretamente com a cauda transmembrânica do receptor CD4, mas sim necessite de algum tipo de sinalização prévia ou a participação de uma terceira proteína, para que hTEII despalmite a cauda citoplasmática do receptor de superfície CD4.

Apesar da proteína AP1 σ ter mostrado um pequeno sinal de interação com CD4, este resultado não foi considerado significativo, o que se aplica também para as proteínas AP2 σ e V1H que não mostraram nenhum tipo de interação direta com o receptor de superfície celular CD4.

É importante salientar a necessidade de repetir os experimentos acima descritos em presença dos alelos de Nef, com objetivo de verificar se os níveis de interação entre CD4 e as proteínas celulares são alterados em presença da proteína viral.

Os resultados de interação por FRET entre as possíveis proteínas celulares parceiras de Nef e os três alelos da proteína viral encontram-se resumidos na Tabela 1 e expressos como porcentagem de interação entre as diferentes proteínas, tomando como referencia de 100% de sinal de FRET, células 293T transfectadas com as proteínas repórteres fusionadas entre si, CFP fusionada a YFP, e como 0% de sinal de FRET, células 293T co-transfectadas com vetores expressando as duas proteínas repórteres separadamente.

Como esperado, com base na literatura, foi possível constatar uma forte interação da proteína celular Ap2 μ tanto com a proteína celular CD4, como com os alelos Nef NA7 e Mac239 (50,4; 45,1; 88,9 %, respectivamente) [217], [218]. Contudo, os níveis de interação desta proteína celular com o alelo NL4.3 não se mostraram tão elevados quanto nos outros alelos (16%), o que poderia evidenciar a necessidade da presença de outra(s) proteínas celulares, para que esta variante possa ter sua interação com CD4 potencializada. Estes resultados ressaltam a necessidade de repetir os ensaios na presença de outras proteínas celulares como a da própria molécula de CD4, o que poderia ser realizado utilizando linhas celulares de linfócitos T que expressem de maneira endógena todas as proteínas celulares, como por exemplo, a linha celular Jurkat E6.1, dessa forma todas as interações poderiam ser avaliadas num contexto mais fisiológico. Também foram registradas importantes interações entre a proteína β COP com a proteína CD4 (33%) e com Nef do alelo NA7 (30%). No entanto, esta mesma proteína registrou uma interação relativamente fraca com o variante presente na cepa NL43 (12%), resultado similar ao obtido com a proteína Ap2. Diferenças importantes nas sequências entre ambos os alelos, em outros sítios além do domínio de ligação a β COP (EE₁₅₅) [83], poderiam explicar estas diferenças de afinidade, tendo em vista [136], [137], [138], [83]. Estas semelhanças e diferenças, não somente na região de ligação das proteínas celulares nos alelos, de uma forma geral podem estar relacionadas a diferenciação nos níveis de interação entre os alelos e as proteínas celulares.

Finalmente, é de interesse destacar a fraca interação da proteína celular VIH com todas as variantes de Nef e até com a proteína celular CD4 (3%, 1%, 0% e 2% respectivamente), resultados que viriam a confirmar dados da literatura no sentido que esta proteína cumpriria papéis subsidiários no processo de degradação de CD4 mediada por Nef, como por exemplo; aumentando a acidificação interna de endossomos, organelas vesiculares de eucariotos, entre outros [154], [155]. Por sua vez, a literatura também confirma estes resultados de baixa, ou nenhuma, interação entre estas proteínas, sendo que já foi descrito que a proteína VIH aumenta a força de ligação entre a proteína AP2 μ e CD4 [157], [112], [158]. Estes dados vêm colaborar na idéia de que mesmo as proteínas celulares não tendo interação direta com os diferentes alelos da proteína Nef, elas podem

ter importante papel no processo e estar interagindo de forma indireta na degradação de CD4, mediada pela proteína Nef do HIV-1.

	CD4	hTEII	V1H	β COP	Ap1 σ	Ap2 μ	Ap2 σ
CD4	75%	2,10%	1,50%	32,85%	16,15%	50,40%	0,45%
Nef NA7	38,55%	89%	3,20%	30,20%	15,10%	45,15%	0,80%
Nef 239	13%	0,25%	0,55%	5,00%	1,90%	88,95%	0,05%
Nef NL4.3	21,55%	63,9%	0,15%	12,15%	2,8%	15,95%	0,15%

Tabela 4.1. Porcentagem de interações entre as proteínas celulares, os alelos de Nef e a proteína CD4, determinados por FRET. Células 293T foram co-transfectadas com plasmídeos codificando CD4 ou os alelos; NA7, Mac239 e NL4.3 da proteína Nef fusionados a proteína *repórter* YFP e as diferentes proteínas celulares fusionadas a proteína *repórter* CFP, juntamente com os plasmídeos CFP fusionado a YFP, como controle positivo (100% de FRET), e os plasmídeos codificando o gene CFP com plasmídeos codificando o gene YFP por separado, como controles negativos (0% de FRET), (dados não mostrados). Após 36 horas a frequência relativa de energia transferida (FRET) foi quantificada por citometria de fluxo. E a intensidade de energia transferida entre as proteínas foi calculada em porcentagem de interação entre elas.

Em resumo, partir da interpretação dos resultados obtidos pela técnica de FRET pode-se fazer as seguintes considerações:

- a) Há necessidade de repetir os ensaios para cada proteína na presença, se não de todos os outros possíveis parceiros de Nef, de pelo menos daqueles que participariam como co-fatores, aumentando ou diminuindo a interação entre uma dada proteína celular e Nef, em uma determinada etapa do mecanismo de degradação de CD4 em estudo. O mesmo conceito se aplica a avaliação das interações das proteínas celulares e o receptor CD4, sendo necessária a presença dos diferentes alelos de Nef. Isto nos permitiria não somente a análise da interação entre uma dada proteína com um dado alelo de Nef, mas também avaliar a possibilidade de interação das proteínas celulares entre si e seus efeitos.
- b) Há a importância de confirmar os resultados obtidos com células 293T, em linhas de células T como as células Jurkat, células que expressam naturalmente a molécula CD4 e outras proteínas de membrana associadas, como as proteínas Hck e Lck, responsáveis por manter a conformação da porção N-terminal de Nef e pela estabilidade da ligação de Nef na membrana celular. Fatores estes importantes para ter uma real idéia

da interação de cada proteína celular com Nef e a participação de cada proteína celular no mecanismo de Nef na modulação de CD4.

4.4. Análise de co-localização das proteínas celulares por microscopia confocal

Posteriormente e com o objetivo de avaliar as consequências fisiológicas da interação das diferentes proteínas celulares com os alelos de Nef no que diz respeito a localização celular de cada proteína, foram realizados experimentos de microscopia confocal. Dessa forma células 293T foram co-transfectadas com vetores codificando as proteínas CD4, *Nef* NA7 e *Nef* Mac 239, fusionadas a fluorescência YFP, conjuntamente com cada proteína celular de interesse, fusionadas com a fluorescência CFP. Os experimentos realizados com a variante NL43 da proteína Nef não foram incluídos por ter apresentado um excessivo “*background*” impossibilitando a captura da imagem, ajuste de intensidade, e conseqüentemente não permitindo uma correta interpretação dos resultados. Após 48 horas da transfecção, as células foram colhidas, lavadas com PBS+2%SFB, fixadas com Mowiol e analisadas em ensaios de co-localização por microscopia confocal. As fluorescências expostas nas imagens (vermelho e azul), não são correspondentes às fluorescências dos genes repórteres fusionados as diferentes proteínas celulares (YFP e CFP), já que os canais utilizados para evidenciar as fluorescências foram escolhidos pelos níveis de nitidez que estes propiciavam na identificação da localização da expressão das proteínas estudadas.

4.4.1. Caracterização da localização entre proteínas celulares e alelo Nef NA7 por microscopia confocal

Após análise dos experimentos de dupla marcação e localização, foi possível observar uma clara co-localização entre as proteínas celulares CD4, hTEII, AP2 μ e β COP e o alelo *Nef* NA7 (identificadas por setas), mas com certa variação na afinidade

apresentada por cada proteína celular com o alelo, o que demonstrou mudança na expressão da proteína hTEII (Figura 4.7).

Os baixos níveis de expressão da proteína CD4 quando expressada simultaneamente com a *Nef* NA7 em comparação aos níveis de expressão da proteína só, pode ser explicado pela degradação de CD4 por parte de *Nef* NA7, mesmo fenômeno observado nos experimentos de FRET.

Os ensaios de localização realizados com a proteína hTEII mostraram claramente uma mudança no padrão de distribuição após interação com o alelo *Nef* NA7 passando de uma localização citoplasmática para uma de membrana (indicado por seta). Se co-localizando com a proteína Nef, confirmando os grandes níveis de interação obtidos no experimento de FRET (Figura 4.3).

Em um nível bem mais baixo que o mostrado por hTEII, entretanto significativo, a proteína AP2 μ também apresentou interação com o alelo NA7. No entanto, diferentemente de hTEII, esta proteína não mostrou nenhum tipo de mudança de localização, ao menos perceptível, de expressão endógena na presença ou ausência do alelo NA7.

A proteína celular β COP também interage, mesmo que fracamente, com a proteína *Nef* NA7. Este nível de interação também é observado nos ensaios de FACS/FRET, (Figura 4.3), entretanto o nível de interação entre esta proteína celular e o alelo não foi suficientemente elevado ao ponto desta ter sua localização alterada, como observado na figura 4.7.

Por outro lado, as proteínas celulares VIH e AP2 σ , não mostraram nenhuma mudança na presença ou ausência do alelo *Nef* NA7. Esta ausência de interação, também foi previamente evidenciada no experimento da figura 4.3, onde por FRET estas proteínas mostram não interagir diretamente com *Nef* NA7. Este segundo resultado colabora com a idéia de que a proteína celular VIH, tenha sua contribuição para a modulação do receptor CD4, mediado por Nef, de forma indireta. Enquanto que no caso da proteína heterotetramérica AP2 subunidade σ , serviu como controle negativo, mostrando que a única subunidade que esta envolvida diretamente na degradação de CD4 mediada por Nef, seria a proteína adaptadora 2 subunidade μ .

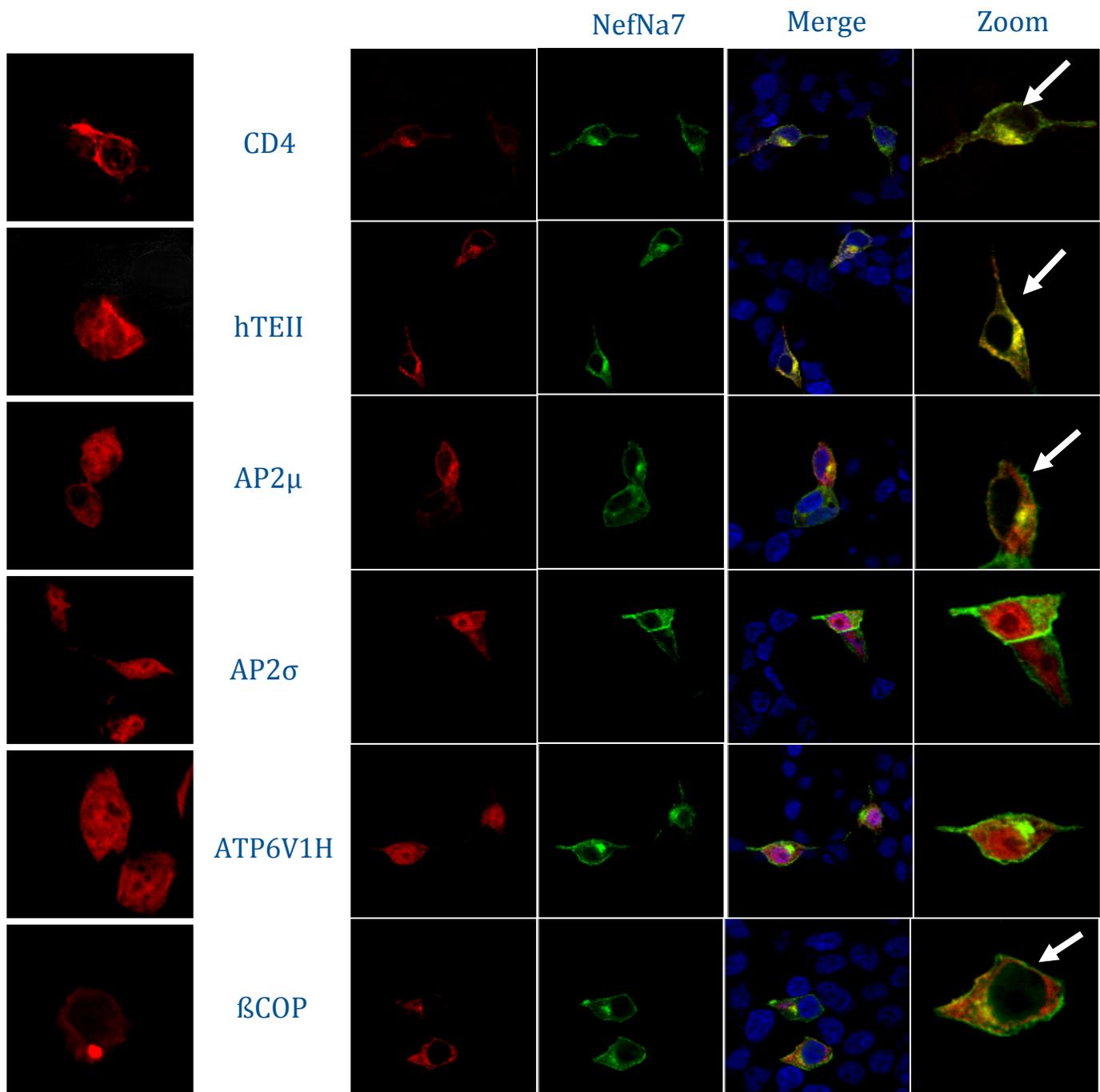


Figura 4.7. Caracterização da localização celular das proteínas celulares parceiras de Nef na presença da variante Nef NA7 do HIV-1. Células 293T foram co-transfectadas com vetores expressando as diferentes proteínas celulares fusionadas a proteína CFP conjuntamente com a proteína Nef NA7 fusionada a YFP. Após 36 horas de transfecção as células foram fixadas com mowiol e analisadas por microscopia confocal. A figura mostra diferentes níveis de interações entre a proteína Nef NA7 e as proteínas celulares CD4, hTEII, AP2 μ e β COP. Sendo que a proteína hTEII foi a única que mostrou uma mudança do lugar de expressão endógeno e passou a se concentrar mais nas regiões onde o alelo Nef NA7 era expresso.

4.4.2. Caracterização da localização entre proteínas celulares e alelo Nef Mac239 por microscopia confocal

Os níveis de co-localização das proteínas celulares também foram avaliados em presença da versão de Nef presente em primatas não humanos, a cepa Mac239. Para isto foram co-transfectadas células 293T com as diferentes proteínas celulares fusionadas a CFP, juntamente com o alelo de Nef Mac239 de SIV (figura 4.8). Diferentemente do alelo *Nef* Na7 presente em humanos, o alelo presente em símios, *Nef* Mac239, apresentou diferentes padrões de interação com as proteínas celulares.

Uma importante diferença, entre a interação do alelo NA7 com as proteínas celulares e a interação do alelo Mac239 com as proteínas celulares, foi o nível de interação entre este alelo e a proteína AP2 μ . Além de esta proteína ter interagido em níveis mais altos com *Nef* Mac239 do que com *Nef* NA7, também mostrou ter uma alta afinidade com o *Nef* Mac239 sofrendo um deslocamento, ou mudança na localização intracelular, do citoplasma para a membrana celular, região onde se localiza o alelo Mac239), (vide setas da figura 4.8). Fenômeno não observado com o alelo *Nef* NA7. Estes resultados também foram confirmados por FRET no ensaio da figura 4.5.

Contudo as outras proteínas celulares como; CD4, hTEII, AP1 σ , AP2 σ , V1H e β COP, não mostraram relevante interação com o alelo de Nef, Mac239, ao contrário de *Nef* NA7 que havia mostrado interação principalmente com CD4, hTEII e β COP.

Por outro lado a falta de interação percebida entre CD4 e Mac239 pode ser atribuída a quase ausência da expressão do receptor CD4 na célula, já que é possível observar uma queda drástica no nível de expressão que o que quando comparado com células transfectadas apenas com CD4 (controle). Este mesmo resultado, também é encontrado no ensaio da figura 4.5, o que vem colaborar na idéia de que a modulação de CD4, mediada por este alelo, é tão intensa que os níveis de CD4 caem por serem modulados rapidamente por este alelo.

Estes resultados mostram quais entre as proteínas celulares teriam maior participação direta na modulação de CD4, mediada pelos diferentes alelos da proteína Nef. Mostram também, que a diferença na sequência de aminoácidos dos alelos pode estar relacionada na virulência dos mesmos.

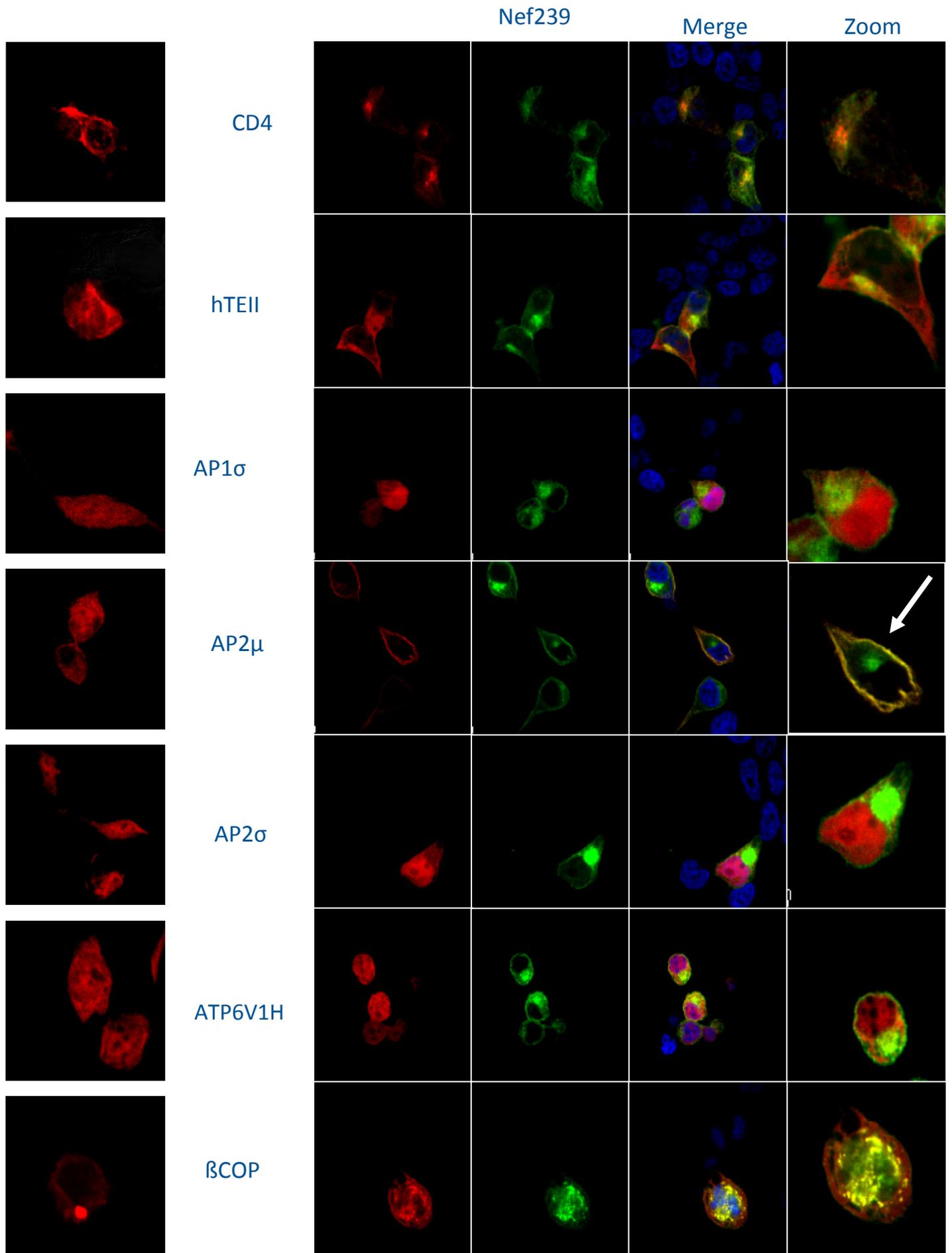


Figura 4.8. Caracterização da localização celular das proteínas celulares parceiras de Nef na presença da variante Nef Mac239 de SIV. Células 293T foram co-transfectadas com vetores expressando as diferentes proteínas celulares fusionadas a proteína CFP conjuntamente com a proteína Nef Mac239 fusionada a YFP. Após 36 horas de transfecção as células foram fixadas com mowiol e analisadas por microscopia confocal. A proteína celular AP2 μ foi a única que mostrou interação com o alelo da proteína Nef, Mac239. Esta se mostrou com um nível de afinidade, com o alelo, tão alto que teve a localização endógena modificada para onde o alelo se concentrava.

4.4.3. Caracterização da localização entre proteínas celulares e o receptor CD4 por microscopia confocal

A mesma forma que realizado nas análise por FRET foram avaliado o nível e localização das interações entre as proteínas celulares e o próprio receptor celular CD4. Para tanto, as diferentes proteínas celulares, fusionadas a proteína de fluorescência CFP, foram transfectadas juntamente com a proteína celular CD4, fusionada a proteína de fluorescência YFP, e analisadas por microscopia confocal (Figura 4.9).

De uma forma geral as proteínas celulares não aparentaram mudanças em suas localizações intracelulares. Entretanto, os altos níveis de interação entre as moléculas de proteína CD4 com ela mesma, e já observada nos ensaios de FRET, foram confirmados por microscopia confocal. O que por sua vez viria a confirmar a hipótese de que o alto nível de sinal de FRET captado seja devido pela extrema proximidade das moléculas como visto no “*zoom*”, indicado com seta na figura 4.9, da primeira linha (CD4+CD4).

Da mesma forma podemos analisar o resultado da interação entre as proteínas celulares AP2 μ e CD4, as quais mostraram uma interação elevada de FRET. Pode-se notar que isto se dá pelo fato de que estas proteínas se encontram também na membrana celular, contudo a proteína AP2 μ não sofre mudança na sua distribuição no citoplasma da célula, mas sim as porções que se encontram na região da membrana plasmática interagem com as moléculas de CD4.

Outra proteína que mesmo sem mudar sua localização endógena mostrou níveis significativos de interação com o receptor CD4 foi a proteína celular β COP. Da mesma forma que em AP2 μ , a proteína é expressa em toda região citoplasmática, tendo suas porções que são expressas próximas a membrana celular interagindo com a molécula de CD4. No entanto, a proteína celular β COP não mostrou mudar sua localização endógena por interagir com a proteína CD4.

Entretanto, nem todas as proteínas que são expressas no citoplasma da célula tiveram algum tipo de interação com a molécula de CD4, hTEII, AP1 σ , AP2 σ e V1H, embora terem mostrado uma distribuição semelhante às proteínas AP2 μ e β COP, não apresentaram nenhum tipo de interação direta com a proteína celular CD4.

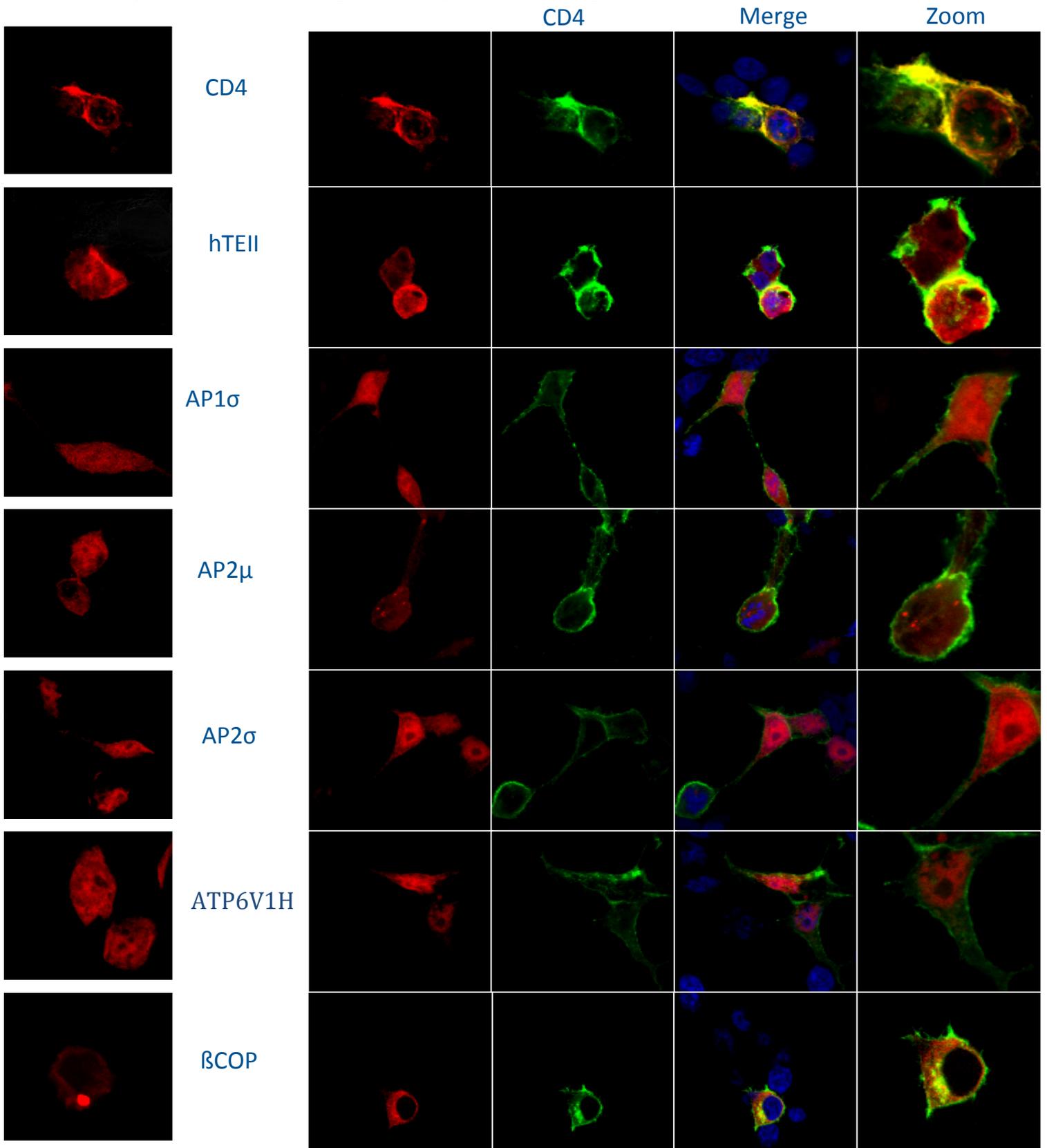


Figura 4.9. Caracterização da localização celular das proteínas celulares parceiras de Nef na presença do receptor de superfície celular CD4. Células 293T foram co-transfectadas com vetores expressando as diferentes proteínas celulares fusionadas a proteína CFP conjuntamente com o receptor celular CD4 fusionado a YFP. Após 36 horas de transfecção as células foram fixadas com mowiol e analisadas por microscopia confocal. As proteínas CD4, AP2 μ e β COP, mostraram interagir com CD4. No entanto não foi observado nenhum tipo de mudança na localização endógena destas proteínas a fim de interagirem com a molécula de CD4.

Os resultados obtidos pela microscopia confocal encontram-se resumidos na tabela 2.

	CD4	Nef-Mac239	Nef-NA7
CD4	++++/?	?/++++	?/++++
hTEII	-/-	-/+	++++/++++
AP1 σ	-/-	-/-	-/-
AP2 μ	++/-	++++/++++	++/-
AP2 σ	-/-	-/-	-/-
V1H	-/-	-/-	-/-
β -COP	++/-	-/-	++/-

Tabela 4.2. Níveis de interação/co-localização observados pela microscopia confocal. Na presente tabela encontram-se resumidos os resultados, com os níveis de interação/co-localização, observados por ensaios em microscopia confocal, entre as proteínas celulares e o receptor CD4, e os alelos de Nef (NA7 e Mac239). O sinal (+) indica a intensidade de interação, ou co-localização, entre as proteínas; o sinal (-) indica ausência de interação ou co-localização; e o sinal (?), usado para indicar incerteza do nível de interação entre os alelos da proteína Nef (NA7 e Mac239) e o receptor CD4, dado os baixos níveis de expressão do receptor celular.

4.5. Avaliação do bloqueio das proteínas celulares induzido por RNA de interferência

4.5.1. Construção dos vetores codificando RNA de interferência.

Como descrito, nos materiais e métodos, a partir do cDNA de cada proteína celular de interesse foram desenhados os oligonucleotídeos para a síntese dos correspondentes RNAi utilizando-se o programa siDESING. Posteriormente cada par de oligonucleotídeo foi anelado e clonado no vetor pSUPER-EGFP-NEO e as sequências dos diferentes shRNA foram confirmadas por sequenciamento (dados não mostrados).

Com objetivo de obter vetores lentivirais que expressem os genes EGFP-NEO sob o controle do promotor PGK, o fragmento contendo as sequências PGK-EGFP-NEO presentes no vetor pSUPER foi clonado no vetor lentiviral pNL-SIN-CMV-BLR utilizando-se as enzimas de restrição *Bam*H I e *Xho* I obtendo o vetor pNL-SIN-PGK-EGFP-NEO. Finalmente os diferentes shRNA sob o controle do promotor H1 foram

clonados no vetor lentiviral pNL-SIN-PGK-EGFP-NEO utilizando-se as enzimas de restrição *Xba* I e *Cla* I obtendo-se o vetor pNL-SIN-EGFP-NEO-RNAi, como descrito nos materiais e métodos (Figuras 3.2 e 3.3).

A confirmação da clonagem dos diferentes RNAs foi obtidas por digestão dos diferentes vetores lentivirais com as enzimas de restrição *Xba* I e *Cla* I o que permitiu evidenciar a liberação de um fragmento de aproximadamente 300 pb correspondente às sequências que codificam o promotor H1 mais o RNAi (Figura 4.10).

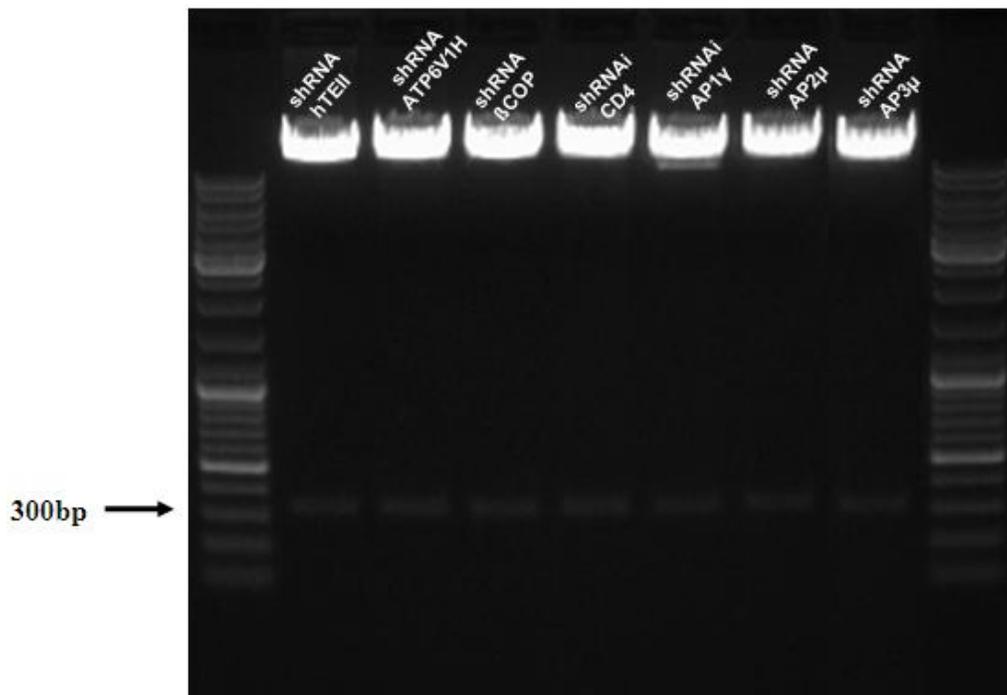


Figura 4.10. Confirmação da construção de vetores lentivirais codificando RNAs contra diferentes proteínas celulares. Os vetores lentivirais codificando os diferentes RNAs e os genes EGFP-NEO foram obtidos em duas etapas. Brevemente, o cassete PGK-EGFP-NEO presente no vetor pSUPER, foi clonado no vetor lentiviral pNL-SIN utilizando as enzimas *Xho* I e *Bam*H I. Finalmente os cassetes contendo os diferentes shRNA sob o controle do promotor H1 previamente clonados no PSUPER foram clonados no vetor lentiviral pNL-SIN-PGK-EGFP-NEO utilizando-se as enzimas *Cla* I e *Xba* I, obtendo o vetor pNL-SIN-EGFP-NEO-RNAi. A clonagem dos diferentes RNAs foi confirmada por digestão com *Xba* I e *Cla* I, observando-se o fragmento de aproximadamente 300pb, contendo as sequências do promotor H1 e o correspondente RNAi.

4.5.2. Silenciamento exógeno das proteínas celulares

Os níveis de inibição da expressão das diferentes proteínas celulares foram detectados por Citômetria de Fluxo, após co-transfecção de células 293T com os vetores codificando as diferentes proteínas celulares fusionados a proteína “repórter” CFP e o

vetor lentiviral codificando o correspondente RNAi, ou alternativamente com o vetor lentiviral vazio.

A figura 4.11 mostra os resultados dos experimentos de inibição expressos como percentagem relativa de inibição, tomando como referencia de nível de expressão de 100% aqueles valores obtidos em células transfectadas com o vetor codificando a proteína de fusão e o vetor lentiviral vazio. Dessa forma foi possível observar um forte bloqueio da expressão das proteínas celulares hTEII, VIH, β -COP, Ap2 μ e CD4 (23%, 22%, 12%, 0,5%, 22%, respectivamente). Entretanto a expressão das proteínas Ap1 σ e Ap2 σ , as quais foram transfectadas juntamente com os vetores que codificam shRNA para AP1 γ e Ap2 μ respectivamente, não foram bloqueadas eficientemente, demonstrando a especificidade dos RNAs utilizados.

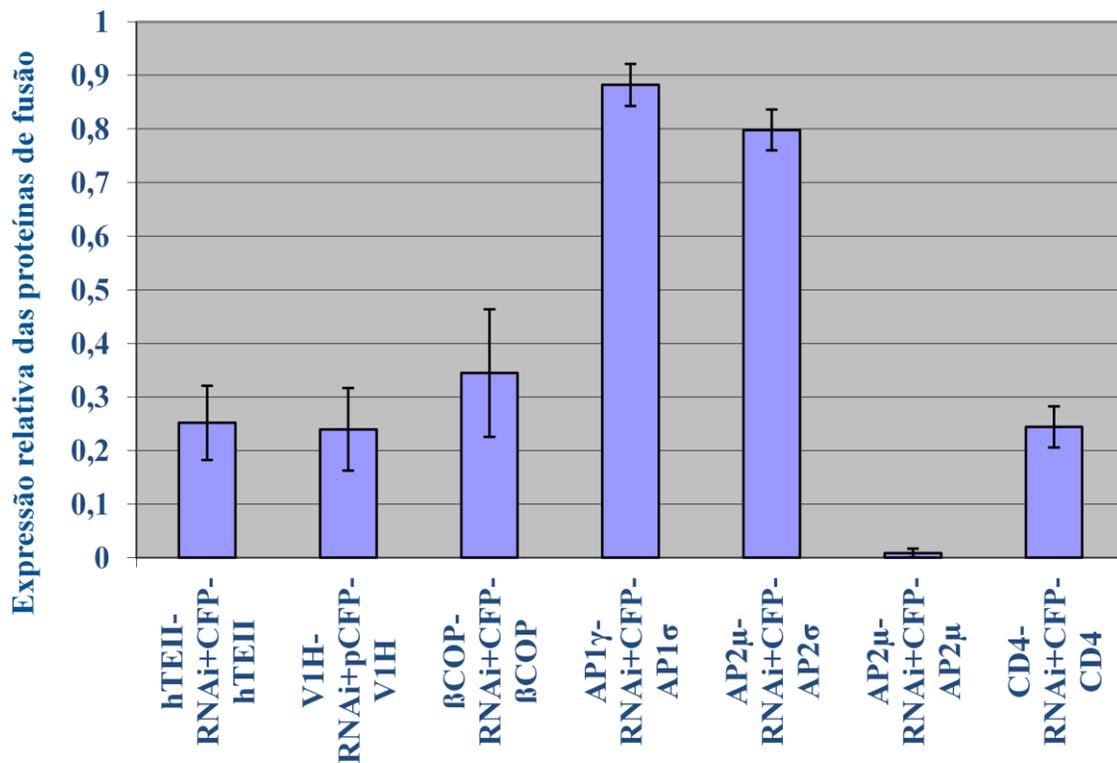


Figura 4.11. Bloqueio da expressão de proteínas celulares fusionadas a CFP mediante o uso de RNAi. Células 293T foram transfectadas com vetores codificando as diferentes proteínas celulares de interesse fusionadas a proteína fluorescente CFP ou conjuntamente com os vetores lentivirais expressando RNAi específicos para cada proteína, assim como não específicos. 48horas após a transfecção a intensidade de fluorescência CFP foi determinada por Citometria de Fluxo.

4.6. Produção de partículas virais, infecção e superinfecção

4.6.1. Quantificação de p24

Após as partículas virais serem produzidas por co-transfecção em células 293T. O sobrenadante de cada poço foi recolhido, aproximadamente 1 mL, e deste estoque 10 µl foram utilizados para quantificação das partículas virais por ELISA.

Foi utilizado como controle positivo o vetor expressando a sequência do vírus HIV, cepa NL4.3, do tipo selvagem – “wild type”, este mostrou um alto nível da proteína p24 (proteína que constitui o nucleocapsídeo viral) no sobrenadante, o que indica a presença de partículas virais. Utilizando este primeiro resultado como parâmetro, foi possível observar que o nível de p24 obtido no sobrenadante de todos os outros lentivirus transfectados alcançou níveis significativos.

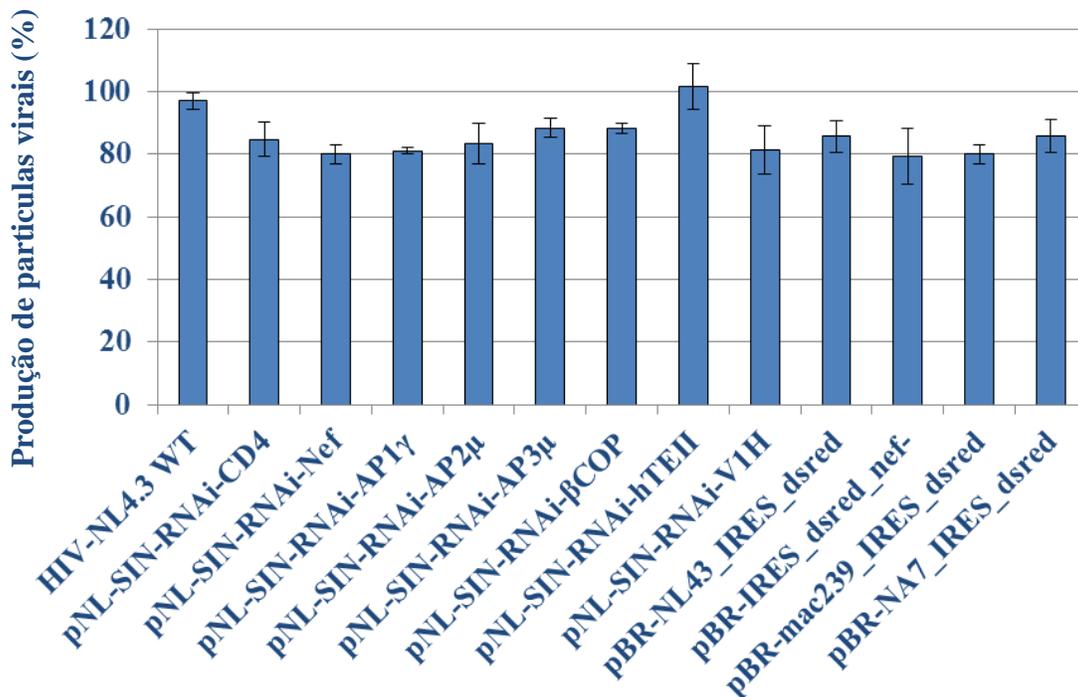


Figura 4.12. Quantificação de partículas virais codificando RNAs. As partículas virais para os diferentes vetores pNL-SIN ou vetores pBR foram produzidas por co-transfecção de células 293T com quatro tipos de vetores: o vetor lentiviral, os vetores de regulação da expressão viral e ativação transcricional juntamente com o vetor contendo o gene que codifica a glicoproteína VSVg. 48hs após a concentração de partículas virais foi estimada por quantificação da proteína p24 por ELISA (kit “HIV-1 p24 Antigen ELISA”).

4.6.2. Silenciamento endógeno das proteínas celulares

Com objetivo de avaliar a inibição da expressão endógena das proteínas celulares por meio dos vetores lentivirais, células da linha de linfócito T (Jurkat) foram transduzidas com partículas virais expressando os diferentes RNAsi. Brevemente células 293T foram co-transfectadas com os vetores lentivirais codificando os diferentes RNAsi juntamente com os vetores necessários para a expressão de proteínas virais envolvidas no empacotamento (pCMV Δ R8.9) e a glicoproteína do envelope do vírus da estomatite vesicular VSVg (pMDG). 48hs após transfecção os sobrenadantes celulares foram recolhidos e usados para a transdução de células Jurkat.

A eficiência da transdução foi avaliada por microscopia de fluorescência 72hs após a transdução e posteriormente as células GFP positivas que apresentaram a maior expressão foram separadas das GFP negativas por meio de “*sorting*” realizado em um aparelho de Citômetria de Fluxo FACS ARIA. Finalmente a expressão das diferentes proteínas celulares foi avaliada no lisado celular por meio de “*immunoblotting*” usando anticorpos específicos (Figura 4.13).

Foi possível observar a inibição completa, ou quase completa, da expressão das diferentes proteínas celulares na presença do RNAi. Confirmando a eficiência dos vetores lentivirais no bloqueio da expressão das diferentes proteínas celulares (Figura 4.13).

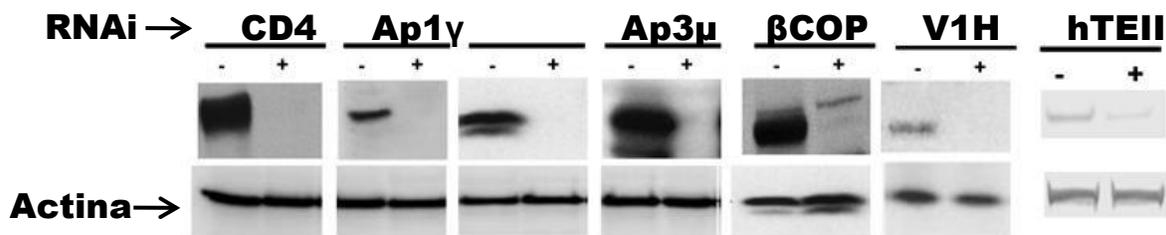


Figura 4.13. Inibição da expressão endógena por RNAi de proteínas celulares envolvidas na degradação de CD4 mediada por Nef. O bloqueio da expressão endógena das proteínas CD4, Ap1 γ , Ap2 μ , Ap3 μ , β -COP, V1H e hTEII, pelos diferentes RNAsi foi confirmada por *immunoblotting* de lisados provenientes de células Jurkat, transduzidas com os diferentes vetores lentivirais, usando anticorpos específicos.

4.6.3. Relevância fisiológica de proteínas celulares na degradação do receptor CD4 mediada por Nef

Num primeiro momento foi avaliada a participação das proteínas em estudo na reciclagem em condições fisiológicas da molécula CD4. Para isto a linha de células T, Jurkat E6.1 foram transduzidas com os sobrenadantes, recolhidos nos experimentos anteriores, contendo partículas virais codificando RNAs para cada uma das proteínas celulares em estudo e a proteína repórter GFP.

Quatro dias após a infecção, as células foram recuperadas e os níveis de expressão de CD4 foram determinados usando anticorpo específico anti-CD4-APC (fluorescência azul), e a média de intensidade de fluorescência (MFI) de CD4, foi determinado por FACS, apenas em células infectadas GFP positivas.

Para a realização da análise em um primeiro momento as células GFP positivas (células infectadas e expressando RNAi) foram selecionadas (colocadas em um “plot”) e posteriormente analisadas quanto a expressão da fluorescência APC. Os valores de MFI-APC obtidos de três experimentos independentes foram colocados em forma de gráficos em porcentagem, considerando 100% a media de valores de APC obtidos em células Jurkat transduzidas com o vetor lentiviral codificando apenas a proteína GFP (Figura 4.14).

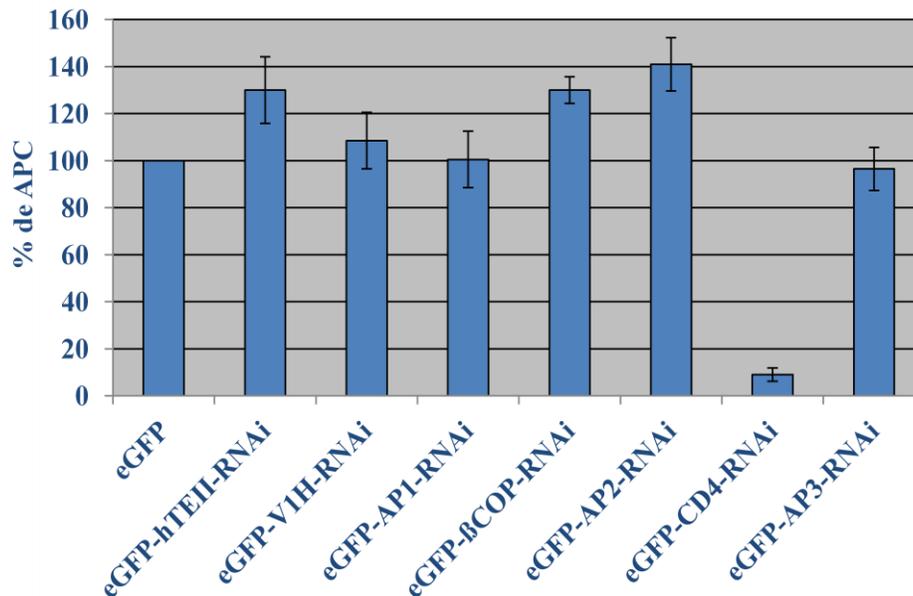


Figura 4.14. Níveis de expressão do receptor CD4 em células Jurkat transduzidas com vetores lentivirais expressando RNAi. Células Jurkat E6.1 foram transduzidas com partículas virais expressando RNAi para as diferentes proteínas celulares e após 96 horas, os níveis de CD4 foram determinados usando anticorpo específico (anti-CD4-APC), a media dos valores obtidos de três experimentos independentes

foram gratificados em percentagem, considerando 100% a media de valores de APC obtidos em Jurkat transduzidas com o vetor lentiviral codificando apenas a proteína GFP.

Os maiores níveis de expressão de CD4 foram obtidos em células transduzidas com vetores codificando RNAs para as proteínas hTE e AP2 μ (aumento de 30% e 41% respectivamente), mostrando claramente a participação destas proteínas no processo de internalização fisiológica da molécula CD4. Estes resultados vieram a confirmar resultados anteriores obtidos por nosso grupo, onde foi mostrado, em células 293T, o aumento de 60% na expressão de CD4 na presença do RNAi para hTEII [173].

Por outro lado o bloqueio da expressão da proteína β -COP, levou a um aumento de recircular, pelo gráfico foi mais de 30%. Já os níveis de expressão de CD4 não foram alterados em células transduzidas com vetores expressando RNAs para as proteínas AP1 γ , V1H, e AP3 μ .

Finalmente os níveis de expressão de CD4 foram diminuídos drasticamente em células transduzidas com vetores expressando RNAi específicos para este receptor (controle positivo).

Uma vez avaliada a participação de cada proteína na reciclagem fisiológica de CD4, foram realizados experimentos exploratórios para determinar a relevância fisiológica destas proteínas na degradação de CD4 no contexto da infecção viral.

Dessa forma células Jurkat E6.1 foram num primeiro momento transduzidas com os diferentes vetores lentivirais expressando os RNAi específicos para cada uma das proteínas celulares e após 24 horas essas mesmas células foram infectadas com vírus expressando dois diferentes alelos da proteína Nef, da cepa NL4.3 presente no HIV-1 e da cepa Mac239, presente no SIV, fusionados a proteína repórter dsRED (vetores no anexo).

Quatro dias após a infecção, os níveis de expressão de CD4 foram determinados em células duplo positivas (GFP + dsRed +) por FACS usando anticorpo específico anti-CD4-APC. (Figura 4.15).

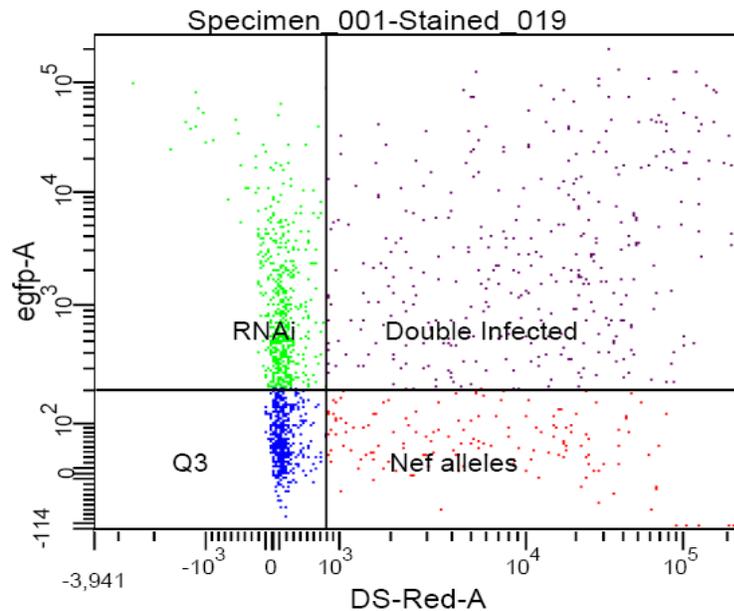


Figura 4.15. Plot correspondente às células transduzidas com vetor lentiviral-RNAi e infectada com HIV-1. Células Jurkat E6.1 foram transduzidas com partículas virais expressando RNAs e a proteína GFP e posteriormente infectadas com vírus expressando os alelos de Nef NL4.3 e Mac239 junto com a proteína repórter DsRed. Para análise o “plot” foi dividido em quatro quadrantes, não infectado (Q3); apenas transduzidas com os vetores lentivirais-RNAi ; apenas infectadas com os vírus expressando os alelos de Nef (NL4.3 e Mac 239) e as transduzidas e infectadas duplo positivas.

O “plot” acima exemplifica um ensaio colocando em evidência a dificuldade de se obter células duplo-positivas em número estatisticamente significativo, o que poderia ser devido a maior eficiência de transdução com vetores lentivirais (fluorescência verde egfp-A/canal FITC) que a obtida após infecção com vírus expressando os alelos de Nef (fluorescência vermelha DS-REd-A/canal PE). O baixo nível de infecção seria devido ao alto nível de estresse celular induzido pela transdução o que dificultaria a subsequente infecção e sobrevivência celular.

Os valores da média de intensidade de fluorescência de APC, correspondente aos níveis de CD4, no quadrante “*Double Infected*”, obtidos em presença dos diferentes RNAi com ou sem os alelos de Nef foram colocados em forma de gráficos (Figura 4.16).

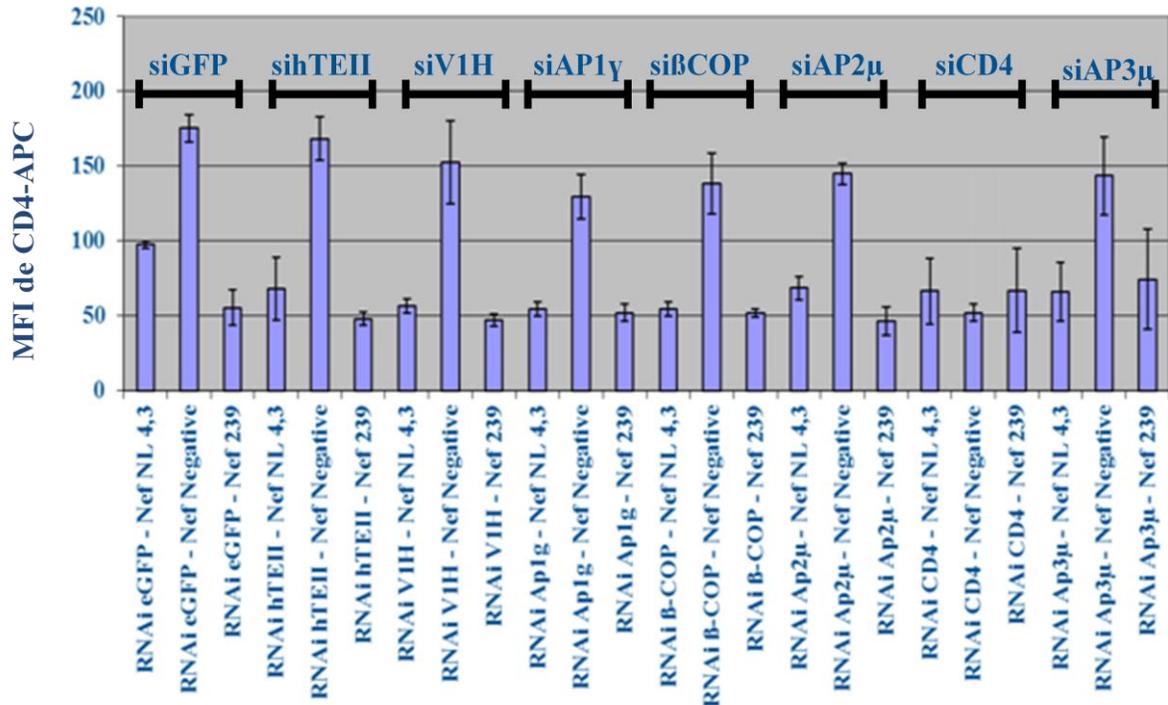


Figura 4.16. Média de Intensidade de Fluorescência CD4-APC em células Jurkat. Os níveis de MIF de CD4 foram determinados em células Jurkat transduzidas com vetores lentivirais expressando RNAi contra as diferentes proteínas celulares e posteriormente infectadas com vírus expressando os alelos de Nef NL4.3 e Mac239 fusionados a proteína DS-RED.

Neste experimento preliminar, embora não tenha sido possível observar os efeitos dos RNAs na expressão de CD4, por não ter sido possível obter níveis satisfatórios de infecção, nos permitiu confirmar a viabilidade desta abordagem experimental.

Uma provável explicação para a ausência de diferenças significativas nos níveis de expressão de CD4 nas células previamente transduzidas com vetores lentivirais seria a baixa eficiência no silenciamento da expressão gênica dos parceiros celulares de Nef, dado o curto lapso de tempo entre a transdução e infecção, 24 h, tempo que não seria suficiente para diminuir os níveis endógenos das proteínas celulares em estudo, dada a vida média de cada proteína. Baseados nestes primeiros resultados se faz necessário ajustar as condições experimentais, principalmente no que se refere ao aumento do tempo entre a transdução e a infecção com objetivo de permitir um eficiente silenciamento da expressão gênica e a recuperação das células a serem infectadas.

Uma abordagem alternativa e que esta em andamento em nosso laboratório, é o estabelecimento de linhas celulares com expressão constitutiva dos diferentes RNAs e

com níveis expressão próximos a 100% mediante seleção por resistência ao antibiótico neomicina ou seu análogo G418, gene presentes nos vetores lentivirais.

Capítulo 5. Conclusões e Perspectivas

5.1. Conclusões

As principais conclusões deste trabalho são resumidas a seguir:

- Foram construídos vetores para expressão de proteínas celulares envolvidas na degradação de CD4 dependente de Nef (hTEII; CD4; V1H; β -COP; AP1 σ ; AP2 μ e AP2 σ) assim como para os alelos de Nef: NL4.3; NA7 e Mac239, como proteínas de fusão com “repórteres” CFP/YFP.

- A interação entre proteínas celulares e os diferentes alelos da proteína Nef foram caracterizadas em células 293T pelas técnicas de FRET e Microscopia Confocal, obtendo-se os seguintes resultados:

a) As proteínas celulares mostraram diferentes níveis de interação com os alelos da proteína Nef NL4.3, NA7 e Mac239. As proteínas; hTEII, AP2 μ e β -COP, foram as que apresentaram maiores e significativos níveis de interação com os alelos NA7 e NL4.3, do HIV-1, sendo que com o alelo NA7 mostraram um nível de interação maior do que com o NL4.3. Já com o alelo Mac239 de SIV, AP2 μ mostrou um nível de interação muito elevado, ao contrário das outras proteínas celulares, que não evidenciaram interação com este alelo. Por outro lado, a proteína celular CD4 mostrou relevante interação apenas com as proteínas celulares AP2 μ e β -COP. Estes resultados mostraram claramente a necessidade de realizar os ensaios entre cada proteína celular/alelo de Nef/CD4 em presença das outras proteínas celulares, com o intuito de verificar uma possível participação destas em cada ensaio, assim como usar células de linhas T que expressem o receptor CD4 (como explicado em Resultados & Discussão).

b) Os valores de FRET resultantes dos experimentos de interação foram de uma maneira geral confirmados na microscopia confocal. Entretanto, nova informação foi obtida com estes experimentos, no que se refere a identificação de mudanças na localização endógena de certas proteínas celulares para regiões onde os alelos de Nef se localizavam. Claros exemplos são as proteína hTEII na presença do alelo NA7, e a proteína AP2 μ na presença do alelo Mac239.

- Vetores lentivirais codificando RNAs para as diferentes proteínas celulares envolvidas na degradação de CD4, assim como para os alelos de Nef foram construídos e

sua eficiência no bloqueio da expressão destas proteínas foi confirmada tanto pelas técnicas de “*immunoblotting*” quanto por citometria.

Experimentos preliminares foram realizados com o intuito de verificar as melhores condições experimentais na determinação da relevância fisiológica das diferentes proteínas celulares na degradação de CD4 mediada por Nef. Os resultados obtidos colocaram em evidência a necessidade de se aperfeiçoar o tempo para silenciamento da expressão endógena das diversas proteínas e permitir a recuperação celular após a transdução com os vetores lentivirais.

5.2 Perspectivas

Em base aos dados obtidos neste trabalho nos traçamos os seguintes objetivos:

1. Construir vetores de fusão e lentivirais que expressem RNAs para outras proteínas celulares também propostas como importantes no mecanismo de degradação de CD4 mediada por Nef como são as proteínas Epsin 15 e Dynamina 2,
2. Reavaliar os níveis de interação de cada proteína celular com os diferentes alelos de Nef em presença de outras proteínas celulares que possam influenciar ditas interações.
3. Realizar os experimentos acima descritos em células de linha T Jurkat. Determinar os níveis de interação de todos os possíveis parceiros celulares como o alelo da cepa SF2, e realizar experimentos de microscopia confocal com o alelo NL4.3.
4. Estabelecer linhas de células Jurkat que expressem constitutivamente os RNAs contra todas as proteínas celulares mediante seleção com antibiótico.
5. Avaliar a degradação de CD4 pelos diferentes alelos de Nef em linhas celulares expressando constitutivamente RNAs contra as diferentes proteínas celulares.
6. Determinar a relevância fisiológica das diferentes proteínas celulares na degradação de CD4 mediada pelos diferentes alelos de Nef em células de sangue periférico e infectadas com diferentes cepas de HIV-1.

Referências Bibliográficas:

1. *Levy, J.A., Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. Microbiol Rev, 1993. 57(1): p. 183-289.*
2. *Gallo, R.C., Historical essay. The early years of HIV/AIDS. Science, 2002. 298(5599): p. 1728-30.*
3. *Prusiner, S.B., Historical essay. Discovering the cause of AIDS. Science, 2002. 298(5599): p. 1726.*
4. *UNAIDS, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, G. Report, Editor. 2009.*
5. *Regenmortel, v., Virus Taxonomy. Seventh Report of International Comitte on Taxonomy of Viruses, ed. A. Press. 2000, San Diego: Elsevier.*
6. *Wigg, Vírus da imunodeficiência humana. Introdução à Virologia Humana, ed. G. Koogan. 2002, Rio de Janeiro.*
7. *Gallo, R.C. and L. Montagnier, Historical essay. Prospects for the future. Science, 2002. 298(5599): p. 1730-1.*
8. *Votteler, Human Immunodeficiency Viruses: Molecular Biology, in Desk Encyclopedia of General Virology, A. Press, Editor. 2008: San Diego.*
9. *Baltimore, D., RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. Nature, 1970. 226(5252): p. 1209-11.*
10. *Temin, H.M. and S. Mizutani, RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature, 1970. 226(5252): p. 1211-3.*
11. *Morgan, D.A., F.W. Ruscetti, and R. Gallo, Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. Science, 1976. 193(4257): p. 1007-8.*
12. *Hinuma, Y., et al., Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(10): p. 6476-80.*

13. *Montagnier L, C.J., Barré-Sinoussi F, Chamaret S, Gruest J, Nugeyre M, Rey F, Dauguet C, Axler-Blin C, Brun-Vezinet F, Rouzi-oux C, Saimot GA, Rozenbaum W, Gluckman JC, Klatzman D, Vilmer E, Griscelli C, Foyer-Gazengel C, Brunet JB, A new human T-lympho-tropic retrovirus: Characterization and possible role in lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndromes, ed. C.S.H.-b. Laboratory. 1984, New York.*
14. *Montagnier, L., Historical essay. A history of HIV discovery. Science, 2002. 298(5599): p. 1727-8.*
15. *Levy, J.A., HIV and the pathogenesis of AIDS. Washington DC, 1998.*
16. *Saúde, M. 2011 [cited 2011].*
17. *Yerly, S., et al., Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. Lancet, 1999. 354(9180): p. 729-33.*
18. *Furtado, M.R., et al., Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. N Engl J Med, 1999. 340(21): p. 1614-22.*
19. *De Clercq, E., Antiviral drugs in current clinical use. J Clin Virol, 2004. 30(2): p. 115-33.*
20. *Cann, A.J., Principles of Molecular Virology, ed. Elsevier. Vol. 4^a ed. 2005, Oxford.*
21. *Greene, W.C., The brightening future of HIV therapeutics, ed. N. Immunology. Vol. 5. 2004. p.867-71.*
22. *Carter, J.B.S., V.A., Virology : principles and applications, ed. J.W.S. Ltd. 2007, Cichester, Inglaterra.*
23. *Flint, S.J.E., L.W.; Krug R.M.; Racaniello, V.R.; Skalka, A.M., Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control, ed. E.A. Press. 2004.*
24. *Malim, M.H., APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. 364(1517): p. 675-87.*
25. *Fletcher, T.M., 3rd, et al., Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV(SM). EMBO J, 1996. 15(22): p. 6155-65.*

26. *Guyader, M., et al., VPX mutants of HIV-2 are infectious in established cell lines but display a severe defect in peripheral blood lymphocytes. EMBO J, 1989. 8(4): p. 1169-75.*
27. *Pancio, H.A., N. Vander Heyden, and L. Ratner, The C-terminal proline-rich tail of human immunodeficiency virus type 2 Vpx is necessary for nuclear localization of the viral preintegration complex in nondividing cells. J Virol, 2000. 74(13): p. 6162-7.*
28. *Yu, X.F., et al., The vpx gene of simian immunodeficiency virus facilitates efficient viral replication in fresh lymphocytes and macrophage. J Virol, 1991. 65(9): p. 5088-91.*
29. *Larder, B.R., D.; Vella, S., HIV Resistance and Implications for Therapy, ed. M. Inc. Vol. 2^a ed. 2001, Atlanta.*
30. *Göttlinger, H.G., HIV-1 Gag: a Molecular Machine Driving Viral Particle Assembly and Release, in HIV Sequence Compendium, F.B. Kuiken C, Hahn B, Marx P, McCutchan F, Mellors JW, Wolinsky S, Korber B., Editor. 2001, Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory. p. pp. 2-28.*
31. *Moore, J.P. and R.W. Doms, The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(19): p. 10598-602.*
32. *Miller, R.J., et al., Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. J Virol, 2000. 74(16): p. 7187-95.*
33. *Kirchhoff, F., et al., Sequence variations in human immunodeficiency virus type 1 Nef are associated with different stages of disease. J Virol, 1999. 73(7): p. 5497-508.*
34. *Margottin, F., et al., A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. Mol Cell, 1998. 1(4): p. 565-74.*
35. *Yu, X., et al., Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. Science, 2003. 302(5647): p. 1056-60.*
36. *Hrecka, K., et al., Lentiviral Vpr usurps Cul4-DDB1[VprBP] E3 ubiquitin ligase to modulate cell cycle. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(28): p. 11778-83.*

37. Schubert, U., et al., *The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. J Virol*, 1996. 70(2): p. 809-19.
38. Neil, S.J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. Nature*, 2008. 451(7177): p. 425-30.
39. Van Damme, N., et al., *The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. Cell Host Microbe*, 2008. 3(4): p. 245-52.
40. Andersen, J.L. and V. Planelles, *The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis. Curr HIV Res*, 2005. 3(1): p. 43-51.
41. Le Rouzic, E. and S. Benichou, *The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. Retrovirology*, 2005. 2: p. 11.
42. Holmes, R.K., et al., *APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation. Comparisons with APOBEC3G. J Biol Chem*, 2007. 282(4): p. 2587-95.
43. Soros, V.B., W. Yonemoto, and W.C. Greene, *Newly synthesized APOBEC3G is incorporated into HIV virions, inhibited by HIV RNA, and subsequently activated by RNase H. PLoS Pathog*, 2007. 3(2): p. e15.
44. Dimmock NJ, E.A., Leppard KN, *Introduction to modern virology. 6^a ed. 2007, Malden, EUA: Blackwell Publishing.*
45. Janeway CA, T.P., Walport M, Shlomchik M., *O sistema imune na saúde e na doença, in Imunobiologia. 2004, Artmed: São Paulo.*
46. Milich, L., B. Margolin, and R. Swanstrom, *V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. J Virol*, 1993. 67(9): p. 5623-34.
47. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. Science*, 1996. 272(5263): p. 872-7.
48. Clapham, P.R. and A. McKnight, *Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. J Gen Virol*, 2002. 83(Pt 8): p. 1809-29.

49. *Spijkerman, I.J., et al., Lower prevalence and incidence of HIV-1 syncytium-inducing phenotype among injecting drug users compared with homosexual men. AIDS, 1995. 9(9): p. 1085-92.*
50. *Franke, E.K., H.E. Yuan, and J. Luban, Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. Nature, 1994. 372(6504): p. 359-62.*
51. *Schaeffer, E., R. Geleziunas, and W.C. Greene, Human immunodeficiency virus type 1 Nef functions at the level of virus entry by enhancing cytoplasmic delivery of virions. J Virol, 2001. 75(6): p. 2993-3000.*
52. *Ohagen, A. and D. Gabuzda, Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. J Virol, 2000. 74(23): p. 11055-66.*
53. *Chen, H., S.Q. Wei, and A. Engelman, Multiple integrase functions are required to form the native structure of the human immunodeficiency virus type 1 intasome. J Biol Chem, 1999. 274(24): p. 17358-64.*
54. *Miller, M.D., C.M. Farnet, and F.D. Bushman, Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. J Virol, 1997. 71(7): p. 5382-90.*
55. *Fackler, O.T., et al., Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions. Mol Cell, 1999. 3(6): p. 729-39.*
56. *Pulkkinen, K., et al., Nef associates with p21-activated kinase 2 in a p21-GTPase-dependent dynamic activation complex within lipid rafts. J Virol, 2004. 78(23): p. 12773-80.*
57. *Bushman, F., A new cellular system opposing HIV infection: implications for gene transfer? Mol Ther, 2002. 6(4): p. 441-2.*
58. *Zennou, V., et al., HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. Cell, 2000. 101(2): p. 173-85.*
59. *Lodish, H.B., A.; Maturaid, P.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Zipursky, S.L. & Darnell, J., Molecular Cell Biology. Vol. 6th. 2005, New York: WH Freeman and Company.*
60. *Yang, Z., et al., The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. Nature, 2001. 414(6861): p. 317-22.*

61. *Powell, D.M., et al., HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(3): p. 973-8.*
62. *Pornillos, O., et al., HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. J Cell Biol, 2003. 162(3): p. 425-34.*
63. *Hammonds, J., et al., Gp120 stability on HIV-1 virions and Gag-Env pseudovirions is enhanced by an uncleaved Gag core. Virology, 2003. 314(2): p. 636-49.*
64. *Kirchhoff, F., et al., Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. N Engl J Med, 1995. 332(4): p. 228-32.*
65. *Schindler, M., et al., Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. J Virol, 2003. 77(19): p. 10548-56.*
66. *Malim, M.H. and M. Emerman, HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. Cell Host Microbe, 2008. 3(6): p. 388-98.*
67. *Douek, D.C., et al., HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. Nature, 2002. 417(6884): p. 95-8.*
68. *Appay, V., et al., Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. Nat Med, 2002. 8(4): p. 379-85.*
69. *Iyer, S.B., et al., Quantitation of CD38 expression using QuantiBRITE beads. Cytometry, 1998. 33(2): p. 206-12.*
70. *Sereti, I., et al., In vivo expansion of CD4CD45RO-CD25 T cells expressing foxP3 in IL-2-treated HIV-infected patients. J Clin Invest, 2005. 115(7): p. 1839-47.*
71. *Emu, B., et al., Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. J Virol, 2005. 79(22): p. 14169-78.*

72. *Lapham, C.K., et al., Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. Science, 1996. 274(5287): p. 602-5.*
73. *Stevens, T.H. and M. Forgac, Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. 13: p. 779-808.*
74. *Guy, B., et al., HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. Nature, 1987. 330(6145): p. 266-9.*
75. *Foster, J.L., et al., Specific suppression of human CD4 surface expression by Nef from the pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac239open. Virology, 1994. 201(2): p. 373-9.*
76. *Cortes, M.J., F. Wong-Staal, and J. Lama, Cell surface CD4 interferes with the infectivity of HIV-1 particles released from T cells. J Biol Chem, 2002. 277(3): p. 1770-9.*
77. *Coleman, S.H., J.R. Day, and J.C. Guatelli, The HIV-1 Nef protein as a target for antiretroviral therapy. Expert Opin Ther Targets, 2001. 5(1): p. 1-22.*
78. *Chen, B.K., R.T. Gandhi, and D. Baltimore, CD4 down-modulation during infection of human T cells with human immunodeficiency virus type 1 involves independent activities of vpu, env, and nef. J Virol, 1996. 70(9): p. 6044-53.*
79. *Arganaraz, E.R., et al., Enhanced CD4 down-modulation by late stage HIV-1 nef alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication. J Biol Chem, 2003. 278(36): p. 33912-9.*
80. *Harper, M.E., et al., Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(3): p. 772-6.*
81. *Schwartz, O., et al., Human immunodeficiency virus type 1 Nef induces accumulation of CD4 in early endosomes. J Virol, 1995. 69(1): p. 528-33.*
82. *Mangasarian, A., et al., The HIV-1 Nef protein acts as a connector with sorting pathways in the Golgi and at the plasma membrane. Immunity, 1997. 6(1): p. 67-77.*

83. *Piguet, V., et al., Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. EMBO J, 1998. 17(9): p. 2472-81.*
84. *Le Gall, S., et al., Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. Immunity, 1998. 8(4): p. 483-95.*
85. *Craig, H.M., et al., Interactions of HIV-1 nef with the mu subunits of adaptor protein complexes 1, 2, and 3: role of the dileucine-based sorting motif. Virology, 2000. 271(1): p. 9-17.*
86. *Stevenson, M., et al., Envelope glycoprotein of HIV induces interference and cytolysis resistance in CD4+ cells: mechanism for persistence in AIDS. Cell, 1988. 53(3): p. 483-96.*
87. *Geleziunas, R., S. Bour, and M.A. Wainberg, Cell surface down-modulation of CD4 after infection by HIV-1. FASEB J, 1994. 8(9): p. 593-600.*
88. *Cohen, E.A., et al., Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. Nature, 1988. 334(6182): p. 532-4.*
89. *Newell, M.K., et al., Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. Nature, 1990. 347(6290): p. 286-9.*
90. *Wassmer, P., et al., Role of the L3T4-antigen in T cell activation. II. Inhibition of T cell activation by monoclonal anti-L3T4 antibodies in the absence of accessory cells. J Immunol, 1985. 135(4): p. 2237-42.*
91. *Tobiume, M., et al., Inefficient enhancement of viral infectivity and CD4 downregulation by human immunodeficiency virus type 1 Nef from Japanese long-term nonprogressors. J Virol, 2002. 76(12): p. 5959-65.*
92. *Potash, M.J. and D.J. Volsky, Viral interference in HIV-1 infected cells. Rev Med Virol, 1998. 8(4): p. 203-211.*
93. *Benson, R.E., et al., Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. J Exp Med, 1993. 177(6): p. 1561-6.*
94. *Bour, S., C. Perrin, and K. Strebel, Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity. J Biol Chem, 1999. 274(47): p. 33800-6.*

95. *Lama, J., A. Mangasarian, and D. Trono, Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. Curr Biol, 1999. 9(12): p. 622-31.*
96. *Marshall, W.L., et al., High level of surface CD4 prevents stable human immunodeficiency virus infection of T-cell transfectants. J Virol, 1992. 66(9): p. 5492-9.*
97. *Geyer, M. and B.M. Peterlin, Domain assembly, surface accessibility and sequence conservation in full length HIV-1 Nef. FEBS Lett, 2001. 496(2-3): p. 91-5.*
98. *Saksela, K., G. Cheng, and D. Baltimore, Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. EMBO J, 1995. 14(3): p. 484-91.*
99. *Arold, S.T. and A.S. Baur, Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. Trends Biochem Sci, 2001. 26(6): p. 356-63.*
100. *Geyer, M., O.T. Fackler, and B.M. Peterlin, Structure--function relationships in HIV-1 Nef. EMBO Rep, 2001. 2(7): p. 580-5.*
101. *Geyer, M., et al., Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein. J Mol Biol, 1999. 289(1): p. 123-38.*
102. *Kestler, H.W., 3rd, et al., Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. Cell, 1991. 65(4): p. 651-62.*
103. *Deacon, N.J., et al., Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. Science, 1995. 270(5238): p. 988-91.*
104. *Miller, M.D., et al., The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. J Exp Med, 1994. 179(1): p. 101-13.*
105. *Swigut, T., N. Shohdy, and J. Skowronski, Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. EMBO J, 2001. 20(7): p. 1593-604.*

106. Aiken, C., et al., *Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain.* *Cell*, 1994. 76(5): p. 853-64.
107. Schwartz, O., et al., *Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein.* *Nat Med*, 1996. 2(3): p. 338-42.
108. Stumptner-Cuvelette, P., et al., *HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(21): p. 12144-9.
109. Hrecka, K., et al., *Nef proteins from diverse groups of primate lentiviruses downmodulate CXCR4 to inhibit migration to the chemokine stromal derived factor 1.* *J Virol*, 2005. 79(16): p. 10650-9.
110. Greenberg, M.E., et al., *Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation.* *EMBO J*, 1997. 16(23): p. 6964-76.
111. Bresnahan, P.A., W. Yonemoto, and W.C. Greene, *Cutting edge: SIV Nef protein utilizes both leucine- and tyrosine-based protein sorting pathways for down-regulation of CD4.* *J Immunol*, 1999. 163(6): p. 2977-81.
112. Bresnahan, P.A., et al., *A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor.* *Curr Biol*, 1998. 8(22): p. 1235-8.
113. Geyer, M., et al., *Subunit H of the V-ATPase binds to the medium chain of adaptor protein complex 2 and connects Nef to the endocytic machinery.* *J Biol Chem*, 2002. 277(32): p. 28521-9.
114. Erdtmann, L., et al., *Two independent regions of HIV-1 Nef are required for connection with the endocytic pathway through binding to the mu 1 chain of AP1 complex.* *Traffic*, 2000. 1(11): p. 871-83.
115. Liu, L.X., et al., *Binding of HIV-1 Nef to a novel thioesterase enzyme correlates with Nef-mediated CD4 down-regulation.* *J Biol Chem*, 1997. 272(21): p. 13779-85.
116. Cohen, G.B., et al., *The human thioesterase II protein binds to a site on HIV-1 Nef critical for CD4 down-regulation.* *J Biol Chem*, 2000. 275(30): p. 23097-105.

117. Watanabe, H., et al., *A novel acyl-CoA thioesterase enhances its enzymatic activity by direct binding with HIV Nef. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 238(1): p. 234-9.*
118. Pizzato, M., et al., *Dynamin 2 is required for the enhancement of HIV-1 infectivity by Nef. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(16): p. 6812-7.*
119. Bentham, M., S. Mazaleyrat, and M. Harris, *The di-leucine motif in the cytoplasmic tail of CD4 is not required for binding to human immunodeficiency virus type 1 Nef, but is critical for CD4 down-modulation. J Gen Virol, 2003. 84(Pt 10): p. 2705-13.*
120. Cheng-Mayer, C., et al., *Differential effects of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. Science, 1989. 246(4937): p. 1629-32.*
121. Grzesiek, S., et al., *The solution structure of HIV-1 Nef reveals an unexpected fold and permits delineation of the binding surface for the SH3 domain of Hck tyrosine protein kinase. Nat Struct Biol, 1996. 3(4): p. 340-5.*
122. Gu, F. and J. Gruenberg, *ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the early endocytic pathway. J Biol Chem, 2000. 275(11): p. 8154-60.*
123. Jin, Y.J., et al., *HIV Nef-mediated CD4 down-regulation is adaptor protein complex 2 dependent. J Immunol, 2005. 175(5): p. 3157-64.*
124. Piguet, V., et al., *HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes. Nat Cell Biol, 2000. 2(3): p. 163-7.*
125. Preusser, A., et al., *Direct in vitro binding of full-length human immunodeficiency virus type 1 Nef protein to CD4 cytoplasmic domain. J Virol, 2001. 75(8): p. 3960-4.*
126. Rossi, F., A. Gallina, and G. Milanesi, *Nef-CD4 physical interaction sensed with the yeast two-hybrid system. Virology, 1996. 217(1): p. 397-403.*
127. Cohen, G.B., et al., *The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. Immunity, 1999. 10(6): p. 661-71.*

128. Craig, H.M., et al., *Analysis of the SH3-binding region of HIV-1 nef: partial functional defects introduced by mutations in the polyproline helix and the hydrophobic pocket. Virology, 1999. 262(1): p. 55-63.*
129. Eichholtz, T., et al., *Activation of protein kinase C accelerates internalization of transferrin receptor but not of major histocompatibility complex class I, independent of their phosphorylation status. J Biol Chem, 1992. 267(31): p. 22490-5.*
130. Gratton, S., et al., *Molecular analysis of the cytoplasmic domain of CD4: overlapping but noncompetitive requirement for lck association and down-regulation by Nef. J Immunol, 1996. 157(8): p. 3305-11.*
131. Janardhan, A., et al., *HIV-1 Nef binds the DOCK2-ELMO1 complex to activate rac and inhibit lymphocyte chemotaxis. PLoS Biol, 2004. 2(1): p. E6.*
132. Janvier, K., et al., *Nef-induced CD4 downregulation: a diacidic sequence in human immunodeficiency virus type 1 Nef does not function as a protein sorting motif through direct binding to beta-COP. J Virol, 2001. 75(8): p. 3971-6.*
133. Le Gall, S., et al., *Distinct trafficking pathways mediate Nef-induced and clathrin-dependent major histocompatibility complex class I down-regulation. J Virol, 2000. 74(19): p. 9256-66.*
134. Pelchen-Matthews, A., I.J. Parsons, and M. Marsh, *Phorbol ester-induced downregulation of CD4 is a multistep process involving dissociation from p56lck, increased association with clathrin-coated pits, and altered endosomal sorting. J Exp Med, 1993. 178(4): p. 1209-22.*
135. Costa, L.J., et al., *Nef binds p6* in GagPol during replication of human immunodeficiency virus type 1. J Virol, 2004. 78(10): p. 5311-23.*
136. Benichou, S., et al., *Physical interaction of the HIV-1 Nef protein with beta-COP, a component of non-clathrin-coated vesicles essential for membrane traffic. J Biol Chem, 1994. 269(48): p. 30073-6.*
137. Fauci, A.S., *The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. Science, 1988. 239(4840): p. 617-22.*
138. Janvier, K., et al., *HIV-1 Nef stabilizes the association of adaptor protein complexes with membranes. J Biol Chem, 2003. 278(10): p. 8725-32.*

139. Lee, C.H., et al., *A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. EMBO J, 1995. 14(20): p. 5006-15.*
140. Baur, A.S., et al., *The N-terminus of Nef from HIV-1/SIV associates with a protein complex containing Lck and a serine kinase. Immunity, 1997. 6(3): p. 283-91.*
141. Sandrin, V. and F.L. Cosset, *Intracellular versus cell surface assembly of retroviral pseudotypes is determined by the cellular localization of the viral glycoprotein, its capacity to interact with Gag, and the expression of the Nef protein. J Biol Chem, 2006. 281(1): p. 528-42.*
142. Jin, Y.J., et al., *Lysine 144, a ubiquitin attachment site in HIV-1 Nef, is required for Nef-mediated CD4 down-regulation. J Immunol, 2008. 180(12): p. 7878-86.*
143. Tokunaga, K., et al., *Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 virion entry by dominant-negative Hck. J Virol, 1998. 72(7): p. 6257-9.*
144. Robinson, M.S., *Adaptable adaptors for coated vesicles. Trends Cell Biol, 2004. 14(4): p. 167-74.*
145. Doray, B., et al., *Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. Science, 2002. 297(5587): p. 1700-3.*
146. Peden, A.A., et al., *Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins. J Cell Biol, 2004. 164(7): p. 1065-76.*
147. Traub, L.M., *Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection. J Cell Biol, 2003. 163(2): p. 203-8.*
148. Waguri, S., et al., *Visualization of TGN to endosome trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells. Mol Biol Cell, 2003. 14(1): p. 142-55.*
149. Marsh, M. and H.T. McMahon, *The structural era of endocytosis. Science, 1999. 285(5425): p. 215-20.*
150. Hirst, J., et al., *EpsinR: an ENTH domain-containing protein that interacts with AP-1. Mol Biol Cell, 2003. 14(2): p. 625-41.*

151. Wasiak, S., et al., *Enthoprotin: a novel clathrin-associated protein identified through subcellular proteomics. J Cell Biol*, 2002. 158(5): p. 855-62.
152. De Matteis, M.A. and A. Godi, *PI-loting membrane traffic. Nat Cell Biol*, 2004. 6(6): p. 487-92.
153. Odorizzi, G., C.R. Cowles, and S.D. Emr, *The AP-3 complex: a coat of many colours. Trends Cell Biol*, 1998. 8(7): p. 282-8.
154. Morel, N., *Neurotransmitter release: the dark side of the vacuolar-H⁺ATPase. Biol Cell*, 2003. 95(7): p. 453-7.
155. Smith, A.N., et al., *Revised nomenclature for mammalian vacuolar-type H⁺ - ATPase subunit genes. Mol Cell*, 2003. 12(4): p. 801-3.
156. Mandic, R., et al., *Negative factor from SIV binds to the catalytic subunit of the V-ATPase to internalize CD4 and to increase viral infectivity. Mol Biol Cell*, 2001. 12(2): p. 463-73.
157. Geyer, M., O.T. Fackler, and B.M. Peterlin, *Subunit H of the V-ATPase involved in endocytosis shows homology to beta-adaptins. Mol Biol Cell*, 2002. 13(6): p. 2045-56.
158. Garcia, J.V. and A.D. Miller, *Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. Nature*, 1991. 350(6318): p. 508-11.
159. Barlowe, C., *Traffic COPs of the early secretory pathway. Traffic*, 2000. 1(5): p. 371-7.
160. Aniento, F., et al., *An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. J Cell Biol*, 1996. 133(1): p. 29-41.
161. Daro, E., et al., *Inhibition of endosome function in CHO cells bearing a temperature-sensitive defect in the coatomer (COPI) component epsilon-COP. J Cell Biol*, 1997. 139(7): p. 1747-59.
162. Gu, F., et al., *Functional dissection of COP-I subunits in the biogenesis of multivesicular endosomes. J Cell Biol*, 1997. 139(5): p. 1183-95.
163. Beron, W., et al., *Recruitment of coat-protein-complex proteins on to phagosomal membranes is regulated by a brefeldin A-sensitive ADP-ribosylation factor. Biochem J*, 2001. 355(Pt 2): p. 409-15.

164. Botelho, R.J., et al., *Role of COPI in phagosome maturation. J Biol Chem*, 2000. 275(21): p. 15717-27.
165. Johannes, L., et al., *Effects of HIV-1 Nef on retrograde transport from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. Traffic*, 2003. 4(5): p. 323-32.
166. Llorente, A., et al., *Induction of direct endosome to endoplasmic reticulum transport in Chinese hamster ovary (CHO) cells (LdlF) with a temperature-sensitive defect in epsilon-coatomer protein (epsilon-COP). J Biol Chem*, 2003. 278(37): p. 35850-5.
167. Faure, J., et al., *ARF1 regulates Nef-induced CD4 degradation. Curr Biol*, 2004. 14(12): p. 1056-64.
168. Madrid, R., et al., *Nef-induced alteration of the early/recycling endosomal compartment correlates with enhancement of HIV-1 infectivity. J Biol Chem*, 2005. 280(6): p. 5032-44.
169. Sanfridson, A., S. Hester, and C. Doyle, *Nef proteins encoded by human and simian immunodeficiency viruses induce the accumulation of endosomes and lysosomes in human T cells. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(3): p. 873-8.
170. Sol-Foulon, N., et al., *HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. Immunity*, 2002. 16(1): p. 145-55.
171. Stumptner-Cuvelette, P., et al., *Human immunodeficiency virus-1 Nef expression induces intracellular accumulation of multivesicular bodies and major histocompatibility complex class II complexes: potential role of phosphatidylinositol 3-kinase. Mol Biol Cell*, 2003. 14(12): p. 4857-70.
172. Vigerust, D.J., B.S. Egan, and V.L. Shepherd, *HIV-1 Nef mediates post-translational down-regulation and redistribution of the mannose receptor. J Leukoc Biol*, 2005. 77(4): p. 522-34.
173. Ornelas, S.S., *Estudo da Relevância Fisiológica da tiosterase humana II (hTEII) na modulação de CD4, mediada pela proteína Nef HIV-1., in Pós-Graduação em Patologia Molecular. 2007, Universidade de Brasília: Brasília-DF. p. 83.*
174. Schmid, E.M., et al., *Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. PLoS Biol*, 2006. 4(9): p. e262.

175. *Chen, H., et al., Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. Nature, 1998. 394(6695): p. 793-7.*
176. *Kasai, K., et al., Dynamin II is involved in endocytosis but not in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. J Biochem, 1999. 125(4): p. 780-9.*
177. *Quentin, Y., Fusion of a free left Alu monomer and a free right Alu monomer at the origin of the Alu family in the primate genomes. Nucleic Acids Res, 1992. 20(3): p. 487-93.*
178. *Vila-Coro, A.J., et al., Characterization of RANTES- and aminooxypentane-RANTES-triggered desensitization signals reveals differences in recruitment of the G protein-coupled receptor complex. J Immunol, 1999. 163(6): p. 3037-44.*
179. *Shoemaker, B.A. and A.R. Panchenko, Deciphering protein-protein interactions. Part I. Experimental techniques and databases. PLoS Comput Biol, 2007. 3(3): p. e42.*
180. *Piehler, J., New methodologies for measuring protein interactions in vivo and in vitro. Curr Opin Struct Biol, 2005. 15(1): p. 4-14.*
181. *Selvin, P.R., The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. Nat Struct Biol, 2000. 7(9): p. 730-4.*
182. *Chan, F.K., et al., Fluorescence resonance energy transfer analysis of cell surface receptor interactions and signaling using spectral variants of the green fluorescent protein. Cytometry, 2001. 44(4): p. 361-8.*
183. *Siegel, R.M., et al., Measurement of molecular interactions in living cells by fluorescence resonance energy transfer between variants of the green fluorescent protein. Sci STKE, 2000. 2000(38): p. p11.*
184. *Banning, C., et al., A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells. PLoS One, 2010. 5(2): p. e9344.*
185. *Fire, A., et al., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. 391(6669): p. 806-11.*
186. *Ketting, R.F., et al., Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. Cell, 1999. 99(2): p. 133-41.*

187. Tomari, Y. and P.D. Zamore, *Perspective: machines for RNAi. Genes Dev*, 2005. 19(5): p. 517-29.
188. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature*, 2001. 411(6836): p. 494-8.
189. Jacque, J.M., K. Triques, and M. Stevenson, *Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. Nature*, 2002. 418(6896): p. 435-8.
190. Novina, C.D., et al., *siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. Nat Med*, 2002. 8(7): p. 681-6.
191. Brisibe, E.A., et al., *RNA interference: potentials for the prevention of HIV infections and the challenges ahead. Trends Biotechnol*, 2003. 21(7): p. 306-11.
192. Brown, A.E. and F. Catteruccia, *Toward silencing the burden of malaria: progress and prospects for RNAi-based approaches. Biotechniques*, 2006. Suppl: p. 38-44.
193. Fritz, J.H., S.E. Girardin, and D.J. Philpott, *Innate immune defense through RNA interference. Sci STKE*, 2006. 2006(339): p. pe27.
194. Simmons, K.J., et al., *Stable RNA interference of host thrombospondin-1 blocks Trypanosoma cruzi infection. FEBS Lett*, 2006. 580(9): p. 2365-70.
195. Tong, A.W., *Small RNAs and non-small cell lung cancer. Curr Mol Med*, 2006. 6(3): p. 339-49.
196. Cohen, M.S., *Preventing transmission of HIV: a biological and medical perspective. AIDS Patient Care STDS*, 2001. 15(8): p. 427-9.
197. Chun, T.W., et al., *Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(15): p. 8869-73.
198. Pierson, T., J. McArthur, and R.F. Siliciano, *Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. Annu Rev Immunol*, 2000. 18: p. 665-708.
199. Blankson, J.N., D. Persaud, and R.F. Siliciano, *The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. Annu Rev Med*, 2002. 53: p. 557-93.

200. Carl, S., et al., *Modulation of different human immunodeficiency virus type 1 Nef functions during progression to AIDS. J Virol*, 2001. 75(8): p. 3657-65.
201. Learmont, J.C., et al., *Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. N Engl J Med*, 1999. 340(22): p. 1715-22.
202. Pham, H.M., et al., *Lentiviral vectors interfering with virus-induced CD4 down-modulation potently block human immunodeficiency virus type 1 replication in primary lymphocytes. J Virol*, 2004. 78(23): p. 13072-81.
203. Hachet-Haas M, C.N., Marchal O, Matthes H, Gioria S, et al, *FRET and colocalization analyzer—a method to validate measurements of sensitized emission FRET acquired by confocal microscopy and available as an ImageJ Plug-in. Microsc Res Tech*, 2006: p. 69: 941–956.
204. Lama, J., *The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection. Curr HIV Res*, 2003. 1(2): p. 167-84.
205. Levesque, K., et al., *Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection. Curr HIV Res*, 2004. 2(1): p. 51-9.
206. Piguet, V., et al., *Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. Cell*, 1999. 97(1): p. 63-73.
207. Lu, X., et al., *Interactions between HIV1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4. Immunity*, 1998. 8(5): p. 647-56.
208. Roeth, J.F. and K.L. Collins, *Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. Microbiol Mol Biol Rev*, 2006. 70(2): p. 548-63.
209. Hunt, M.C., et al., *Characterization of an acyl-coA thioesterase that functions as a major regulator of peroxisomal lipid metabolism. J Biol Chem*, 2002. 277(2): p. 1128-38.
210. Hunt, M.C., et al., *A revised nomenclature for mammalian acyl-CoA thioesterases/hydrolases. J Lipid Res*, 2005. 46(9): p. 2029-32.
211. Liu, L.X., et al., *Mutation of a conserved residue (D123) required for oligomerization of human immunodeficiency virus type 1 Nef protein abolishes*

interaction with human thioesterase and results in impairment of Nef biological functions. J Virol, 2000. 74(11): p. 5310-9.

212. *Westin, M.A., S.E. Alexson, and M.C. Hunt, Molecular cloning and characterization of two mouse peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-regulated peroxisomal acyl-CoA thioesterases. J Biol Chem, 2004. 279(21): p. 21841-8.*
213. *Chaudhuri, R., et al., Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. J Virol, 2007. 81(8): p. 3877-90.*
214. *Jones, J.M., et al., Identification of peroxisomal acyl-CoA thioesterases in yeast and humans. J Biol Chem, 1999. 274(14): p. 9216-23.*
215. *Hunt, M.C., et al., Analysis of the mouse and human acyl-CoA thioesterase (ACOT) gene clusters shows that convergent, functional evolution results in a reduced number of human peroxisomal ACOTs. FASEB J, 2006. 20(11): p. 1855-64.*
216. *Lu, J.Y., L.A. Verkruyse, and S.L. Hofmann, Lipid thioesters derived from acylated proteins accumulate in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: correction of the defect in lymphoblasts by recombinant palmitoyl-protein thioesterase. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(19): p. 10046-50.*
217. *Wei, B.L., et al., In vivo analysis of Nef function. Curr HIV Res, 2003. 1(1): p. 41-50.*
218. *Glushakova, S., et al., CD4 down-modulation by human immunodeficiency virus type 1 Nef correlates with the efficiency of viral replication and with CD4(+) T-cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo. J Virol, 2001. 75(21): p. 10113-7.*

Capítulo 7. Anexo

7.1. Alinhamento das proteínas celulares fusionadas

β -COP :

```

1                               70
 $\beta$ -COP_WT  MTA AENVCYT LINVPMDEP PSEISLKNL EKGDVKSKE ALKKVIIMIL NGEKLPGLIM TIIRFVLPLQ
 $\beta$ -COP_ampl.  .....
Consensus  .....

71                               140
 $\beta$ -COP_WT  DHTIKLLLV FWEIVPKTTP DGRLHEMIL VCDAYRKDLQ HPNEFIRGST LRFLCKLKEA ELLEPIMPPI
 $\beta$ -COP_ampl.  .....
Consensus  .....

141                               210
 $\beta$ -COP_WT  RACLEHRHSY VRNAVLAAY TIYRNFEHLI PDAPELIHDF LVNEKDASCK RNAFMMLIHA DQDRALDYLS
 $\beta$ -COP_ampl.  .....
Consensus  .....

211                               280
 $\beta$ -COP_WT  ICIDQVQTFG DILQLVIVEL IYKVCHANPS ERARFIRCIY NLLQSSSPAV KYEAAGTIVT LSSAPTAIKA
 $\beta$ -COP_ampl.  .....
Consensus  .....

281                               350
 $\beta$ -COP_WT  AAQCYIDLI I KESDNNVKLI VLDRLIELKE HPAHERVLQD LVMDILRVLS TPDLEVRKKT LQLALDLVSS
 $\beta$ -COP_ampl.  .....
Consensus  .....

351                               420
 $\beta$ -COP_WT  RNVEELVIVL KKEVIKTNNV SEHEDTDKYR QLLVRTLHSC SVRFPDMAAN VIPVLMFELS DNNEAARADV
 $\beta$ -COP_ampl.  .....
Consensus  .....

421                               490
 $\beta$ -COP_WT  LEFVREAIQR FDNLRMLIVE KMLEVFHAIK SVKIYRGALW ILGEYCSTKE DIQSVMTIIR RSLGEIPIVE
 $\beta$ -COP_ampl.  .....
Consensus  .....

491                               560
 $\beta$ -COP_WT  SEIKKEAGEL KPEEEITVGP VQKLVTEMGT YATQSALSSS RPTKKEEDRP FLRGFLLDGD FFVAASLATT
 $\beta$ -COP_ampl.  .....
Consensus  .....

561                               630
 $\beta$ -COP_WT  LTKIALRYVA LVQEKKKQNS FVAEAMLLMA TILHLGKSSL PKKPITDDDV DRISLCLKVL SECSPIMNDI
 $\beta$ -COP_ampl.  .....
Consensus  .....

631                               700
 $\beta$ -COP_WT  FNKECRQSL S HMLSAKLEEE KLSQKKESEK RNVTVQPDDF ISFMQLTAKN EMNCKEDQFQ LSLLAAMGNT
 $\beta$ -COP_ampl.  .....
Consensus  .....

701                               770
 $\beta$ -COP_WT  QRKEAADPLA SKLNKVTQLT GFSDPVYAEA YVHVNQYDIV LDVLVNVQTS DTLQNCTLEL ATLGDLKLVE
 $\beta$ -COP_ampl.  .....
Consensus  .....

771                               840
 $\beta$ -COP_WT  KPSPLTLAPH DFANIKANVK VASTENGIIF GNIVYDVSGA ASDRNCVVL S DIHIDIMDYI QPATCTDAEF
 $\beta$ -COP_ampl.  .....
Consensus  .....

841                               910
 $\beta$ -COP_WT  RQMWAEFEWE NKVTVNTNMV DLNDYLQHL KSTNMKCLTP EKALSGYCGF MAANLYARSI FGEDALANVS
 $\beta$ -COP_ampl.  .....
Consensus  .....

911                               961
 $\beta$ -COP_WT  IEKPIHQGPD AAVTGHIRIR AKSQGMALS L GDKINLSQKK TSI
 $\beta$ -COP_ampl.  ..... GAGAPVA T
Consensus  .....

```

AP1σ:

```

1
AP1σ_WT MQFMLLFSRQ GKLRLOKWVY PLSDKKMKKI TRELVTQVLA RPKKMCSELE WRDLKIVYKR YASLYFCCAI
AP1σ_ampl. ....
Consensus .....

```

```

71
AP1σ_WT EDQDNELITL EIIHRYVELL DKYFGSVCEL DIIFNFEKAY FILDEFLLGG EVQETSCKNV LKAIEQADLL
AP1σ_ampl. ....
Consensus .....

```

```

141 155
AP1σ_WT QEEAETPRSV LEEIGLT
AP1σ_ampl. ....GAG APVAT
Consensus .....

```

AP2μ:

```

211 280
AP2μ_WT KFGMNDKIVI EKQGGKTADE TSKSGKQISIA IDDCTFHQCV RLSKFDSEERS ISFIPDGEF ELMRYRTTKD
AP2μ_ampl. -----
Consensus .....

```

```

281 350
AP2μ_WT IILPFRVIPL VREVGRTKLE VKVVIKSNFK PSLLAQKIEV RIPTPLNTSG VQVICMKGKA KYKASENAIV
AP2μ_ampl. ....
Consensus .....

```

```

351 420
AP2μ_WT WKIKRMAGMK ESQISAEIEL LPTNDKKKWA RPPISMNFEV PFAPSGLKVR YLKVFEPKLN YSDHVDIKWV
AP2μ_ampl. ....
Consensus .....

```

```

421 441
AP2μ_WT RYIGRSGIYE TRC
AP2μ_ampl. ....GAGAPVA T
Consensus .....

```

AP2σ:

```

1 70
AP2σ_WT MIRFILIQR AGKTRLAKWY MQFDDDEKQK LIEEVHAVVT VRDAKHTNFV EFRNFKIYR RYAGLYFCIC
AP2σ_ampl. ....
Consensus .....

```

```

71 140
AP2σ_WT VDVNDNNLAY LEAIHNFVEV LNEYFHNVCE LDLVFNFKV YTVVDEMFLA GEIRETSQTK VLKQLLMLQS
AP2σ_ampl. ....
Consensus .....

```

```

141 150
AP2σ_WT LE
AP2σ_ampl. ..GAGAPVAT
Consensus .....

```

AP3μ:

```

1 70
AP3μ_WT MIHSLFLINS SGDIFLEKHW KSVVRSVCD YFFEAQERAT EAENVPPVIP TPHHYLLSVY RHKIFFVAVI
AP3μ_ampl. ....
Consensus .....

```

```

71 140
AP3μ_WT QTEVPPLEVI EFLHRVDTF QDYFGVCEP VIKDNVVVY EVLEEMLDNG FPLATESNIL KELIKPPTIL
AP3μ_ampl. ....
Consensus .....

```

```

141 210
AP3μ_WT RIVVNTIIGS TNVGDQLPTG QLSVVPWRR TGVKYNNEAY FVIEEIDAI IDKSGSTITA EIQQVIDACV
AP3μ_ampl. ....
Consensus .....

```

```

211 280
AP3μ_WT KLIGMPDLTL SFMNPRLDD VSFHPCVRFK RWESERILSF IPPDGNFRLL SYHVSQNLV AIPVYVKHNI
AP3μ_ampl. ....
Consensus .....

```

```

281 350
AP3μ_WT SFRDSSSLGR FEITVGPKQT MGKTIEGVTV TSQMPKGVLN MSLTPSQGTH TFDPVTKMLS WDVGKINPQK
AP3μ_ampl. ....
Consensus .....

```

```

351 420
AP3μ_WT LPSLKGTMSTL QAGASKPDEN PTINLQFKIQ QLAISGLKVN RLDYGEKYK PFKGIKYMTK AGKFQVRT
AP3μ_ampl. ....GA
Consensus .....

```

```

427
AP3μ_WT
AP3μ_ampl. GAVVAT
Consensus .....

```

VH1:

```

1
VH1_WT MTRKMDIRGAV DAAVPTNIIA AKAAEVRRANK VNWQSYLQGG MISAEDECFI QRFEMKRSPE EKQEMLQTEG 70
VH1_ampl. ....
Consensus .....

71
VH1_WT SQCAKTFINL MTHICKEQTV QYILTMVDDM LQENHQRVSI FFDYARCSKN TAWPYFLPML NRQDPFTVHM 140
VH1_ampl. ....
Consensus .....

141
VH1_WT AARIIAKLA A WGKELMEGSD LNYFENWIKT QLSQKLRGS GVAVETGTVS SSDSSQYVQC VAGCLQLMLR 210
VH1_ampl. ....
Consensus .....

211
VH1_WT QCVAGCLQLM LRVNEYRFWA VEADGVN CIM GVLSNKQGFQ LQYQMIFSIW LLAFSPQ MCE HLRRYNIIPV 280
VH1_ampl. ....
Consensus .....

281
VH1_WT LSDIILQESVK EKVTRIILAA FRNFLEKSTE RETRQEYALA MIQCKVLKQL ENLEQQKYDD EDISEDIKFL 350
VH1_ampl. ....
Consensus .....

351
VH1_WT LEKLGESVQD LSSFDEYSSE LKSGRLEWSP VHKSEKFWRE NAVRLNEKNY ELLKILTKLL EVSDDPQVLA 420
VH1_ampl. ....
Consensus .....

421
VH1_WT VAAHDVGEYV RHYPRGKRVI EQLGGKQLVM NHHHEDQQV RYNALLAVQK LMVHNWEYLG KQLQSEQPQT 490
VH1_ampl. ....
Consensus .....

491 503
VH1_WT AARAS
VH1_ampl. ....GAGAP VAT
Consensus .....

```

Anexo 7.1. Análise de homologia das sequências dos diferentes genes clonados nos vetores pECFP e pEYFP. As sequencias dos diferentes genes clonados foi confirmada por analise de homologia em banco de dados NCBI.

7.2. Lista de vetores fusionado a CFP/YFP

Plasmídeo	Enzimas
pECFP-CD4	<i>Age I and Nhe I</i>
pEYFP-CD4	<i>Age I and Nhe I</i>
pECFP-βCOP	<i>Age I and Nhe I</i>
pEYFP-βCOP	<i>Age I and Nhe I</i>
pECFP-AP1σ	<i>Age I and Nhe I</i>
pEYFP-AP1σ	<i>Age I and Nhe I</i>
pECFP-AP2σ	<i>Age I and Nhe I</i>
pEYFP-AP2σ	<i>Age I and Nhe I</i>
pECFP-AP2μ	<i>Age I and Nhe I</i>
pEYFP-AP2μ	<i>Age I and Nhe I</i>
pECFP-V1H	<i>Age I and Nhe I</i>
pEYFP-V1H	<i>Age I and Nhe I</i>
pECFP-Nef NL43	<i>Age I and Nhe I</i>
pEYFP-Nef NL43	<i>Age I and Nhe I</i>
pECFP-Nef NA7	<i>Age I and Nhe I</i>
pEYFP-Nef NA7	<i>Age I and Nhe I</i>
pECFP-hTEII	<i>Age I and Nhe I</i>
pEYFP-hTEII	<i>Age I and Nhe I</i>
pECFP-Nef 239	<i>Age I and Nhe I</i>
pEYFP-Nef 239	<i>Age I and Nhe I</i>

Anexo 7.2. Lista de vetores de expressão com as proteínas celulares fusionados aos vetores pECFP ou pEYFP.

7.3. Lista de plasmídeos para produção de partículas virais

Plasmídeo	Enzima ou referência
pNL-SIN-CMV-eGFP-hTEII-RNAi	<i>XbaI</i> and <i>ClaI</i>
pNL-SIN-CMV-eGFP-ATP6V1H-RNAi	<i>XbaI</i> and <i>ClaI</i>
pNL-SIN-CMV-eGFP-AP1 γ -RNAi	<i>XbaI</i> and <i>ClaI</i>
pNL-SIN-CMV-eGFP-AP2 μ -RNAi	<i>XbaI</i> and <i>ClaI</i>
pNL-SIN-CMV-eGFP-AP3 μ -RNAi	<i>XbaI</i> and <i>ClaI</i>
pNL-SIN-CMV-eGFP- β COP-RNAi	<i>XbaI</i> and <i>ClaI</i>
pNL-SIN-CMV-eGFP-NEF RNAi	<i>XbaI</i> and <i>ClaI</i>
pNL-SIN-CMV-eGFP-CD4-RNAi	<i>XbaI</i> and <i>ClaI</i>
pNL-SIN-CMV-eGFP	<i>BamHI</i> and <i>XhoI</i>
pCG-Tat	<i>MluI</i> and <i>XbaI</i>
pRSV-Rev	Dull et al., J. Virol., 1998
pCMV-VSV-G	Beyer et al., J. Virol. 76, 2002
pBR_IRES_dsred2_ <i>Nef</i>	<i>MluI</i> and <i>HpaI</i>
pBR-NefMac239_IRES_dsred2	<i>MluI</i> and <i>HpaI</i>
pBR-NejNA7_IRES_dsred2	<i>MluI</i> and <i>HpaI</i>

7.3. Lista de vetores utilizados para a produção de partículas virais codificando RNAi para proteínas celulares.