

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Estudo Molecular da Alteração do Tráfego Intracelular de
CD4 por Nef-HIV1**

Lucas Alves Tavares

Pelotas, 2014

Lucas Alves Tavares

Estudo Molecular da Alteração do Tráfego Intracelular de CD4 por Nef-HIV1

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin.
Orientador de Estágio: Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

T231e Tavares, Lucas Alves

Estudo molecular da alteração do tráfego intracelular de CD4 por Nef-HIV1 / Lucas Alves Tavares. – 74f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Odir Antônio Dellagostin ; co-orientador Luis Lamberti Pinto da Silva.

1.Biotecnologia. 2.HIV1. 3.Nef-HIV1. 4.Tráfego intracelular. 5.Estudo molecular. 6.HeLa. I.Dellagostin, Odir Antônio. II.Silva, Luís Lamberti Pinto da. III.Título.

CDD: 572.8

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Daniela Fernandes Ramos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG)

Profa. Dra. Marta Gonçalves Amaral, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof. Dra. Silvana Beutinger Marchioro, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

“Não importa quão estreito o portão, quão repleta de castigo a sentença. Eu sou o senhor do meu destino, eu sou o capitão da minha alma”.

William Ernest Henley

Agradecimentos

Eu agradeço primeiro a Deus por todas as oportunidades que ele me deu ao longo da minha vida que me fizeram chegar até aqui. Agradeço também aos meus pais, Fernando e Ana Izaura, e aos meus irmãos, Igor e Vinícius, pelo apoio financeiro e emocional, principalmente nos momentos que eu mais precisava. Gostaria de agradecer aos meus amigos de Belo Horizonte (Luis Eduardo, Luiz Felipe, Bernardo, Douglas, Diogo, Bruno e Gustavo) pelos momentos curtos e intensos que eu vivi com vocês quando eu voltava para casa, como se cada segundo fosse essencial e suficiente para continuar a minha jornada. Vocês jamais entenderão o que é morar longe de casa e sentir a saudade mais doída de todos.

Gostaria de agradecer aos meus amigos e colegas do Rio Grande do Sul os quais sem eles eu também não teria aguentado. Em especial, aos meus colegas e amigos Renan, Rodrigo, Arthur, Carlus, Delva, Hugo, Daniel, Talita, Marina, Fernanda e Mariana: obrigado pelos momentos de trabalhos e de estudos intensos, bem como pelos momentos fundamentais da descontração, das festas e da cerveja gelada. Aonde eu for vocês vão comigo. Espero que dê tudo certo em suas vidas, vocês merecem.

Gostaria de agradecer às pessoas que deram oportunidade a mim durante a faculdade, em especial a professora Dra. Marta Amaral, a professora Dra. Daniela Ramos e o professor Dr. Odir Dellagostin. Agradeço também ao professor Dr. Luis Lamberti, pela oportunidade de fazer o trabalho de conclusão de curso no seu laboratório e a todos que fazem parte da sua equipe.

E, por fim, agradeço às instituições que contribuíram para a minha formação, a UFPel, o CDTec, a Biotecnologia, a FAPERGS e a FMRP-USP.

Resumo

TAVARES, Lucas Alves. **Estudo Molecular da Alteração do Tráfego Intracelular de CD4 por Nef-HIV1**. 2014. 74f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). HIV/AIDS se espalhou por vários países no mundo e, dessa forma, se tornou uma preocupação mundial, com estimativa que em 2012 havia 35,3 milhões de pessoas infectadas com o vírus no mundo. A patogênese do HIV é complexa, resultando na alteração do sistema imune, especialmente notada na infecção das células T CD4+. Uma das proteínas mais estudada é a proteína acessória Nef (do inglês, *Negative factor*) que contribui para a patogênese viral, principalmente por diminuir a expressão de CD4 e do complexo de histocompatibilidade do tipo 1 (MHC1), por ativar Pak2 e por aumentar a infectividade viral. No caso do CD4, Nef interage com a proteína adaptadora 2 (AP-2) e com a cauda de CD4, acarretando na internalização de CD4 em vesículas revestidas por clatrina na membrana plasmática, levando o receptor à degradação lisossomal. Dessa forma, o trabalho propõe um estudo molecular que visa contribuir para o maior entendimento da alteração do tráfego intracelular de CD4 por Nef-HIV1. Para isso, foi feita uma construção em que a sequência codificadora para a região C-terminal de CD4 foi fusionada com a sequência codificadora para a região N-terminal e transmembrana da glicoproteína transmembrana da cepa mutante ts045 do vírus da estomatite vesicular (VSV-G), uma proteína amplamente utilizada para o estudo do transporte de proteínas na via secretória. Técnicas de biologia molecular e microbiologia, tais como, reação em cadeia de polimerase (PCR), reações com enzimas de digestão, cultivo, transformação em *Escherichia coli* e lipo-transfecção foram utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho. Assim, foi obtido sucesso na construção em um plasmídeo para a expressão de eGFP:VSVG Δ CT:CD4-CT e, posteriormente, esta proteína foi então transfectada sem e com Nef-HIV1-cherry em células HeLa para testar a sua funcionalidade. As lamínulas de vidro montadas em uma lâmina foram visualizadas no microscópio confocal Leica TCS SP5 e as imagens foram capturadas. Ao final das atividades e analisando as imagens obtidas, foi possível verificar algumas diferenças em relação ao controle sem Nef; quando a temperatura de incubação muda para 32 °C é possível observar que a proteína eGFP-VSVG Δ CT:CD4-CT fica mais acumulada em estruturas puntiformes, provavelmente endossomos, e está co-localizando com Nef-HIV1-cherry. Portanto, a cauda citosólica de CD4 foi suficiente para conferir a suscetibilidade a Nef. Além disso, é possível observar que o Nef é recrutado para endossomos quando CD4 está presente nesta organela e o mesmo não ocorre quando a cauda citosólica de CD4 está presente na membrana do retículo endoplasmático ou no complexo de Golgi. Esses resultados sugerem que Nef afeta o tráfego intracelular de CD4, apenas na via secretória tardia, quando essas moléculas já deixaram o complexo de Golgi. Portanto, os resultados corroboram com o modelo de redução dos níveis de CD4 na membrana plasmática ocorre devido à aceleração da endocitose de CD4, e não por retenção na via secretória.

Palavras chaves: HIV1, Nef-HIV1, CD4, tráfego intracelular, estudo molecular, transfecção, HeLa.

Abstract

TAVARES, Lucas Alves. **Molecular Study of the Change of CD4 Intracellular Traffic by Nef-HIV1**. 2014. 74f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

The Human Immunodeficiency Virus (HIV) is the etiologic agent of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). The HIV infection has become a pandemic of unprecedented dimensions affecting millions of people since the first evidence of AIDS was reported in 1981. HIV/AIDS has spread for many countries in the world and thus has become a global concern, with 35.3 million people infected worldwide in 2012. The HIV pathogenesis is complex, resulting in the alteration of the immune system, particularly noted by T-CD4+ cells infection. One of the most study proteins of HIV is the accessory protein Nef (Negative factor), which contributes to viral pathogenesis mainly by CD4 and histocompatibility complex type 1 (MHC1) downregulation, activating Pak2 and increasing viral infectivity. In case of CD4, Nef interacts with the adapter protein 2 (AP-2) and CD4 tail, resulting in CD4 internalization in clathrin-coated vesicles at plasma membrane, leading CD4 to degradation in the lysosome. Thus, the main goal of this work is a molecular study that aims to help a better understanding of the change of CD4 intracellular traffic by Nef-HIV1. For this, we made a construct where the coding sequence for the C-terminal region of CD4 was fused to the coding sequence for N-terminus and transmembrane of glycoprotein of the vesicular stomatitis virus (VSV-G), a protein widely used for the study of protein transport in the secretory pathway. Techniques of molecular biology and microbiology such as the polymerase chain reaction (PCR), reaction enzyme digestion, cell culture, transformation in *Escherichia coli* and lipofection were used to develop this work. So, we successfully built a plasmid for expression eGFP-VSVG Δ CT:CD4-CT, and subsequently transfected with and without Nef-HIV1-cherry in HeLa cells to test its functionality. The glass coverslips were mounted on a slide and thereby viewed on Leica TCS SP5 confocal microscope to capture the images. At the end of the activities and analyzing the images, it was possible to observe some differences compared to the control without Nef; when the temperature incubation changes to 32 °C, the eGFP-VSVG Δ CT:CD4-CT can be observed more in punctate structures, likely endosomes, and is co-locating with Nef-HIV1-cherry. Therefore, the CD4 cytosolic tail is enough to confer susceptibility to Nef. Furthermore, it is also possible to observe that Nef is recruited to endosomes when CD4 is present in this organelle and this can not be seen when CD4 cytosolic tail is present in membrane of endoplasmic reticulum or the Golgi complex. These results suggest that Nef affects the CD4 intracellular traffic on the late secretory pathway only when these molecules have left the Golgi complex. Additionally, the results corroborate with the model of CD4 decreased levels of the plasma membrane occurs due to CD4 accelerated endocytosis, and not by retention in secretory pathway

Keywords: HIV1, Nef-HIV1, CD4, intracellular traffic, molecular study, transfection, HeLa.

Lista de Figuras

Figura 1: Estimativa de adultos e crianças vivendo com HIV no mundo em 2012	19
Figura 2: Representação esquemática do HIV1 maduro.....	22
Figura 3: Representação esquemática da organização genômica e viral do HIV1 e as posições relativas das regiões codificantes para as suas proteínas	23
Figura 4: Representação esquemática do ciclo celular do HIV1	26
Figura 5: Modelo estrutural de Nef-HIV1	29
Figura 6: Diagrama ilustrando as quatro principais funções de Nef-HIV1	31
Figura 7: Representação esquemática dos mecanismos para a diminuição da expressão de CD4 induzida por Nef.....	36
Figura 8: Representação da construção VSVG Δ CT:CD4-CT.....	39
Figura 9: Mapa do plasmídeo pEGFP-N1 (CLONTECH's Living Colors [®]).	39
Figura 10: Resultado da análise feita pela ferramenta TMHMM para a sequência de aminoácidos do VSV-G	41
Figura 11: Resultado da análise feita pela ferramenta TMHMM para a sequência de aminoácidos do CD4	41
Figura 12: Fluxograma representativo da extração de DNA plasmideal pelo método da lisozima	46
Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR de CD4-CT e da 1ª reação de VSVG Δ CT	51
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR de CD4-CT em um poço duplo.....	51
Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR de 2ª reação de VSVG Δ CT	52
Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% das alíquotas recolhidas da reação de digestão do pEGFP-N1	53

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% após o descongelamento das digestões purificadas.....	54
Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 1% das 12 digestões provenientes de 12 extrações caseiras de DNA plasmideal pelo método de lisozima	56
Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto de PCR com o DNA do Clone 1	56
Figura 20: Eletroforese em gel de agarose 1% a partir das digestões de confirmação do Clone 1	57
Figura 21: Resultado do sequenciamento do DNA do Clone 1 analisado pelo mapa de restrição gerado pelo do BioEdit v7.2.5 Ibis Biosciences	58
Figura 22: Representação esquemática do HIV1 madur Imagens capturadas das células HeLa transfectadas com pEGFP-N1 VSVG Δ CT:CD4-CT	61
Figura 23: Imagens capturadas das células HeLa transfectadas com pEGFP-N1 VSVG Δ CT:CD4-CT e com pMCherry-N1 Nef-HIV1	62

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sequência dos primers para amplificação das sequências codificadoras de VSVG Δ CT e de CD4-CT	40
Tabela 2: Reação de PCR para amplificar as sequências codificadoras de VSVG Δ CT e de CD4-CT	43
Tabela 3: Ciclos das reações em cadeira de polimerase	43
Tabela 4: Reação de digestão de pEGFP-N1, de VSVG Δ CT e de CD4-CT	44
Tabela 5: Reação de ligação.....	45
Tabela 6: Reação de digestão para confirmação do Clone 1	47
Tabela 7: Preparo das soluções para a transfecção	49

Lista de Abreviaturas e Siglas

- AC – Adenil ciclase
- AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina
- AP-2 – proteína adaptadora 2
- AP-1 – proteína adaptadora 1
- CA - Capsídeo
- CD – Designação de cluster
- cpz – chimpanzé
- DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- eGFP – *enhanced green fluorescent protein*
- Env – envelope
- FasL – ligante Fas
- Fig. – figura
- Gag – *group specific antigen*
- gp - glicoproteína
- GRID - *gay-related immune deficiency*
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida
- HIV1 – Vírus da Imunodeficiência Adquirida do tipo 1
- HIV2 – Vírus da Imunodeficiência Adquirida do tipo 2
- Hck – proteína quinase hematopoiética
- IN – Integrase viral
- LB – Luria Bertani
- Lkc - proteína tirosina quina específica de linfócito
- LTR – *long terminal repeat*

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
MHC1 – Complexo de histocompatibilidade do tipo 1
MHC2 – Complexo de histocompatibilidade do tipo 2
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
NC - nucleocapsídeo
Nef – *negative fator*
ORF – *open reading frame*
PBS – tampão fosfato-salino
PCR – Reação em Cadeira da Polimerase
PKC - Proteína Quinase C
pol – polimerase
PR – protease viral
p.t.t. – *pan troglodytes troglodytes*
Rev – regulador da expressão gênica viral
RNA – ácido ribonucleico
rpm – rotações por minuto
RT – transcriptase reversa
sm - *Sooty mangabeys*
SIV – Vírus da Imunodeficiência Símia
Tat – ativador transcricional
TGN – rede trans-Golgi
V1H – subunidade catalítica da ATPase vacuolar
Vif – *viral infectivity factor*
Vpr – *viral protein rapid*
Vpu – *viral protein out*
VSV-G – glicoproteína do vírus da estomatite vesicular

SUMÁRIO

Resumo	7
Abstract.....	8
Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas	11
Lista de Abreviaturas e Siglas	14
1. Introdução.....	16
2. Revisão Bibliográfica.....	16
2.1. HIV e AIDS – Histórico, evolução e epidemiologia	16
2.2. Patogênese de HIV1 e de HIV2 – Principais características	19
2.3. A Biologia do vírus.....	21
2.4. O Ciclo replicativo do HIV1.....	24
2.5. A proteína Nef – Características gerais.....	27
2.6. A multifuncionalidade da proteína Nef	30
2.7. Nef X CD4.....	33
2.8. VSV-G e sua funcionalidade no estudo do tráfego intracelular de proteínas na via secretória	37
3. Objetivo	38
4. Objetivos específicos	38
5. Metodologia	38
5.1. Estratégia de clonagem	38
5.2. Desenho dos <i>primers</i>	40
5.3. Reação de PCR para amplificação das sequências codificadoras de VSVG Δ CT e de CD4-CT, eletroforese dos produtos de PCR e purificação	42
5.4. Reação de digestão de VSVG Δ CT, de CD4-CT e de pEGFP-N1.....	43
5.5. Reação de ligação e triagem de clones recombinantes em potencial.....	45
5.6. Preparação das células.....	48

5.7. Transfecção de DNA e estratégia para testar a funcionalidade de VSVGΔCT:CD4-CT	48
6. Resultados e Discussão	50
6.1. Eletroforese dos produtos de PCR de VSVGΔCT e de CD4-CT.....	50
6.2. Reação de digestão de VSVGΔCT, de CD4-CT e de pEGFP-N1.....	52
6.3. Triagem do(s) clone(s) recombinante(s)	54
6.4. Teste da funcionalidade da ferramenta VSVGΔCT:CD4-CT	59
7. Conclusões e Perspectivas	63
8. Considerações Finais	63
9. Referências	64

1. Introdução

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tráfego Intracelular de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). As linhas de pesquisa majoritárias, lideradas pelo professor Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva, propõem-se a elucidar e a entender os mecanismos da alteração do tráfego intracelular de proteínas, bem como da biogênese de organelas das vias secretórias e endocíticas, acarretada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e suas proteínas. Dessa forma, este trabalho busca realizar um estudo molecular visando auxiliar no melhor entendimento da alteração do tráfego de CD4 pela proteína Nef do HIV do tipo 1 (HIV1).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. HIV e AIDS – Histórico, evolução e epidemiologia

Em julho de 1981 um surto foi reportado de uma rara forma de câncer entre homens homossexuais na Califórnia e em Nova York. Na mesma época, outra doença misteriosa foi reportada em um homem com sintomas de febre e que se assemelhavam a gripe. No começo, os surtos foram nomeados GRID (do inglês, *gay-related immune deficiency*) (BARRE-SINOUSSE *et al.*, 1983). Contudo, casos começaram a ser observados em pessoas heterossexuais, viciados em drogas e pessoas que receberam transfusão sanguínea. Essa nova doença do sistema imune

foi designada posteriormente como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Em 1983, o agente etiológico da AIDS foi isolado de sangues de pacientes e nomeado Vírus Associado à Linfadenopatia (BARRE-SINOUSSE *et al.*, 1983). Em 1987, o vírus foi finalmente designado como Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (HIV1) (COFFIN *et al.*, 1986). HIV1 infecta e elimina células T CD4+, acarretando a um estado debilitado do sistema imune (KLATZMANN *et al.*, 1984).

Aparentemente, o HIV foi transmitido ao ser humano por pelo menos duas espécies distintas de primatas não humanos infectados com o Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV). SIV_{cpz} (precursor do HIV em chimpanzés) se originou da recombinação de vírus que são atualmente encontrados em mangabey vermelho-tampado e macacos *Cercopithecus* e subsequente transmitido ao homem (KIRCHOFF, 2009). Linhagens do HIV derivadas de SIV_{cpz} P. t. t. (SIV chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes*) são conhecidas como HIV1 e são originadas da África Central, e aquelas linhagens derivadas de SIV_{sm} (SIV *Sooty mangabeys*) são conhecidas como HIV do tipo 2 (HIV2), originadas do Oeste da África; o vírus parece ter sido transmitido ao homem mais de uma vez. Em se tratando do HIV1, a forma mais disseminada mundialmente pertence ao HIV1 grupo M, que representa uma única linhagem com um ancestral comum (HILLIS, 2000). As evidências diretas da disseminação do vírus proveniente de primatas para humanos ainda não estão

totalmente claros. É possível que estes eventos de zoonose foram realizados por muitos fatores complexos, como adaptação e ganho regulatório de genes como *Vpu*, *Rev*, *Vif*, *Vpr*, *Nef* e *Tat* do vírus que contribuíram para que a transmissão ocorresse bem como para que a replicação em células humanas fosse possível (HEENEY *et al.*, 2006)

Mais de trinta anos após a descoberta do HIV, estima-se que em 2012 havia 35,3 milhões de pessoas infectadas com o vírus no mundo, 2,3 milhões de novos casos e 1,6 milhões de mortes relacionadas à síndrome (UNAIDS 2013); a Fig. 1 mostra uma visão global do HIV ao redor do mundo. As condições precárias de serviços de saúde em vários países e a falta de tratamento e de informação pioram a situação das pessoas infectadas vivendo em países do terceiro mundo, podendo acarretar em novos casos. Apesar do alto gasto financeiro em pesquisas ao redor do mundo, a eliminação total do vírus em pessoas infectadas ainda não é possível, devido principalmente ao fato do genoma do vírus se integrar em células de memória T CD4+ após a infecção. A terapia antirretroviral aumentou drasticamente a expectativa e a qualidade de vida (PALELLA *et al.*, 1998), mas em consequência da grande quantidade de mutações, o HIV pode desenvolver resistência a quase todas as drogas disponíveis (JACQUELINE & ROBERT, 2002).

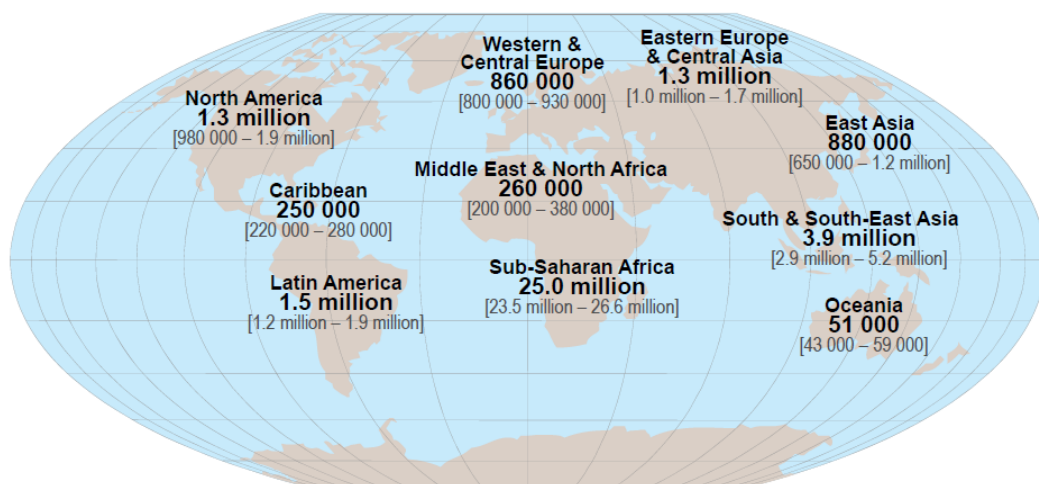


Figura 1: Estimativa de adultos e crianças vivendo com HIV no mundo em 2012 (adaptado de UNAIDS 2013).

2.2. Patogênese de HIV1 e de HIV2 – Principais características

O HIV pertence ao gênero Lentivírus e à família dos Retrovírus. Conforme já foi dito, existem dois tipos distintos de HIV, o HIV do tipo 1 e do tipo 2. HIV1 é responsável pela pandemia global da AIDS e é o mais estudado. Em comparação com o HIV1, HIV2 apresenta baixa capacidade de transmissão vertical e sexual em humanos e está majoritariamente localizada no Oeste da África, mas já se espalhou para outras partes da África, Europa, Índia e Estados Unidos (JACQUELINE & ROBERT, 2002). HIV1 e HIV2 foram introduzidos na população humana por transmissão zoonótica durante a primeira metade do século 20 e são, portanto, patógenos humanos recentes (HAN *et al.*, 2000). Diversas espécies de primatas não

humanos são naturalmente infectadas com lentivírus relacionados, mas geralmente não desenvolvem a síndrome (SCHINDLER *et al.*, 2003).

A progressão da síndrome acarretada pela infecção de HIV é resultante da carga viral plasmática, da diminuição dos níveis de CD4 e de doenças oportunistas infecciosas. Na fase aguda da síndrome, ocorre a destruição de linfócitos T CD4+ e diminuição da resposta imune (HO, 1995). A maioria dos indivíduos infectados com HIV1, não tratados, desenvolvem AIDS em aproximadamente 6 a 8 anos (HO, 1995).

Na fase aguda do HIV, o vírus destrói as células de memória T CD4+ e na fase crônica, o sistema imune gradativamente perde a sua capacidade de resposta. Pesquisas indicam que as proteínas do vírus iniciam a infecção ativando as células, tornando-as hiper-responsivas ao receptor de células T CD3+ e a estimulação dos receptores mediados por sinais de ativação de células T (FORTIN *et al.*, 2004). A hiper-ativação das células infectadas favorece a produção do vírus, mas um brusco *turnover* de células T CD4+ leva a ativação de morte celular, o que leva à hipótese de que a destruição de células T CD4+ resulta em perda da regulação e da função do sistema imune, acarretando em última instância na imunodeficiência (GOTTLIEB *et al.*, 1981; MEYAARD *et al.*, 1994). Contudo, a hiper-ativação do sistema imune e a perda de células T CD4+ são as características típicas da infecção do HIV1, em

contraste com a maioria das infecções por HIV2, onde as pessoas infectadas geralmente não progridem para a AIDS; este último grupo possuem uma baixa carga viral, não há a hiper-ativação do sistema imune e as células infectadas mantêm a quantidade de CD4 na superfície celular levando a uma maior dificuldade para a progressão da síndrome a longo prazo (WHITTLE *et al.*, 1994).

2.3. A Biologia do Vírus

O vírus maduro do HIV1 é uma esfera icosaédrica com um diâmetro de aproximadamente 100-120nm. O envelope externo é uma membrana dupla de lipídeo, que é proveniente da membrana da célula hospedeira de onde o vírus brota ou é liberado. Essa bicamada contém as proteínas da célula hospedeira e 72 pontos das glicoproteínas (gp) do envelope viral: gp120 e gp41. Dentro da bicamada, a proteína do nucleocapsídeo encapsula duas cópias do genoma viral de RNA fita simples, e outras várias proteínas como: protease viral (PR), transcriptase reversa (RT), integrase (IN), e proteínas acessórias como Vpu, Vif, Vpr e Nef, além de outras proteínas da célula do hospedeiro (GELDERBLOM *et al.*, 1989), conforme pode ser observado na Fig 2.

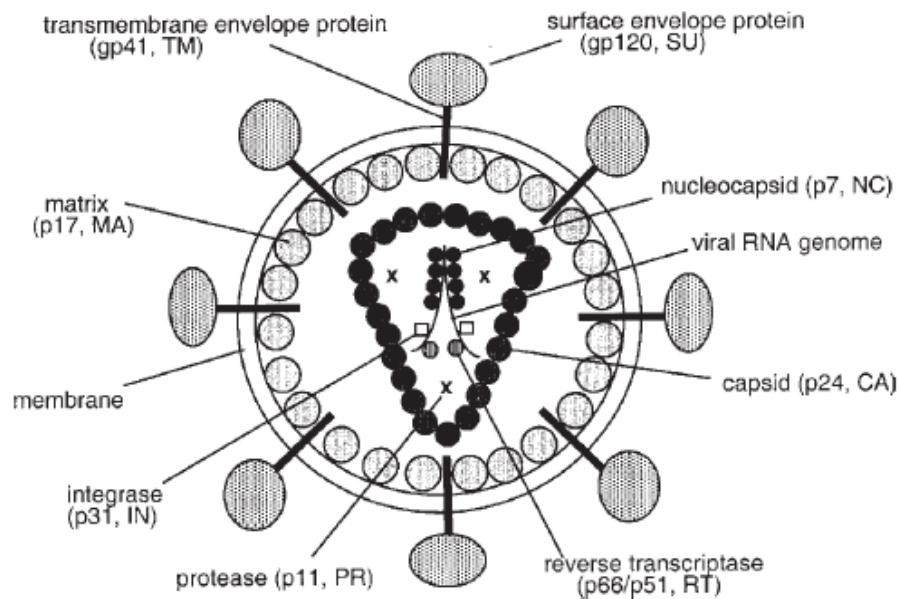


Figura 2: Representação esquemática do HIV1 maduro. São indicadas as posições da maioria das proteínas virais, a bicamada lipídica e o RNA genômico (adaptado de FREED, 1998).

O genoma do HIV1 possui 9.2 kb, com nove ORFs (do inglês, *open reading frames*) que codifica para 15 proteínas incluindo a maioria das proteínas estruturais e não estruturais comuns a todos retrovírus (Fig. 3). Da região 5' a 3' do genoma são encontrados os genes: *Gag* (do inglês, *group-specific antigen*), *pol* (polimerase) e *Env* (glicoproteínas do envelope), que são comumente codificados por todos os retrovírus. *Gag* codifica para uma proteína precursora chamada Pr55Gag, que é clivada pela protease viral gerando as proteínas Gag maduras (também conhecidas como MA ou p17), o capsídeo (CA ou p24), nucleocapsídeo (NC ou p7) e p6. As enzimas codificadas por *pol* são inicialmente sintetizadas como uma grande poliproteína precursora, Pr160 GapPol, que é clivado gerando PR, RT e IN. As

glicoproteínas Env também são sintetizadas como uma poliproteína precursora, que são clivadas por uma protease viral. O processamento de gp160 resulta na proteína de superfície gp120 e na glicoproteína transmembrana gp41 (FRANKEL & YOUNG, 1998).

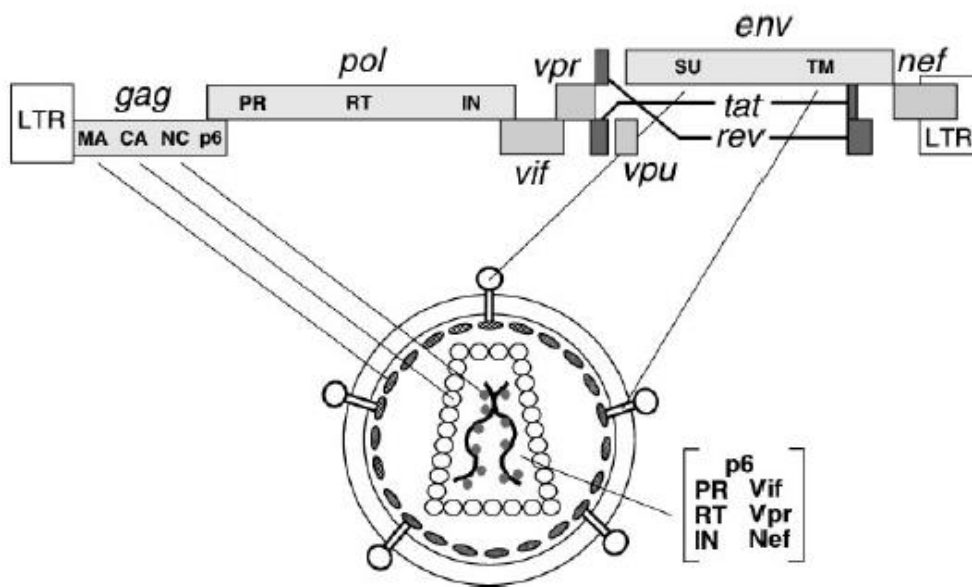


Figura 3: Representação esquemática da organização genômica e viral do HIV1 e as posições relativas das regiões codificantes para as suas proteínas (adaptado de FRANKEL & YOUNG, 1998).

Além dessas proteínas já citadas, HIV1 codifica para outras proteínas regulatórias e acessórias: Tat (ativador transcricional ou p14) é crítica para a transcrição das extremidades 5' e 3' do HIV , Rev (regulador da expressão gênica viral ou p19) promove a exportação nuclear de mRNAs virais com *splicing* incompleto, Vpu (do inglês, *viral protein out*) promove a degradação de CD4 e influencia da liberação viral, Vpr (do inglês, *viral protein rapid* ou p15) detém a célula

em G2 no ciclo celular e a proteína multifuncional Nef (do inglês, *Negative factor*) (GREENE & PETERLIN, 2002).

2.4. O Ciclo Replicativo do HIV1

O vírus HIV1 entra na célula utilizando a glicoproteína externa gp120 que se liga ao receptor da célula hospedeira CD4. Após esta ligação, são iniciadas mudanças conformacionais no envelope viral, permitindo a exposição do sítio de ligação para receptores de quimiocina (WYATT & SODROSKI, 1998). Os receptores quimionios usados pelo HIV1 são principalmente CCR5 (CHOE *et al.*, 1996) e CXCR4 (BERGER *et al.*, 1999). O HIV1 é classificado de acordo com os co-receptores utilizados: CCR5 são utilizados pelas cepas R5 (*non-syncytium-inducing*) e CXCR4 são utilizados pelas cepas X4 (*syncytium-inducing*). Linhagens de células T tipicamente expressam CXCR4, mas não expressam CCR5; linfócitos primários expressam ambos e macrófagos expressam apenas CCR5. Já o HIV2 e SIV são capazes de utilizar um amplo espectro de co-receptores (BERGER *et al.*, 1999).

A interação do complexo gp120-CD4 com o receptor quimiocina apropriado ativa uma nova mudança conformacional no envelope glicoproteico e resulta na inserção na região hidrofóbica N-terminal de gp41 na membrana da célula alvo; posteriormente, a fusão entre o vírus e a célula acontece. Miyuchi e colaboradores em 2009 confirmaram este processo de fusão entre o vírus e a célula, demonstrando

ainda que o HIV1 pode utilizar a maquinaria endocítica para entrar na célula alvo (MYAUCHI *et al.*, 2009).

Depois da entrada viral na célula, o RNA genômico do vírus é transcrito reversamente em DNA pela RT e se integra no genoma da célula pela IN. O vírus pode permanecer latente neste estado (integrado ao genoma da célula) por um longo período, antes de ele ser transcrito, replicado, formado e liberado da membrana celular (FREED, 2002).

O pró-vírus integrado contém sequências flanqueadoras nomeadas LTR (do inglês, *long terminal repeats*) nas extremidades 5' e 3', e contém as sequências promotoras que permitem a transcrição em RNA. Uma vez integrado, a transcrição ativa do pró-vírus é regulada por duas proteínas virais, Tat e Rev, bem como outros fatores da célula hospedeira (FRANKEL & YOUNG, 1998). Inicialmente no ciclo replicativo, novos transcritos de mRNA sofrem *splicing* em múltiplas regiões e Tat, Vpr e Nef são produzidos (SCHWARZ *et al.*, 2003). Uma vez que ocorre o acúmulo destas proteínas regulatórias, pode ser efetuada a síntese de mRNAs viral que sofreu um único *splicing* e de outras que não sofreram *splicing*. Tradução de *Gag* e *pol* acontece no ribossomo no citoplasma, enquanto *Env* vai para a via Retículo Endoplasmático-Complexo de Golgi, onde são realizadas as glicosilações. O mRNA viral que não sofreu *splicing* é traduzido em proteínas virais estruturais e

enzimáticas. Finalmente, todos os componentes virais atingem a membrana plasmática; novos vírus são montados e liberados da membrana plasmática ao mesmo tempo em que estão adquirindo Env. Após o brotamento, Gag e Gag-pol são clivadas por PR, tornando o vírus maduro para infectar outras células (KAPLAN, 1994).

O ciclo replicativo do HIV1 recém-descrito é comumente dividido em Fase Inicial e Fase Tardia (Fig. 4). A Fase Inicial começa com a ligação de gp120 viral com CD4 da célula hospedeira e termina com a integração no genoma da célula. A Fase Tardia se inicia a partir da transcrição do provírus e finaliza na liberação do vírus da célula e sua posterior maturação (FREED, 2002). Entretanto, vários aspectos da interação do HIV1-célula hospedeira permanecem não elucidados.

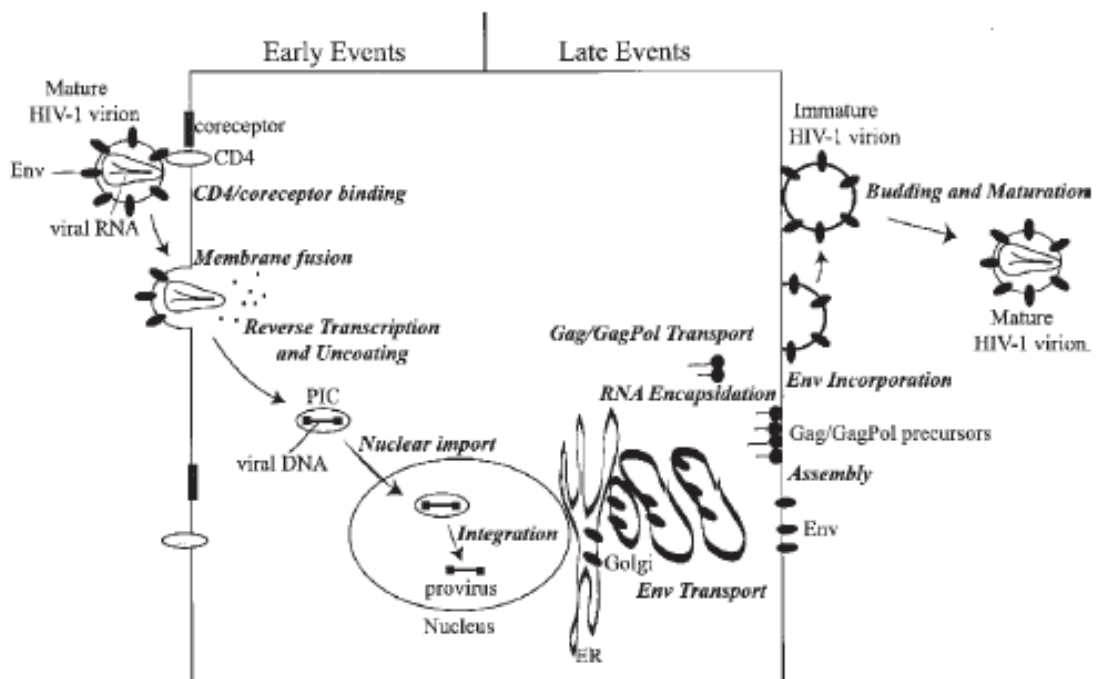


Figura 4: Representação esquemática do ciclo celular do HIV1. A maioria dos eventos da Fase Inicial e da Fase Tardia do ciclo replicativo está indicada na figura (Adaptado de FREED, 2002).

2.5. A proteína Nef – Características gerais

O gene *Nef* de HIV1, de HIV2 e de SIV foi originalmente designado como 3' ORF e também como F, ORF B e E, e finalmente como *Nef* (do inglês, *Negative fator*) (ARYA & GALLO, 1986). Em HIV e em SIV, *Nef* é codificado na região 3' de *Env*, e se estende até a região U3 da 3' LTR (RATNER *et al.*, 1987). Posteriormente, a porção carboxi-terminal se sobrepõe a 3' LTR. *Nef*-HIV1 é codificado pelos nucleotídeos 8343 a 8963 do genoma viral, que corresponde a 207 aminoácidos. Em contraste, *Nef*-HIV2 e *Nef*-SIV são maiores, codificando para 257 aminoácidos e 263 aminoácidos, respectivamente (RATNER *et al.*, 1987).

Existe uma pequena variação na sequência da proteína *Nef*. Em nível de aminoácidos, a variação no mesmo indivíduo oscila entre 0,5 a 20,2%, enquanto se compara que entre indivíduos infectados, a variação vai de 0,5 a 22,7%. Em nível de nucleotídeos, a variação em um mesmo indivíduo vai de 0,5 a 11,2% e entre indivíduos infectados oscila entre 0,3 a 13,2%. A baixa evolução das sequências de *Nef* é notada tanto na fase sintomática quanto assintomática da doença (SHUGARS *et al.*, 1993).

Nef é o transcrito mais abundante na infecção por HIV em células T antes mesmo de a integração viral ocorrer. A expressão de Nef e Tat resulta no aumento na ativação da célula T e na replicação viral, levando ao aumento da infectividade viral (WU & MARSH, 2001). Durante as fases de infecção em células linfoides, foi demonstrado que Nef é produzido abundantemente nas primeiras 6-9 horas pós-infecção, assim como Rev e Tat (RANKI *et al.*, 1994).

Estudos demonstram que Nef-HIV1 sofre duas modificações pós traducionais. A primeira é a miristoilação: uma modificação comum encontrada em proteínas, em que um ácido graxo saturado de 14 carbonos (miristato) é covalentemente ligado a região N-terminal da proteína. O sinal de miristoilação (MGxxx) está localizado entre os aminoácidos 1 e 6 e é encontrado totalmente conservado em todos os alelos de Nef de diferentes subtipos virais da doença e independentes do estágio da doença em que o paciente se encontra (SHUGARS *et al.*, 1993). Já foi reportado que Nef é capaz de se associar com o citoesqueleto de células T e que este evento é facilitado pela miristoilação (NIEDERMAN *et al.*, 1993). A provável área desta interação está localizada entre os aminoácidos 73 e 78, e pode estar relacionada à transmissão viral de célula-célula e à liberação eficiente do vírus (FACKLER *et al.*, 1997). Além disso, a associação de Nef às membranas celulares depende da miristoilação, sendo a associação às membranas necessária para a maioria das atividades já

descritas para Nef. A segunda modificação pós transcricional são as fosforilações por proteínas serina-treonina quinases, realizadas pela PKC (proteína quinase C) no aminoácido treonina, na posição 15, (GUY *et al.*, 1987) e pela via de sinalização por AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) no aminoácido serina, na posição 9 (LI *et al.*, 2005).

A estrutura de Nef é composta por seis α -hélices (α -1 a α -6) e por cinco folhas β pregueadas antiparalelas (β -1 a β -5) (GRESIEK *et al.*, 1997). Assim, a estrutura de Nef pode ser dividida em cinco unidades (GEYER & PETERLIN, 2001): uma região miristoilada na região N-terminal, uma região âncora flexível na porção N-terminal (do aminoácido 2 ao 55), uma região contendo um loop PxxP (do aminoácido 57 ao 80), o domínio central (do aminoácido 81 ao 206) e o loop flexível da região C-terminal (do aminoácido 148 ao 180) (Fig. 5)

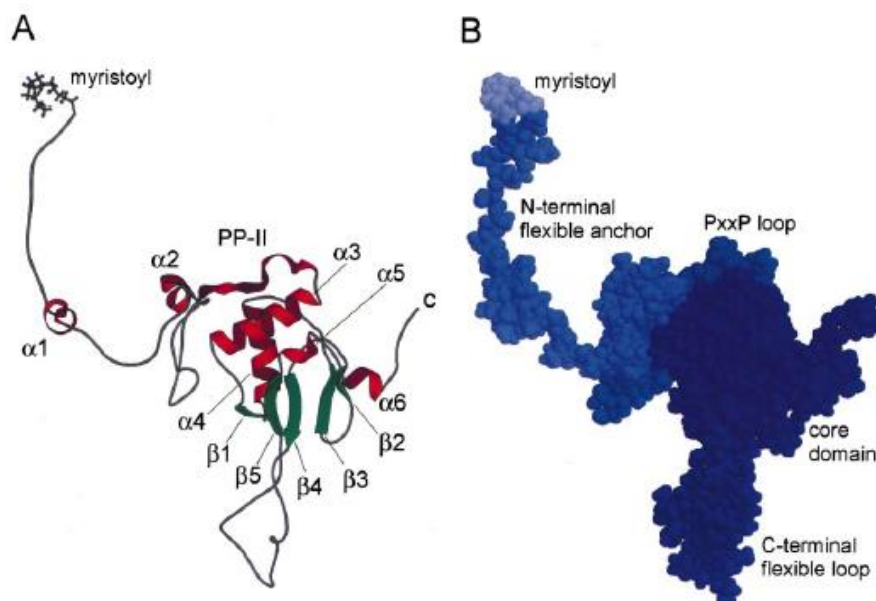


Figura 5: Modelo estrutural de Nef-HIV1. (A) Representação esquemática em fita e (B) representação espacial, demonstrando as principais regiões da proteína Nef-HIV1, descritas no texto (Adaptado de GEYER & PETERLIN, 2001).

2.6. A multifuncionalidade da proteína Nef

A proteína acessória Nef foi originalmente nomeada assim, pois se pensava que ela fosse um fator negativo que inibia a replicação viral (CHENG-MAYER *et al.*, 1989). Contudo, posteriormente, foi comprovado que Nef afeta positivamente a replicação e infecção (MILLER *et al.*, 1994, 1996). As proteínas Nef tanto do HIV1 quando do SIV são pequenas (de 25 a 34 kDa); HIV1, HIV2 e o SIV possuem o gene para Nef, e várias regiões são altamente conservadas, mesmo que ainda haja algumas distinções. Em contraste, as regiões carboxi- (C) e amino- (N) terminais são menos conservadas (ROETH & COLLINS, 2006).

Nef contribui para a patogênese do HIV por vários mecanismos. Nef promove a infecção viral pela ativação do linfócito T CD4+, o que o torna mais suscetível a infecção. Adicionalmente, Nef altera o sinal da cascata de tradução final do receptor de células T (SKOWRONSKI *et al.*, 1993; BAUR *et al.*; 1994). Além disso, foi demonstrado que Nef afeta as moléculas que participam na via de sinalização do receptor de células T, como os fatores de troca de guanosina (FACKLER *et al.*, 1997), p21-ativador de quinase 2 (Pak2) (FACKLER *et al.*, 1997; NUNN & WASH,

1996; RENKEMA *et al.*, 1999), Rac (VILHARDT *et al.*, 2002), CDC42 (LU *et al.*, 1996) e o complexo DOCK2/ELMO1 (JANARDHAN *et al.*, 2004). Interação via sinalização células T ainda leva ao aumento do ligante Fas (FasL) na superfície celular (XU *et al.*, 1999), o que provavelmente protege células infectadas por promover a apoptose de linfócitos T citotóxicos vizinhos.

Dessa forma, Nef possui um amplo espectro de atividades que auxilia o vírus a evadir o sistema imune, modulando negativamente as proteínas CD4, CD28, complexos de histocompatibilidade do tipo 1 (MHC1) e do tipo 2 (MHC2), críticos para a comunicação do sistema imune, aumentando a infectividade e a replicação viral (MÜNCH *et al.*, 2001, 2007; SCHINDLER *et al.*, 2003). Em células apresentadoras de antígeno como macrófagos e células dendríticas, a diminuição dos níveis de MHC1 e de MHC2 na superfície celular assegura uma baixa apresentação de antígenos do vírus para as células T *Helper* ou para células T citotóxicas. Além disso, a diminuição de MHC1 na membrana plasmática, mediado por Nef, em células infectadas ajuda no escape dos linfócitos T citotóxicos específicas contra o vírus. Assim, o efeito global dessa estratégia é a redução da produção de anticorpos e da resposta específica contra o vírus, acarretando na diminuição do combate das células infectadas (KIRCHHOFF, 2009). Diversas atividades de Nef são conservadas entre diferentes linhagens de HIVs e SIVs

visando auxiliar o vírus a persistir eficientemente nas células do hospedeiro através da interação com o sistema imune do hospedeiro (KIRCHHOFF, 2008).

Foster e Garcia, em 2008, publicaram uma revisão elencando as quatro principais funções de Nef que contribuem para a patogênese do HIV (Fig. 6); funções estas que foram reafirmadas por Mwimanzi e colaboradores em 2013. São elas: diminuição da expressão de CD4, diminuição da expressão de MHC1, a ativação de Pak2 e aumento da infectividade viral (FOSTER & GARCIA, 2008; MWIMANZI *et al.*, 2013). Cada função é geneticamente separada entre si e, portanto, representam alvos distintos de Nef (FOSTER *et al.*, 2001).

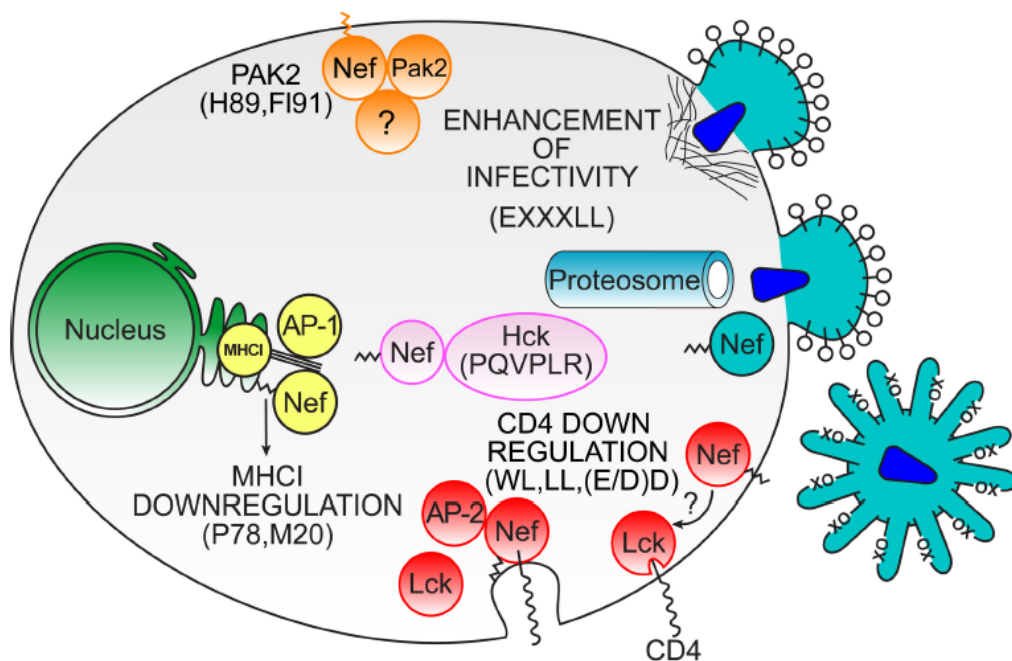


Figura 6: Diagrama ilustrando as quatro principais funções de Nef-HIV1. Em vermelho, representa a remoção de CD4 por Nef da superfície celular. Dois processos são demonstrados: à direita, Nef se

liga a membrana plasmática através do grupo miristol e desacopla a proteína tirosina quinase específica de linfócito (Lck) da cauda citoplasmática de CD4 (indicado em "?" significa que o sítio e o mecanismo deste processo ainda é desconhecido e pode ser indireto); a esquerda, Lck foi dissociado da região C-terminal de CD4 e Nef se liga ao CD4 e a proteína adaptadora 2 (AP-2) facilita a formação de vesículas revestidas por clatrina que leva a internalização de CD4. Em amarelo à esquerda, Nef diminui a expressão de MHC1 da membrana celular, ligando-se a cauda citoplasmática de MHC1 e da proteína adaptadora 1 (AP-1) na rede trans-golgi (TGN) inibindo o tráfego de MHC1 até a superfície celular. Em laranja, Nef ativa a Pak2, e a identidade de uma ou mais proteínas que estão envolvidas neste processo ainda não são conhecidas (representada por "?"). Em rosa, Nef se liga no citosol da célula à proteína quinase hematopoiética (Hck), ativando-a. Em azul, Nef aumenta intrinsecamente a infectividade viral de HIV-1 (adaptado de FOSTER & GARCIA, 2008)

2.7. Nef X CD4

CD4 é uma glicoproteína expressa na superfície celular em linfócito T que possui especificidade pelo MHC2 e tem papel chave na ativação e na maturação de células T (SWAIN, 1983). A proteína CD4 é o co-receptor requerido para a infecção por HIV (ROETH *et al.*, 2004). Contudo, ela é continuamente produzida na via secretória celular e presente na superfície das células infectadas após a entrada do vírus e, dessa forma, é um problema por vários motivos. Por causa da capacidade de formarem um complexo, a co-expressão de CD4 com as glicoproteínas do

envelope viral interrompe o tráfego tanto de Env para os sítios de replicação viral. Mais frequentemente, a presença do CD4 na superfície celular reduz a capacidade desta partícula recém-formada brotar adequadamente e ser liberada da célula produtora e, conseqüentemente, reduzindo a infectividade viral. HIV1 neutraliza esse efeito com a atividade de duas proteínas, Vpu e Nef (LAMA *et al.*, 1999). Embora ainda existam algumas dúvidas, vários trabalhos observaram que Nef não afeta severamente o transporte de CD4 para a superfície celular, mas ele drasticamente diminui o tempo de meia vida de CD4 que consegue chegar à membrana plasmática, direcionando-o para a degradação lisossomal (ARORA *et al.*, 2002; DOMS & TRONO *et al.*, 2000; PIGUET *et al.*, 1998).

Acredita-se que a diminuição do tempo de meia vida de CD4 na membrana plasmática é devido à ligação de Nef com a região C-terminal de CD4 exposta no citosol. De fato, foi demonstrado que Nef se liga a cauda citoplasmática de CD4 em sistemas de duplo híbrido em leveduras (ROSSI *et al.*, 1996), em ensaios de purificação de proteínas (GRZESIEK *et al.*, 1996; HARRIS & NEIL, 1994, PREUSSER *et al.*, 2001), em lisado celular (JIM *et al.*, 2004) e em células vivas (BENTHAM *et al.*, 2003; CLUET *et al.*, 2005). A análise por ressonância magnética nuclear (NMR) demonstrou que há uma interação física direta que ocorre entre o núcleo hidrofílico de Nef e uma sequência específica de aminoácidos

(QIKRLLSEKKT) da região C-terminal de CD4 (GREENBERG *et al.*, 1998). *In vitro*, essa interação foi levemente fraca, mas altamente específica, em que o motivo de dileucina de CD4 pareceu ser bastante importante para a ligação (GREENBERG *et al.*, 1998). Contudo, já foi sugerido que outros aminoácidos na região C-terminal de CD4 contribui para a interação com Nef (PREUSSER *et al.*, 2001). *In vivo* podem existir outros fatores que estabilizam e alteram essa interação, porque o motivo de dileucina não foi preciso quando a interação foi detectada *in vivo* (BENTHAM *et al.*, 2003; CLEUT *et al.*, 2005).

Nef possui três domínios na região C-terminal que são requeridos para a sua função de diminuir a expressão de CD4: um motivo ácido-dileucina (EXXXLL₁₆₅) e dois motivos diácido (EE₁₅₅ e DD₁₇₅). Os papéis dos domínios de dileucina e do diácido aspártico já são bem elucidados: a mutação nesses motivos anula completamente a atividade de Nef. Contudo, o papel do motivo do ácido glutâmico ainda é controverso: um trabalho reportou que Nef requer esse motivo para sua atividade com o CD4, enquanto outro não observou nenhum efeito (JANVIER *et al.*, 2001; PIGUET *et al.*, 1999). Vários modelos com Nef mediando o transporte de CD4 já existem, cada um baseado em uma premissa comum: Nef se liga a cauda citoplasmática de CD4 e recruta alguns fatores celulares para transportar o CD4 da membrana plasmática para a degradação lisossomal (Fig. 7). Os fatores celulares

potenciais que são requeridos para essa função já foram relatados, como o v-ATPase (GEYER *et al.*, 2002; MANDIC *et al.*, 2001), a proteína adaptadora 2 (AP-2) (CRAIG *et al.*, 2000), ARF1 (FAURE *et al.*, 2004) e β -COP (PIGUET *et al.*, 1998). Entretanto, já foi publicado que a proteína mais relevante é o AP-2: Nef forma um complexo com AP-2 e com a cauda de CD4, acarretando na internalização de CD4 em vesículas revestidas por clatrina na membrana plasmática, levando-o a degradação lisossomal (CHAUDHURI *et al.*, 2007, 2009).

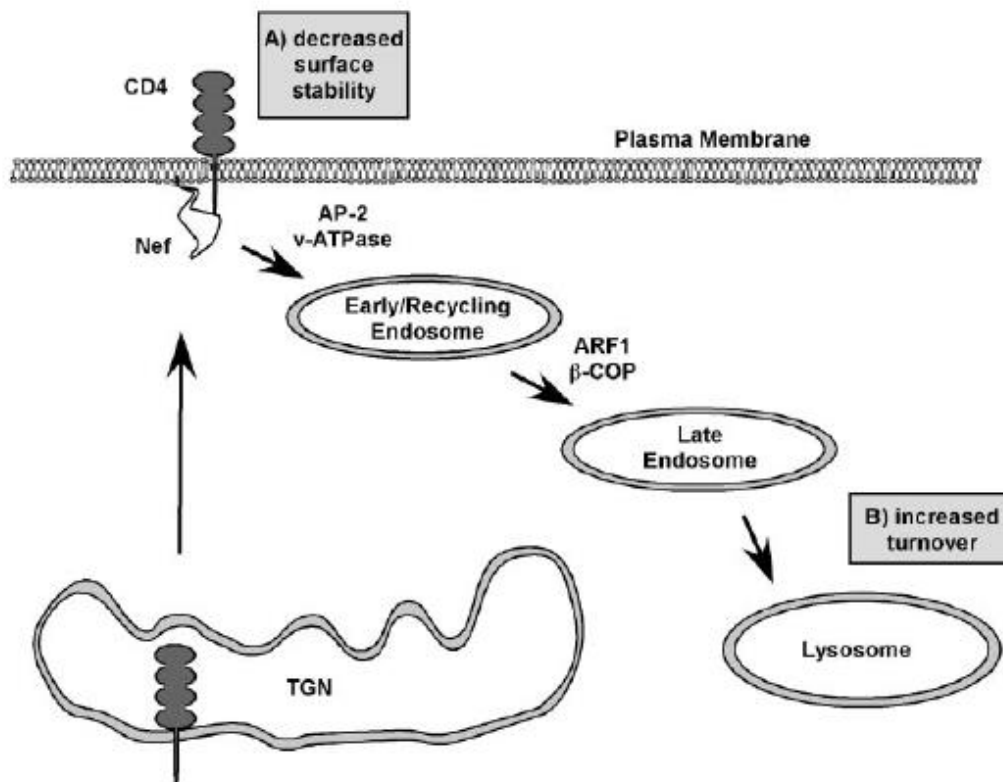


Figura 7: Representação esquemática dos mecanismos para a diminuição da expressão de CD4 induzida por Nef. (A) Nef se liga a cauda citoplasmática de CD4 na membrana plasmática, resultando

na sua internalização. (B) Nef causa a degradação de CD4 a através do transporte em compartimentos ácidos até o lisossomo (adaptado de ROETH & COLLINS, 2006).

2.8. VSV-G e sua funcionalidade no estudo do tráfego intracelular de proteínas na via secretória

A glicoproteína da cepa mutante ts045 do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) é amplamente utilizada para o estudo do transporte de moléculas entre compartimentos da via secretória (PRESLEY *et al.*, 1997; WAKANA *et al.*, 2013). Em condições normais, VSV-G é sintetizada e dobrada no retículo endoplasmático (RE), segue para o complexo de Golgi, onde sofre novas glicosilações, sendo então transportada para a membrana plasmática. Entretanto, VSV-G não atinge a sua conformação correta no RE quando as células são incubadas a 40 °C, provocando a sua retenção nesta organela. Entretanto, o dobramento correto pode ser alcançado quando a temperatura de incubação celular é reduzida, sendo a proteína liberada prontamente do RE nessas condições. Essa característica, combinada ao fato de que a exportação de proteínas transmembrana a partir do complexo de Golgi é bloqueada quando as células são incubadas a 20 °C, proveem uma estratégia para acompanhar *in vivo* o transporte de VSV-G do RE à membrana plasmática passando pelo Complexo de Golgi (PRESLEY *et al.*, 1997; WAKANA *et al.*, 2013). Desta

forma, é possível acompanhar o transporte desta proteína em células vivas quando VSV-G é fusionada a uma proteína fluorescente.

3. Objetivo

Promover um estudo molecular que pode auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na alteração do tráfego de CD4 por Nef-HIV1.

4. Objetivos específicos

.Construção e clonagem de VSVG Δ CT:CD4-CT em pEGFP-N1.

.Transfecção de pEGFP-N1 VSVG Δ CT:CD4-CT em células HeLa.

.Identificar a localização celular de VSVG Δ CT:CD4-CT em diferentes temperaturas

.Identificar a funcionalidade de VSVG Δ CT:CD4-CT para o estudo da alteração do tráfego de CD4 por Nef-HIV1.

5. Metodologia

5.1. Estratégia de clonagem

Para a construção da ferramenta, foi realizado o desenho de um par de *primers* para amplificar um fragmento de DNA codificando VSV-G sem a região C-terminal (VSVG Δ CT) e outro para amplificar a sequência codificadora da região C-terminal do CD4 (CD4-CT), ambos pela técnica de reação em cadeia da polimerase

(PCR). O desenho dos *primers* foi feito de tal forma que nas extremidades do produto de PCR de VSVG Δ CT seria flanqueado por sítios de clivagem para *EcoRI* na região 5' e para *SalI* na região 3' e os produtos de PCR de CD4-CT seria flanqueado por sítios de clivagem para *SalI* na região 5' e para *BamHI* na região 3' (Fig. 8). A construção seria então clonada no plasmídeo pEGFP-N1 (CLONTECH's Living Colors[®]) (Fig. 9) no sítio de múltipla clonagem entre os sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *BamHI*.

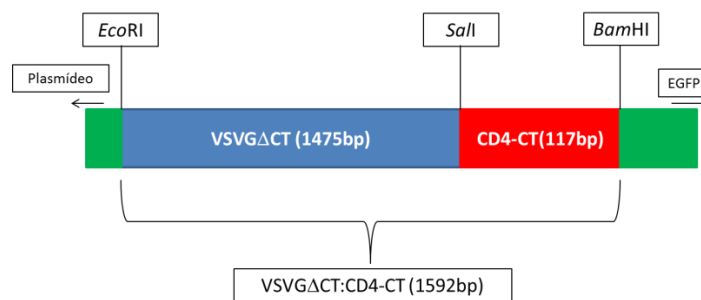


Figura 8: Representação da construção VSVG Δ CT:CD4-CT.

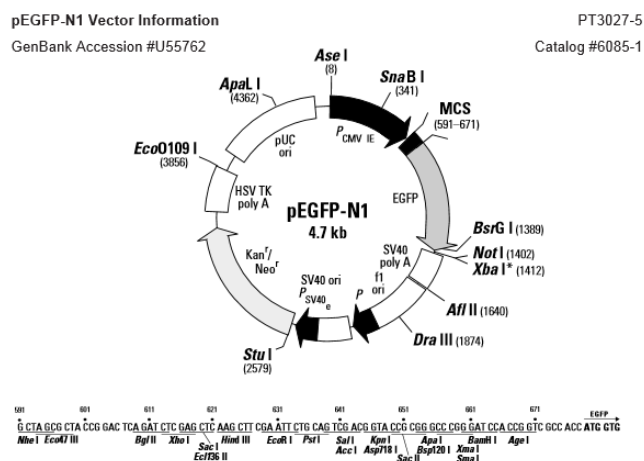


Figura 9: Mapa do plasmídeo pEGFP-N1 (CLONTECH's Living Colors[®]).

5.2. Desenho dos *primers*

Para o desenho dos *primers*, foi consultado no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) as sequências codificadoras para o VSV-G (GenBank: HQ588116.1) e para o CD4 (NCBI Reference Sequence: NM_000616.4), bem como a sequência de aminoácidos codificados por cada sequência. Tendo conhecimento das sequências de aminoácidos, com o auxílio da ferramenta TMHMM, foi investigado as sequências codificadoras da região extracelular e transmembrana do VSV-G (Fig. 10) e da região citoplasmática do CD4 (Fig. 11). Em seguida, foi feito o desenho dos *primers* (Tabela 1), com o auxílio da ferramenta BioEdit v7.2.5 Ibis Biosciences. Os *primers* foram produzidos pela empresa EXXTEND[®].

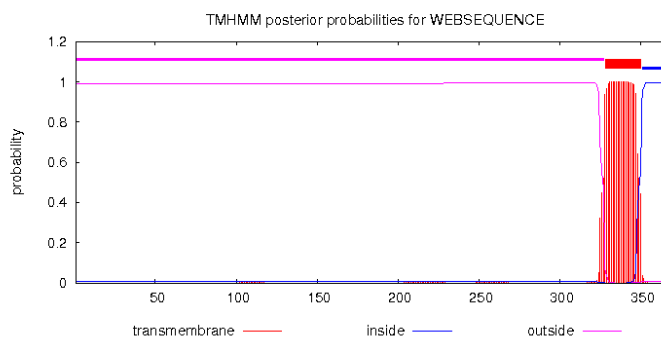
<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
VSVG Δ CT_sense	CGGAATTCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAG
VSVG Δ CT_antisense	AGGTCGACTTTAATGCAAAGATAAATACC
CD4-CT_sense	TAGTCGACAGGTGCCGGCACCGAAGGC
CD4-CT_antisense	GCGGATCCCGAATGGGGCTACATGTCTTC

Tabela 1: Sequência dos *primers* para amplificação das sequências codificadoras de VSVG Δ CT e de CD4-CT. Em azul, o sítio de clivagem para a enzima de restrição *EcoRI*; em vermelho, o sítio de clivagem para enzima de restrição *SalI*; em verde, o sítio de clivagem para a enzima de restrição *BamHI*.

TMHMM result

[HELP](#) with output formats

```
# WEBSEQUENCE Length: 371
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 1
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 22.89095
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.00842
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 327
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 328 350
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 351 371
```



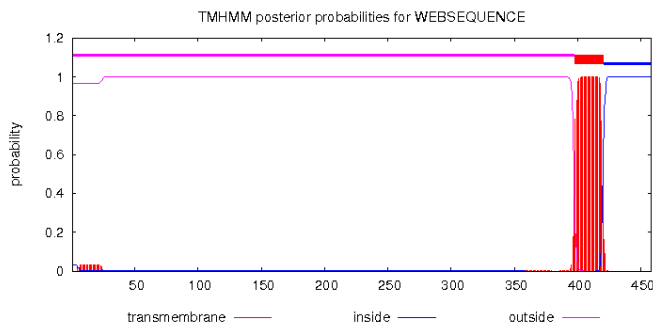
ppmtogif: computing colormap... ppmtogif: 5 colors found

Figura 10: Resultado da análise feita pela ferramenta TMHMM para a sequência de aminoácidos do VSV-G. Note que a parte extracelular e transmembrana predita do VSV-G vai do aminoácido 1 até o aminoácido 350.

TMHMM result

[HELP](#) with output formats

```
# WEBSEQUENCE Length: 458
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 1
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 23.40978
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.60736
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.03290
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 397
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 398 420
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 421 458
```



ppmtogif: computing colormap... ppmtogif: 5 colors found

Figura 11: Resultado da análise feita pela ferramenta TMHMM para a sequência de aminoácidos do CD4. Note que a parte intracelular predita do CD4 vai do aminoácido 421 até o aminoácido 458.

5.3. Reação de PCR para amplificação das sequências codificadoras de VSVG Δ CT e de CD4-CT, eletroforese dos produtos de PCR e purificação

Para a reação de PCR, foi feita o preparo da reação de acordo com a tabela 2 e submetemos o produto da reação a uma eletroforese. Para o VSVG Δ CT, foi feita em duplicada, diminuindo a 100 vezes a sua concentração de DNA para a 2ª reação. Os parâmetros dos ciclos do PCR se encontram na tabela 3. Os produtos de PCR relativo ao CD4-CT e a VSVG Δ CT (1ª e 2ª Reação) foram submetidos a uma eletroforese. Todas as eletroforeses apresentadas neste trabalho foram realizadas em gel de agarose, tampão de corrida TBE 0,5x, sob voltagem constante 100 volts, corado com brometo de etídeo e as imagens foram capturadas no aparelho BioDoc-It[®] Imaging System (UVP). Para o CD4-CT, todo o produto de PCR foi submetido novamente a eletroforese em um gel de poço duplo, a banda foi recortada e purificada com kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-UP System Promega com eluição final de 40 μ L. Para o VSVG Δ CT, apenas a 2ª reação foi utilizada para dar prosseguimento ao experimento; o volume restante do produto de PCR foi diretamente purificado com o kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-UP System Promega com eluição final de 40 μ L.

	VSVG Δ CT (1ª Reação)	VSVG Δ CT (2ª Reação)	CD4-CT
DNA	0,5 μ L (227ng/ μ L)	1 μ L 2,27ng/ μ L	1 μ L (88 ng/ μ L)
Tampão	5 μ L pFU Agilent, GE buffer 10X	5 μ L pFU Agilent, GE buffer 10X	5 μ L pFU Agilent GE buffer 10X
Primer sense	1 μ L primer VSVG Δ CT_sense (10 pmol/ μ L)	1 μ L primer VSVG Δ CT_sense (10 pmol/ μ L)	1 μ L primer CD4-CT_sense (10 pmol/ μ L)
Primer antisense	1 μ L primer VSVG Δ CT_antisense (10pmol/ μ L)	1 μ L primer VSVG Δ CT_antisense (10pmol/ μ L)	1 μ L primer CD4-CT_antisense (10 pmol/ μ L)
DNTP	1 μ L DNTP (10nmol)	1 μ L DNTP (10nmol)	1 μ L (10 nmol)
Enzima	0,2 μ L pFU Agilent GE	0,2 μ L pFU Agilent GE	0,2 μ L pFU Agilent, GE
Água	41,3 μ L	41,3 μ L	40,8 μ L
Volume Final	50 μ L	50 μ L	50 μ L

Tabela 2: Reação de PCR para amplificar as sequências codificadoras de VSVG Δ CT e de CD4-CT

Ciclos	Temperatura	Tempo	Veze
Desnaturação	95 °C	3 min	1x
Desnaturação	95 °C	30 s	34x
Anelamento	55 °C	30 s	
Extensão	72 °C	2 min	
Extensão	72 °C	1 min	1x
Store	04 °C	∞	1x

Tabela 3: Ciclos das reações em cadeira de polimerase

5.4. Reação de digestão de VSVG Δ CT, de CD4-CT e de pEGFP-N1

Foi realizado as digestões por 1 hora a 37 °C a partir do material eluído do "clean up" de VSVG Δ CT e CD4-CT citados anteriormente, bem como do plasmídeo pEGFP-N1, de acordo com os parâmetros encontrados na tabela 4. Nos tempos de 0min, 20min e 40min foram recolhidos 1 μ l da reação com o pEGFP-N1 e estas

amostras foram submetidas a uma eletroforese e as imagens foram capturadas para verificar se o plasmídeo foi cortado por pelo menos uma enzima.

Após as digestões, para o plasmídeo foi realizado a inativação das enzimas a 65°C por 20 minutos e, posteriormente, acrescentado 5 µL da enzima SAP (do inglês, *Shrimp Alkaline Phosphatase*) da Promega e incubado a 37°C por 1 hora. A SAP irá remover os fosfatos das extremidades fosforiladas do DNA, sendo que a desfosforilação ajuda a prevenir a religação do plasmídeo de DNA linearizado. Em seguida, foi realizado o "clean up" com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System Promega, com eluição final de 45µL. Para as digestões, do VSVGΔCT e CD4-CT foi realizado o "clean up" com o mesmo kit e diluídos igualmente com 45 µL. Todas as amostras foram congeladas.

	pEGFP-N1	VSVGΔCT	CD4-CT
DNA	3 µL	40 µL	40 µL
Enzima	2 µL <i>EcoRI</i> Thermo Scientific	2 µL <i>EcoRI</i> Thermo Scientific	2 µL <i>SaI</i> Thermo Scientific
Enzima	2 µL <i>Bam</i> HI Fermentas	2 µL <i>SaI</i> Thermo Scientific	2 µL <i>Bam</i> HI Fermentas
Tampão	5 µL Tampão O Thermo Scientific	5 µL Tampão O Thermo Scientific	5 µL Tampão O Thermo Scientific
Água	36 µL	1 µL	1 µL
Volume Final	50 µL	50 µL	50 µL

Tabela 4: Reação de digestão de pEGFP-N1, de VSVGΔCT e de CD4-CT.

5.5. Reação de ligação e triagem de clones recombinantes em potencial

As amostras foram descongeladas e 1 µL de cada uma foi recolhida para serem submetidas a uma eletroforese a fim de verificar a integridade das amostras.

Em seguida, as reações de ligação foram preparadas de acordo com a tabela 5 e incubadas por 3 horas à temperatura ambiente.

Tubo	pEGFP-N1	VSVG Δ CT	CD4-CT	T4 Dna Ligase Thermo Scientific	Tampão 10x Thermo Scientific	Água Milli-Q	Volume final
A	3 μ L	-	-	-	2 μ L	15 μ L	20 μ L
B	3 μ L	-	-	1 μ L	2 μ L	14 μ L	20 μ L
C	3 μ L	5 μ L	9 μ L*	1 μ L	2 μ L	-	20 μ L
D	3 μ L	5 μ L	9 μ L	1 μ L	2 μ L	-	20 μ L

Tabela 5: Reação de ligação. O tubo A é o controle negativo para ver se o plasmídeo se religou sozinho e o tubo B é o controle conseguiu religar o plasmídeo mesmo após SAP. Os tubos C e D são as ligações de fato. *Indica que neste tubo os 9 μ L de CD4-CT foram colocados após a primeira hora

Após as 3 horas de ligação, foi realizada a transformação por choque térmico: 5 μ L de cada tubo para cada 100 μ L de *Escherichia coli* DH5 α Ca⁺ competente. Todo o volume de cada transformação foi plaqueado em placas separadas contendo 20 mL de meio sólido de Luria-Bertani (LB) + 20 μ L de antibiótico Canamicina (100 μ g/ml) e incubadas por 16 horas a 37 °C.

Após este período, verificou-se que as 4 placas apresentaram crescimento de colônias; contudo, a placa proveniente do plaqueamento do tubo D obteve mais colônias. Dessa forma, 12 colônias provenientes desta placa foram escolhidas aleatoriamente para serem inoculadas separadamente em 3 mL de meio líquido de LB + 3 μ L de antibiótico Canamicina (100 μ g/ml) em tubos Falcon de 15 mL. Os tubos foram incubados sob agitação de 200 rpm, a 37 °C por 16 horas. A partir destes

inóculos, foram realizadas 12 extrações DNA plasmideal pelo método de lisozima, segundo o protocolo simplificado na Fig. 12.

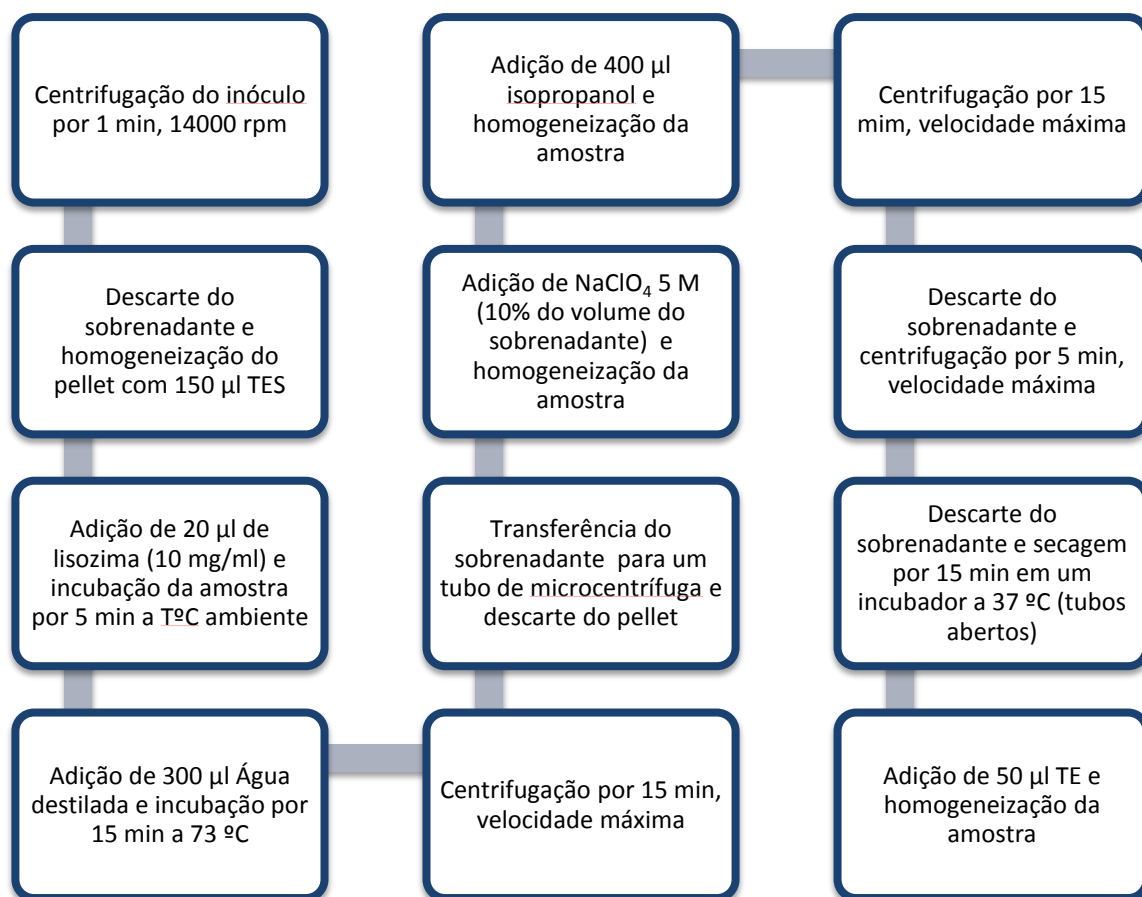


Figura 12: Fluxograma representativo da extração de DNA plasmideal pelo método da lisozima.

Após a extração de DNA, foi realizada a digestão por 1 hora, 37 °C com os seguintes parâmetros: 3 µL DNA, 1 µL Tampão O Thermo Scientific, 0,2 µL *Bam*HI Biolabs, 0,2 µL *Eco*RI Thermo Scientific e 5,6 µL água (volume final: 50 µL). Como controle, utilizou-se 1 µL do pEGFP-N1 e 7,6 µl de água e a mesma quantidade e tipo de enzima e tampão citados anteriormente.

Após o tempo de incubação, as amostras foram submetidas à eletroforese e a foto do gel foi capturada. Apenas um clone tinha potencial para ser positivo (Clone 1).

Sendo assim, 10 µl do inóculo relativo ao Clone 1 foi plaqueado em 20 mL de meio sólido de LB + 20 µL de antibiótico Canamicina (100 µg/ml) e incubados overnight a 37°C. Em seguida, uma colônia foi adicionado a um tubo Falcon de 50 ml contendo 5 mL de meio líquido de LB + 5 µL de antibiótico Canamicina (100 µg/ml) e incubados sob agitação de 200 rpm, a 37 °C por 18 horas. Após esse período, foi realizada a extração de DNA plasmidial kit Wizard® Plus SC Minipreps DNA Purification System Promega com eluição final de 100 µL água livre de nuclease. A partir deste DNA do Clone 1, foram realizados 3 procedimentos assegurar a positividade da construção: Digestão de confirmação, PCR e sequenciamento.

A digestão de confirmação foi realizada segundo os parâmetros da tabela 6 e incubados por 1 hora a 37°C. Em seguida, as alíquotas foram submetidas à eletroforese e a foto capturada.

	Clone 1	Clone 1	Clone 1
DNA	1 µL (50 ng/µl)	1 µL (50 ng/µl)	1 µL (50 ng/µl)
Enzima	0,25 µL <i>EcoRI</i> Thermo Scientific	0,25 µL <i>EcoRI</i> Thermo Scientific	0,25 µL <i>SaI</i> Thermo Scientific
Enzima	0,25 µL <i>BamHI</i> Fermentas	0,25 µL <i>SaI</i> Thermo Scientific	0,25 µL <i>BamHI</i> Fermentas
Tampão	1 µL Tampão O Thermo Scientific	1 µL Tampão O Thermo Scientific	1 µL Tampão O Thermo Scientific
Água	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Volume Final	10 µL	10 µL	10 µL

Tabela 6: Reação de digestão para confirmação do Clone 1.

A reação de PCR foi preparada da seguinte forma: 2 µL MgCl₂ Thermo Scientific, 5 µL buffer 10x Thermo Scientific, 0,2 µL taq Thermo Scientific, 1 µL DNTP (10nmol), 1 µL VSVGΔCT_sense (10 pmol/µL), 1 µL CD4-CT_antisense (10pmol µL), 1 µL DNA 3,27 ng/µL (Clone 1) e 38.8 µL de água. Os ciclos foram seguidos de acordo com a tabela 3. O produto de PCR foi submetido a uma eletroforese e o uma foto do gel foi capturada.

No caso do sequenciamento, foi escolhida a técnica de sequenciamento automático por terminação de cadeia no ABI3100 Prism[®] da Applied Biosystems[®], de acordo com o protocolo BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Para isto, duas reações foram realizadas: uma com o primer 1 µL CMV2_sense (10 µmol/µL), para verificar o início da sequência codificadora de VSV-G na construção, e o outro com o primer 1 µL eGFP_antisense (10 µmol/µL), para verificar o final da construção. Ao final da corrida, os dados foram recuperados em formato de eletroferograma e de texto (fasta) e analisados no programa BioEdit v7.2.5 Ibis Biosciences.

5.6. Preparação das células

As células utilizadas para o experimento foram HeLa (ATCC[®] CCL-2[™]). Primeiramente as células foram descongeladas, deixadas sob cultivo na estufa (37 °C, 5% CO₂) em placa de 10 ml em meio contendo 10 ml de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) da Gibco[®] Life Technologies[™], suplementado com 10% Soro Fetal Bovino da Gibco[®] Life Technologies[™] e 1% antibiótico (100 U/ml Penicilina + 100 ng/ml Estreptomicina) da Gibco[®] Life Technologies[™]. Após uma semana com o meio sendo trocado a cada 48 horas, as células estavam prontas para dar continuidade ao experimento: as células foram transferidas para 8 poços em uma placa de 24 poços, sendo que cada poço continham 100.000 células, uma lamínula de vidro para microscopia e 500 µl de meio. A placa foi, então, incubada na estufa (37 °C, 5% CO₂) por 24 horas.

5.7. Transfecção de DNA e estratégia para testar a funcionalidade de VSVG Δ CT:CD4-CT

Para a transfecção de DNA em HeLa (ATCC[®] CCL-2[™]), foi escolhida a técnica de lipo-transfecção e o protocolo da Invitrogen[™] Life technologies (Cat. No. 11668027 e Cat. No. 1168-019) foi adaptado para este experimento. Primeiramente, foram preparados em tubos de micro-centrifuga as soluções que se encontram na tabela 7. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 5 min e depois os conteúdos do tubo A e do tubo C foram transferidos para os tubos B e D, respectivamente. O meio que estava nos poços foi retirado e 300 µl de PBS 1x foram acrescentados em cada poço; em seguida, o PBS foi retirado, 150 µl de Opti-MEM[®] I foi adicionado em cada poço e 100 µl da mistura proveniente da mistura do tubo A-B foi colocado em cada poço numerado de 1 a 4 e 100 µl da mistura proveniente da mistura do tubo C-D foi colocado em cada poço numerado de 5 a 8. Em seguida, a placa foi incubada por 1 hora na estufa. Após este período, o sobrenadante foi retirado dos poços e 500 µl de meio foi colocado em cada poço; a placa foi posteriormente incubada em uma estufa por 24 horas, a 40 °C com 5% CO₂. Os procedimentos que se seguiram foram adaptados de WAKANA *et al.*, 2013.

Tubos	DNA pEGFP-N1 VSVGΔCT:CD4-CT (1 µg/µl)	DNA pMCherry-N1 (Clontech) Nef-HIV1 (1 µg/µl)	Opti- MEM [®] I	Lipofectamine [®] 2000 Life Technologies [™]
A	4 µl	-	200 µl	-
B	-	-	200 µl	8 µl
C	4 µl	4 µl	200 µl	-
D	-	-	200 µl	8 µl

Tabela 7: Preparo das soluções para a transfecção.

Após o período de 24 horas, as lamínulas que se encontram no poço 1 e 5 foram retiradas e lavadas com PBS 1x por três vezes, fixadas com 500 µl de paraformaldeído 4%, lavadas com PBS 1x por três vezes e montadas em uma lâmina com 8 µl de Fluoromont-G[™] da SouthernBiotech. Após a adição de 0,5 µl de Ciclohexamida (20 ng/ml) da Sigma-Aldrich[®] em cada poço, o mesmo procedimento foi realizado com as lamínulas 2 e 6 após a incubação de 2 horas à 20 °C com 5%

CO₂, como as lamínulas 3 e 7 após a incubação de 30 min à 32 °C com 5% CO₂ e as lamínulas 4 e 8 após 1 hora à 32 °C com 5% CO₂. Em seguida, as lâminas foram levadas ao microscópio confocal Leica TCS SP5 do Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC) da FMRP-USP para visualização e captura de fotos.

6. Resultados e Discussão

6.1. Eletroforese dos produtos de PCR de VSVG Δ CT e CD4-CT

Após o PCR de CD4-CT e da 1^a reação de VSVG Δ CT, uma alíquota foi retirada para a eletroforese e a foto foi capturada (Fig. 13). Analisando os tamanhos da banda, é possível concluir que a amplificação foi efetuada. Para o CD4-CT, devido a presença de bandas do plasmídeo aonde se encontrava a sequência codificadora para CD4, todo o produto de PCR foi submetido novamente à eletroforese em gel de poço duplo (Fig. 14) e a banda de tamanho esperado foi recortada e purificada do gel. Para o VSVG Δ CT, foi realizada uma segunda reação de PCR, pois recortar a banda para purificação ou purificar diretamente o produto de PCR da 1^a reação para dar continuidade ao procedimento poderia acarretar em coleta de plasmídeo ou coleta de produtos diferentes de DNA amplificado. Dessa forma, a segunda reação de PCR para o VSVG Δ CT foi efetuada a partir de um *template* de DNA de concentração menor e uma alíquota foi retirada para ser submetida à eletroforese (Fig. 15). Em seguida, todo o produto de PCR foi purificado diretamente.

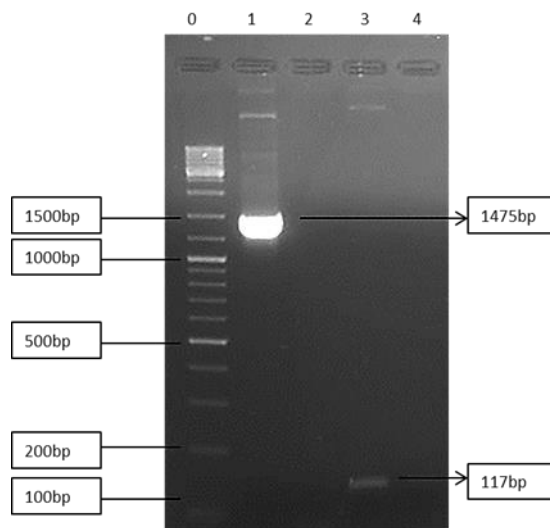


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR de CD4-CT e da 1ª reação de VSVG Δ CT. (0) Marcador Gene Ruler DNA mix Fermentas; (1) 1ª Reação de PCR VSVG Δ CT positivo – 1475bp; (2) 1ª Reação de PCR VSVG Δ CT controle negativo; (3) PCR CD4-CT positivo – 117bp ; (4) PCR de CD4-CT controle negativo.

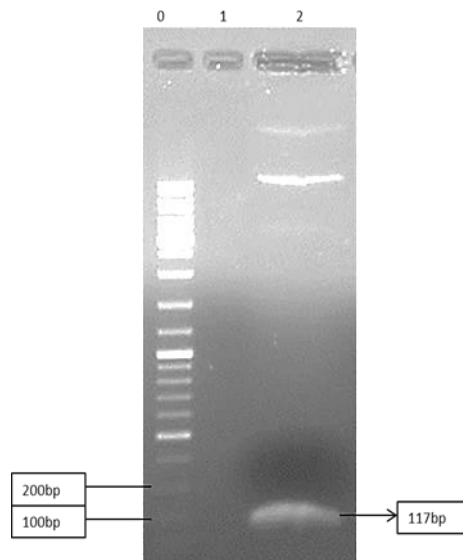


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR de CD4-CT em um poço duplo. (0) Marcador Gene Ruler DNA mix Fermentas; (1) Poço vazio; (2) PCR CD4-CT positivo – 117bp.

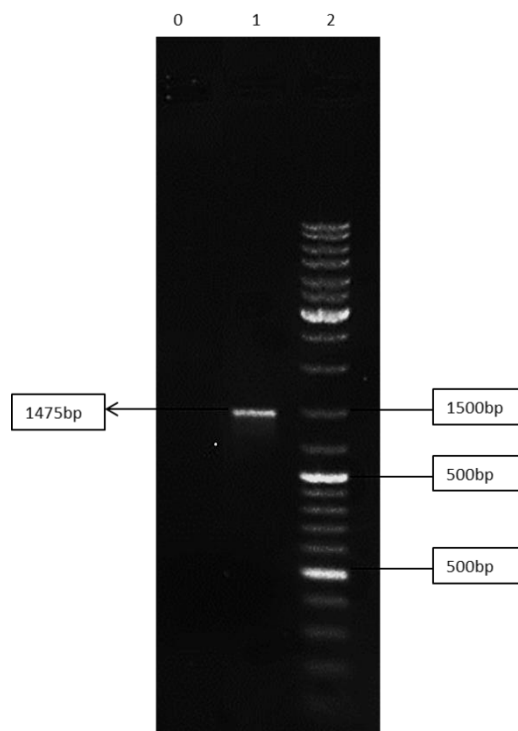


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR de 2ª reação de VSVG Δ CT. (0) 2ª Reação de PCR VSVG Δ CT controle negativo; (1) 2ª Reação de PCR VSVG Δ CT positivo; (2) Marcador Gene Ruler DNA mix Fermentas.

6.2. Reação de digestão de VSVG Δ CT, de CD4-CT e de pEGFP-N1

Nos tempos 0 min, 20 min e 40 min foram recolhidas alíquotas de 1 μ l da reação de digestão com o pEGFP-N1 e foram submetidos a eletroforese (Fig. 16). Esse procedimento foi feito para verificar se o plasmídeo abriu (se pelo menos cortou com uma das enzimas). Ao analisar a figura 17, é possível concluir que de fato o plasmídeo foi clivado com pelo menos uma enzima.

Após o descongelamento as digestões purificadas de VSVG Δ CT, de CD4-CT e de pEGFP-N1, 1 μ L de cada um foi coletado para ser submetida a eletroforese,

objetivando verificar a integridade das amostras. Ao fazer a análise da foto do gel (Fig. 17), é possível concluir que as amostras se encontram em bom estado, uma vez que o tamanho e a intensidade das bandas se encontram com boa qualidade e o arraste típico de amostras degradadas não foi verificado na foto.

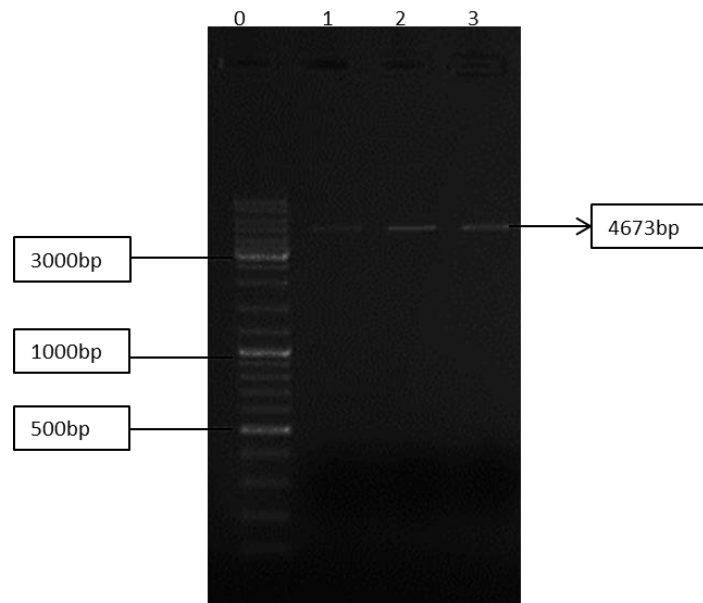


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% das alíquotas recolhidas da reação de digestão do pEGFP-N1; nos tempos (1) 0 min, (2) 20 min e (3) 40 min. O Marcador Gene Ruler DNA mix Fermentas se encontra representado por 0

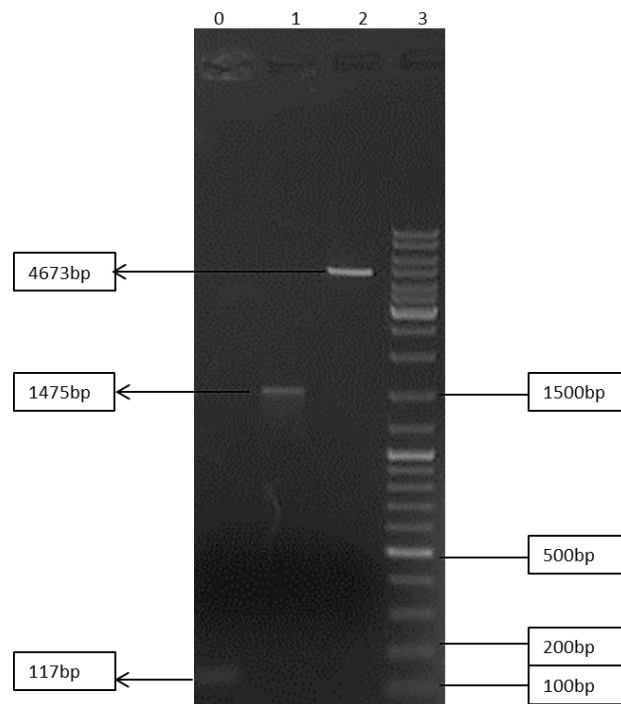


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% após o descongelamento das digestões purificadas.

(0) CD4-CT,;(1)VSVG Δ CT e (2) pEGFP-N1 (3) Marcador Gene Ruler DNA mix Fermentas.

6.3. Triagem do(s) clone(s) recombinante(s)

Após as 12 extrações de DNA dos inóculos provenientes de 12 colônias da placa D, 12 digestões foram realizadas, submetidas à eletroforese - e a foto capturada (Fig. 18). Ao analisar a foto, apenas o Clone 1 pareceu promissor, pois duas bandas apareceram na eletroforese proveniente de sua digestão: uma banda em torno de 4700pb (compatível com o tamanho de 4673bp do pEGFP-N1 digerido por *EcoRI* e *BamHI*) e uma banda de 1592bp (compatível com o inserto VSVG Δ CT:CD4-CT).

Para a confirmação da positividade da construção do Clone 1, foram feitas 3 procedimentos com o seu DNA: PCR, digestão de confirmação e sequenciamento. Uma alíquota do PCR foi submetida a eletroforese e a foto do gel foi capturada (Fig. 19); a banda de 1592 bp confirma a construção.

As alíquotas das digestões de confirmação a partir do DNA do Clone 1 foram submetidas a eletroforese e a foto do gel foi capturada (Fig. 20); quando o DNA do Clone 1 é digerido com *EcoRI* e *BamHI*, dois fragmentos são gerados: um de 1592 bp correspondente a *VSVG Δ CT:CD4-CT* e um de 4673 bp correspondente ao *pEGFP-N1*; quando o DNA do Clone 1 é digerido com *EcoRI* e *SalI*, dois fragmentos são gerados: um de 1475bp correspondente ao *VSVG Δ CT* e um de 4817 bp correspondente ao *pEGFP-N1* com *CD4-CT*; quando o DNA do Clone 1 é digerido com *BamHI* e *SalI*, dois fragmentos são gerados: um de 6175 bp correspondente ao *pEGFP-N1* com *VSVG Δ CT* e um de 117 bp correspondente ao *CD4-CT*. E a foto capturada comprova isso, exceto por este último em que o fragmento do *CD4-CT* não pode ser visualizado no gel devido ao fato que o azul de bromofenol do tampão de amostra migrou junto com o fragmento de DNA correspondente.

Para o sequenciamento, as sequências do Clone 1 provenientes da reação com o primer *CMV2_sense* e o *eGFP_antisense* foram analisadas a partir do BioEdit v7.2.5 Ibis Biosceinces (Fig 21) e a análise revelou que a construção

VSVG Δ CT:CD4-CT se encontram no *frame* correto entre si e com o plasmídeo, indicando que realmente o Clone 1 é positivo.

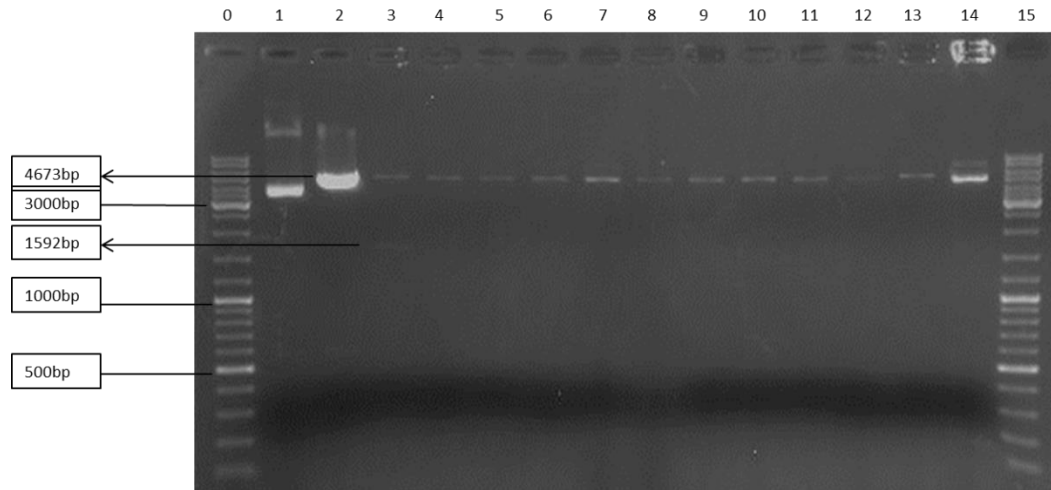


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 1% das 12 digestões provenientes de 12 extrações caseiras de DNA plasmideal pelo método de lisozima. (0) Marcador Gene Ruler DNA mix Fermentas; (1) pEGFP-N1 sem digerir; (2) pEGFP-N1 digerido; (3-14); Digestão dos clones 1-12; (15) Marcador Gene Ruler DNA mix Fermentas.

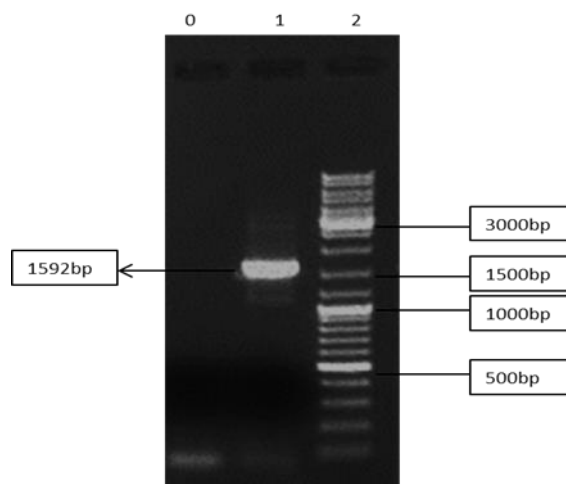


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR com o DNA do Clone 1. 0) Controle negativo da reação; (1) PCR com o DNA do Clone 1; (2) Marcador Gene Ruler DNA mix Fermentas.

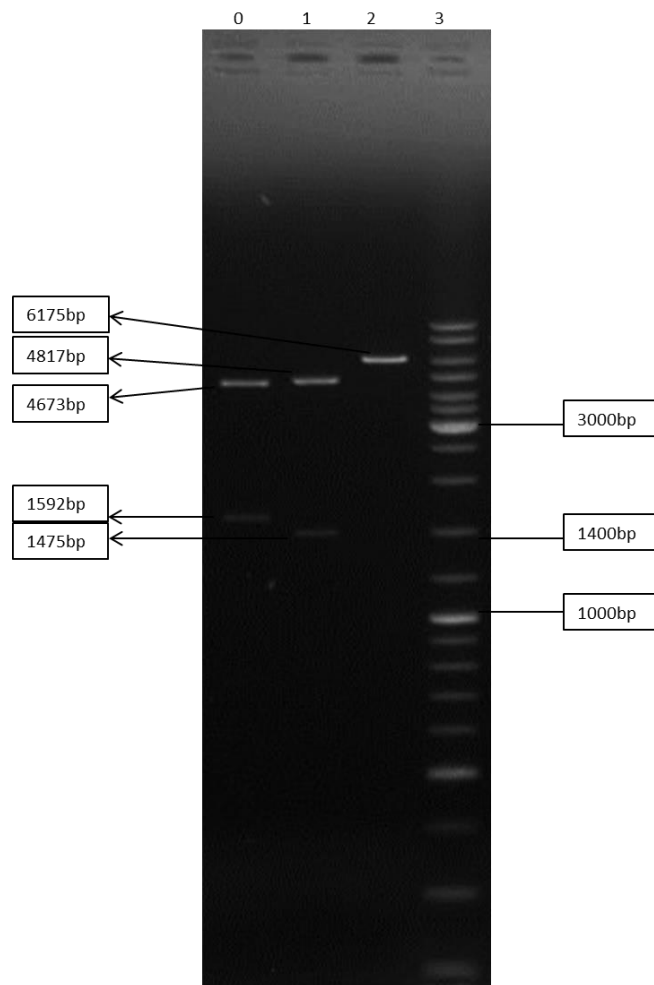
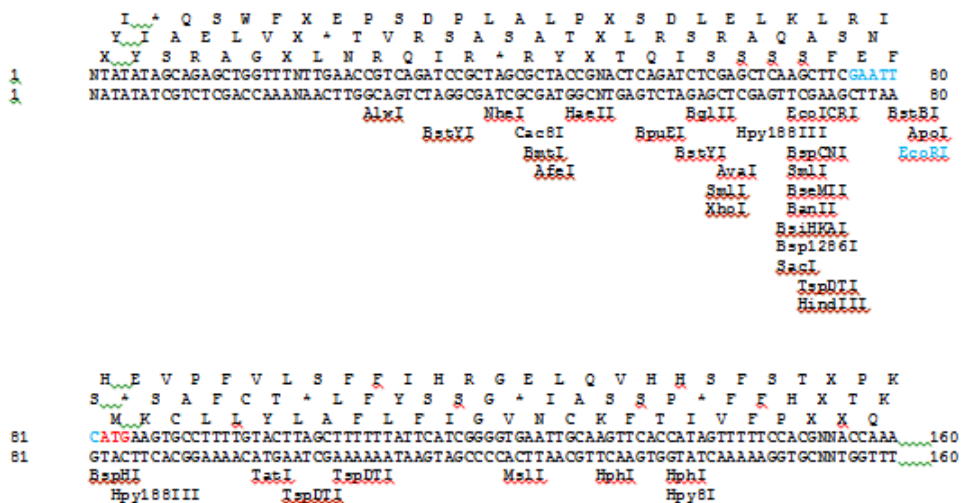


Figura 20: Eletroforese em gel de agarose 1% a partir das digestões de confirmação do Clone 1.

(0) Clone 1 digerido com *EcoRI* + *BamHI*; (1) Clone 1 digerido com *EcoRI* + *SalI*; (2) Clone 1 digerido com *BamHI* + *SalI*; (3) Marcador Gene Ruler DNA mix Fermentas.

A

Restriction Enzyme Map (primer Cmv2_sense)



B

Restriction Enzyme Map (primer eGFP_antisense)

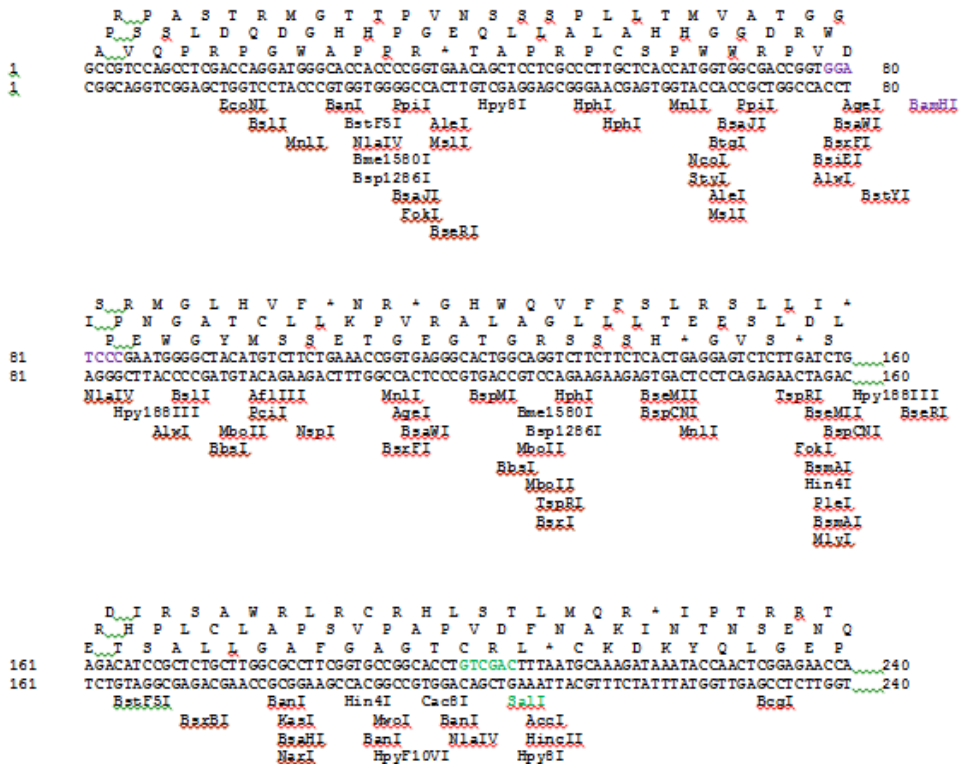


Figura 21: Resultado do sequenciamento do DNA do Clone 1 analisado pelo mapa de restrição gerado pelo do BioEdit v7.2.5 Ibis Biosciences. (A) Sequenciamento utilizando o *primer* Cmv2_sense e (B) Sequenciamento utilizando o *primer* eGFP_antisense. Em azul, em vermelho, em roxo e em

verde indicam, respectivamente, o sítio de restrição para *EcoRI*, o códon de iniciação ATG, o sítio de restrição para *BamHI* e o sítio de restrição *SalI*.

6.4. Teste da funcionalidade da ferramenta VSVG Δ CT:CD4-CT

Após a confirmação do Clone 1 como contendo a construção correta, pEGFP-N1 VSVG Δ CT:CD4-CT, o mesmo foi usado para preparação de DNA plasmideal usando o kit Wizard[®] Plus SC Minipreps DNA Purification System Promega, o qual foi usado para transfectar em células HeLa (ATCC[®] CCL-2[™]) crescidas sobre lamínulas de vidro. As células foram incubadas segundo as condições explicadas no ítem 5.7. As lamínulas de vidro montadas em uma lâmina foram visualizadas no microscópio confocal Leica TCS SP5 e as imagens foram capturadas (Fig. 22). Ao analisar as fotos, é possível observar o perfil de mudança da localização da proteína eGFP-VSVG Δ CT:CD4-CT. Quando a célula é incubada a 40 °C, a fluorescência mostra um padrão reticular disperso por toda a célula e evidenciando assim, o envelope nuclear. Essa marcação é típica do RE (Fig. 22A), sugerindo que eGFP-VSVG Δ CT:CD4-CT encontra-se retido nessa organela, provavelmente devido ao fato dela não ter atingido a conformação correta, conforme esperado (PRESLEY *et al.*, 1997; WANAKA *et al.*, 2013). A adição da ciclohexamida, antes da mudança de incubação para 20 °C, inibe a síntese proteica em eucariotos e, dessa forma, permite a visualização do transporte de uma população específica de proteínas na via

secretória. Quando ocorre mudança da temperatura de incubação para 20 °C, é possível verificar a migração da proteína do RE para o complexo de Golgi (Fig. 22B); e ao mudar a temperatura de incubação novamente para 32 °C, essa população de proteínas migra para a periferia da célula/membrana plasmática (Fig. 22C). Nesta temperatura, também é possível observar a marcação de estruturas puntiformes/vesiculares que provavelmente trata-se de endossomos ou vesículas de transporte.

A co-transfecção de NefHIV1-cherry e eGFP-VSVG Δ CT:CD4-CT em HeLa também foi efetuada e as células foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente. As lamínulas de vidro montadas em uma lâmina foram visualizadas no microscópio confocal Leica TCS SP5 e as imagens foram capturadas (Fig. 23). Ao analisar as imagens, é possível verificar algumas diferenças em relação ao controle sem Nef (Fig. 23): quando a temperatura de incubação muda para 32 °C (Fig. 23G-I) é possível observar que a proteína eGFP-VSVG Δ CT:CD4-CT fica mais acumulada em estruturas puntiformes, provavelmente endossomos, e está co-localizando com NefHIV1-cherry. Portanto, a cauda citosólica de CD4 foi suficiente para conferir a suscetibilidade a Nef, confirmando o que já foi encontrado em outros trabalhos os quais utilizaram outros tipos de estratégia e de ensaios (HARRIS & NEIL, 1994; GRZESIEK *et al.*, 1996; ROSSI *et al.*, 1996; PREUSSER *et al.*, 2001;

BETHAM *et al.*, 2003; JIM *et al.*, 2004; CLUET *et al.*, 2005). Além disso, é possível observar que o Nef é recrutado para endossomos quando CD4 está presente nesta organela e o mesmo não ocorre quando a cauda citosólica de CD4 está presente exposta na membrana do RE ou no complexo de Golgi. Esses resultados sugerem que Nef afeta o tráfego intracelular de CD4, apenas na via secretória tardia, quando essas moléculas já deixaram o complexo de Golgi. Portanto, os resultados corroboram com o modelo de redução dos níveis de CD4 na membrana plasmática ocorre devido a aceleração da endocitose de CD4, e não por retenção na via secretória ((PIGUET *et al.*, 1998; DOM & TRONO *et al.*, 2000; ARORA *et al.*, 2002; DORIA *et al.*, 2011). Esse processo poderá ser documentado em células vivas usando esta construção. Será possível também investigar uma possível aceleração no *turnover* de eGFP-VSVG Δ CT:CD4-CT devido ao direcionamento para os lisossomos.

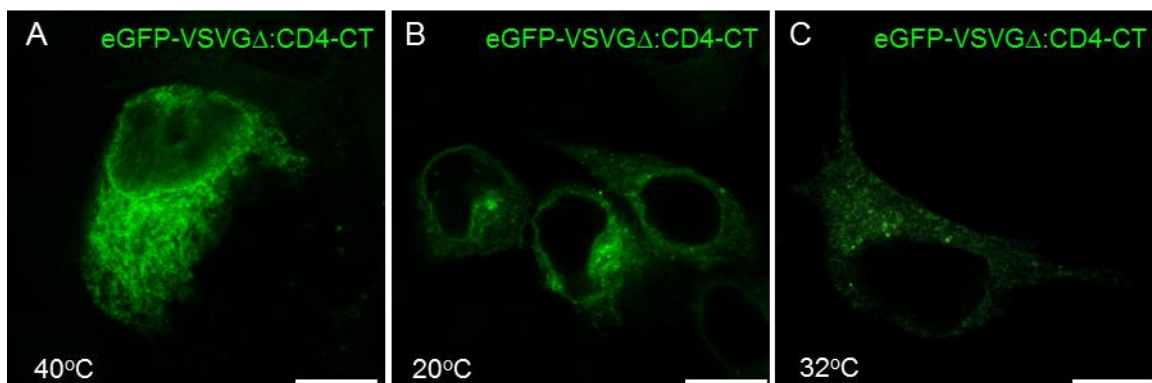


Figura 22: Imagens capturadas das células HeLa transfectadas com pEGFP-N1 VSVG Δ CT:CD4-CT.

(A) As proteínas ficam retidas no RE quando as células são incubadas por 24 horas a 40 °C. (B) As proteínas migram do RE para o complexo de Golgi quando ocorre mudança da temperatura para 20 °C por duas horas. (C) As proteínas migram do complexo de Golgi para a membrana plasmática após as mudanças de temperatura para 32 °C por uma hora. Barra = 10 μ m.

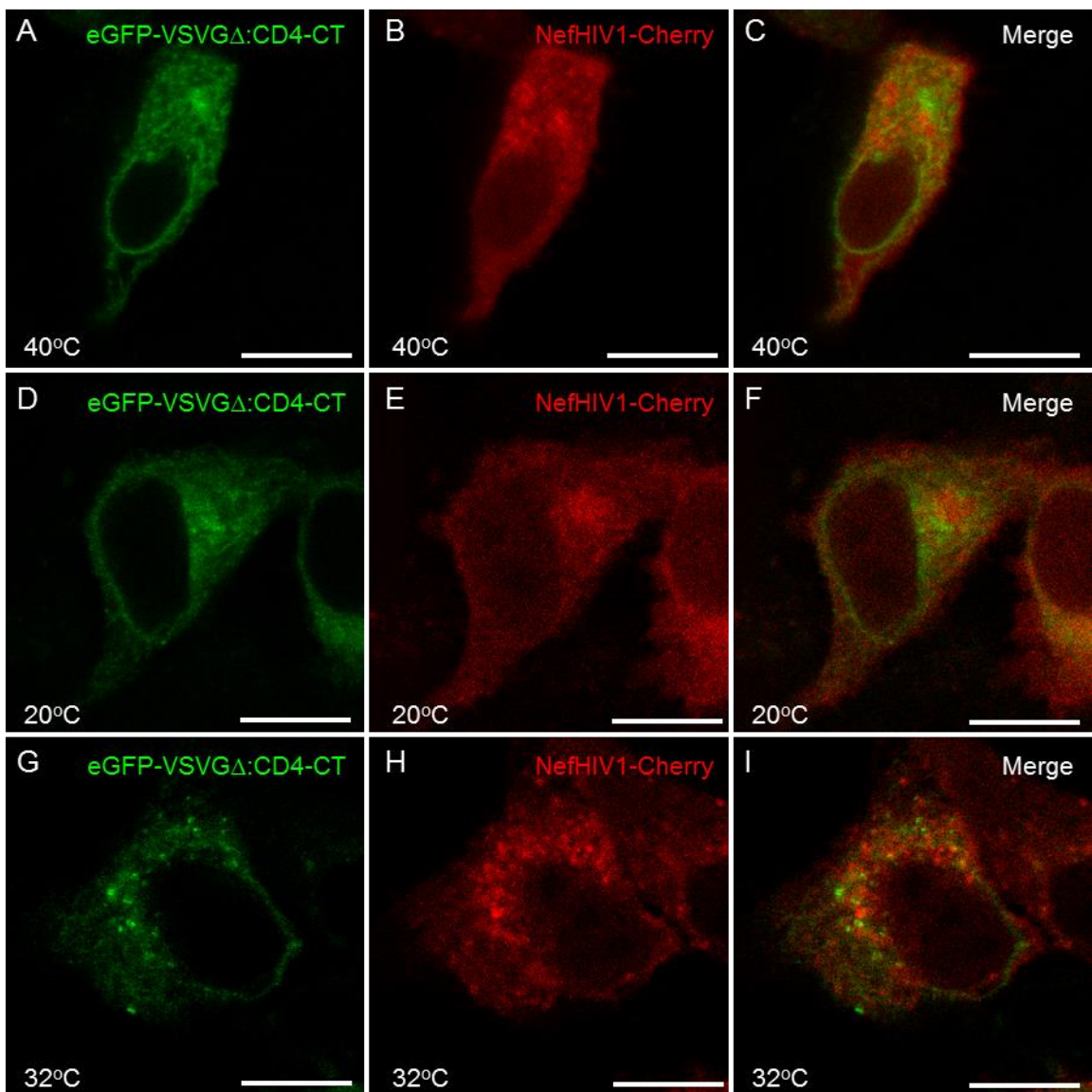


Figura 23: Imagens capturadas das células HeLa transfectadas com pEGFP-N1 VSVG Δ CT:CD4-CT e com pMCherry-N1 Nef-HIV1. (A-C) Células incubadas por 24 horas a 40 °C. Após este tempo, (D-F) as células foram incubadas por 2 horas a 20 °C e, após este período, (G-I) as células foram incubadas por 1 hora a 32 °C. Barra = 10 μ m.

7. Conclusões e Perspectivas

A partir dos resultados, é possível concluir que a construção de um plasmídeo para expressão de eGFP:VSVG Δ CT:CD4-CT foi efetuada e que ele pode ser uma ferramenta útil para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na alteração do tráfego intracelular de CD4 por Nef-HIV1. O experimento da co-transfecção de VSVG Δ CT:CD4-CT e Nef-HIV1 só foi realizado uma única vez e, portanto, exige repetições e novos estudos para comprovar a eficácia da ferramenta para o que foi proposto.

8. Considerações Finais

A realização do trabalho de conclusão de curso no Laboratório de Tráfego Intracelular da FMRP-USP foi uma experiência inovadora e enriquecedora na minha vida profissional e pessoal. Conheci pessoas dentro e fora da universidade que com certeza mantereis contato por um longo período. Foi um privilégio poder trabalhar em um laboratório de ponta na área em que atua.

9. Referências

ARYA, S. K.; GALLO, R. C.; Three novel genes of human T-lymphotropic virus type III: immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 83, n. 7, p. 2209-2213, 1986.

ARORA, V. K.; FREDERICKSEN, B. L.; GARCIA, J. V. Nef: agent of cell subversion. **Microbes Infect**, v. 4, n. 2, p. 189-199, 2002.

BARRE-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J. C.; REY, F.; NUGEYRE, M. T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGET, C.; XLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIQUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868-871, 1983.

BAUR, A. S.; SAWAI, E. T.; DAZIN, P.; FANTL, W. J.; CHENG-MAYER, C.; PETERLIN, B. M. HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. **Immunity**, v. 1, n. 5, p. 373-374, 1994.

BENTHAM, M.; MAZALEYRAT, S.; HARRIS, M. 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**, v. 84, n. 10, p. 2705-2703, 2003.

BERGER, E. A.; MURPHY, P. M.; FARBER, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 657-700, 1999.

CHAUDHURI, R.; LINDWASSER, O. W.; SMITH, W. J.; BONIFACINO, J. S. Downregulation of CD4 by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Is Dependent

on Clatrin and Involves Direct Interaction of Nef with the AP2 Clathrin Adaptor. **J Virol**, v. 81, n. 8, p. 3877-3890, 2007.

CHAUDHURI, R.; MATTERA, R.; LINDWASSER, O. W.; ROBINSON, M. S.; BONIFACINO, J. S.; A Basic Patch on α -Adaptin Is Required for Binding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef and Cooperative Assembly of a CD4-Nef-Ap-2 Complex. **J Virol**, v. 83, n. 6, p. 2518-2530, 2009.

CHENG-MAYER, C.; JANNELLO, P.; SHAW, K.; LUCIW, P. A.; LEVY, J. A. Differential effects of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. **Science**, v. 246, n. 493, p. 1629-1632, 1989.

CLUET, D.; BERTSCH, C.; BEYER, C.; GLOECKLER, L.; ERHARDT, M.; GUT, J. P.; GALZI, J. L.; AUBERTIN, A. M. Detection of human immunodeficiency virus type 1 Nef and CD4 physical interaction in living human cells by using bioluminescence resonance energy transfer. **J Virol**, v. 79, n. 13, p. 8629-8636, 2005.

COFFIN, J.; HAASE, A.; LEVY, J. A.; MONTAGNIER, L.; OROSZLAN, S.; TEICH, N.; TEMIN, H.; TOYOSHIMA, K.; VARMUS, H.; VOGT, P. What to call the AIDS virus?. **Science**, v. 321, n. 10, p. 6065, 1986.

CRAIG, H. M.; REDDY, T. R.; RIGGS, N. L.; DAO, P. P.; GUATELLI, J. C.; 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**, v. 271, n. 1, p. 9-17, 2000.

DOMS, R. W.; TRONO, D. The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. **Genes Dev**, v. 14, n. 21, p. 2677-2688, 2000.

DORIA, M. Role of the CD4 down-modulation activity of Nef in HIV-1 infectivity. **Curr HIV Res**, v. 9, n. 7, p. 490-495, 2011.

FACKLER, O. T.; KIENZLE, N.; KREMMER, E.; BOESE, A.; SCHRAMM, B.; KLIMBAIT, T.; KUCJERER, C.; MUELLER-LANTZSCH, N. Association of human immunodeficiency virus Nef protein with actin is myristoylation dependent and influences its subcellular localization. **Eur J Biochem**, v. 247, n. 3, p. 843-851, 1997.

FACKLER, O. T.; LU, X.; FROST, J. A.; GEYER, M.; JIANG, B.; LUO, W.; ABO, A.; ALBERTS, A. S.; PETERLIN, B. M. p21-activated kinase 1 plays a critical role in cellular activation by Nef. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 7, p. 2619-2627, 2000.

FAURE, J. R.; STALDER, R.; BOREL, C.; SOBO, K.; PIGUET, V.; DEMAUREX, N.; GRUENBERG, J.; TRONO, D. ARF1 regulates Nef-induced CD4 degradation. **Curr Biol**, v. 14, n. 12, p. 1056-1064, 2004.

FORTIN, J. F.; BARAT, C.; BEAUSEJOUR, Y.; BARBEAU, B.; TREMBLAY, M. J. Hyper-responsiveness to stimulation of human immunodeficiency virus-infected CD4+ T cells requires Nef and Tat virus gene products and results from higher NFAT, NF-kappaB and AP-1 induction. **J Biol Chem**, v. 297, n. 38, p. 19520-39531, 2004.

FOSTER, J. L.; MOLINA, R. P.; LUO, T.; ARORA, V. K.; HUANG, Y.; HO, D. D.; GARCIA, J. V. Genetic and functional diversity of human immunodeficiency virus type I subtype B Nef primary isolates. **J Virol**, v. 75, n. 4, p. 1672-1680, 2001.

FOSTER, J. L.; GARCIA, J. V.; HIV-I nef: at the crossroads. **Retrovirology**, v. 5, n. 84, p. 1-13, 2008.

FRANKEL, A. D.; YOUNG, J. A. HIV-1, fifteen proteins as an RNA. **Annu Rev Biochem.** v. 67, p. 1-25, 1998.

FREED, E. O.; HIV-1 Gag proteins-diverse functions in the virus life cycle. **Virology**, v. 251, n. 1, p. 1-15, 1998.

GELDERBLOM, H. R.; ÖZEL, M.; PAULI, G. Morphogenesis and morphology of HIV Structure-function relations. **Archives of Virology**, v. 106, n. 1-2, p. 1-13, 1989.

GOTTLIEB, M. S. Discovering AIDS. **Epidemiology**, v. 9, n. 4, p. 365-367, 1998.

GREENBERG, M.; LAFRATE, A.; SKOWRONSKI, J. The SH3 domain binding surface and an acidic motif in the HIV-1 Nef regulate trafficking of class I MHC complexes; **EMBO J**, v. 17, n. 10, p. 2777-2789, 1998.

GREENE, W. C.; PETERLIN, B. M.; Charting HIVs remarkable voyage through the cell: Basic science as passport to future therapy. **Nat Med**, v. 8, N. 7, p. 673-680, 2002.

GRZESIEK, S.; BAX, A.; HU, J. S.; KAUFMAN, J.; PALMER, I.; STAHL, S. J.; TIANDRA, N. WINGFIELD, P. T. Refined solution structure and backbone dynamics of HIV-1 Nef. **Protein Sci**, v. 6, n. 6, p. 1248-1263, 1997.

GRZESIEK, S.; STAHL, S. J.; WINGFIELD, P. T.; BAX, A.; The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef : Mapping of the Nef binding surface by NMR. **Biochemistry**, v. 35, n. 32, p. 10256-10361, 1996.

GUY, B.; KIENY, M. P.; RIVIERE, Y.; LE PEUCH, C.; DOTT, K.; GIRARD, M.; MONTAGNIER, L.; LECOQ, J. P. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-

binding protein resembling an oncogene product. **Nature**, v. 330, n. 6145, p. 266-269, 1987.

GYER, M.; YU, H.; MANDIC, R.; LINNEMANN, T.; ZHENG, Y. H.; FACKLER, O. T.; PETERLIN, B. M. Subunit H of the V-ATPase binds to the medium chain to adaptor protein complex 2 and connects Nef to the endocytic machinery. **J Biol Chem**, v. 277, n. 32, p. 28521-28529, 2002.

HAHN, B. H.; SHAW, G. M.; DECOCK, K. M. AIDS as zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 607-614, 2000.

HARRIS, M. P.; NEIL, J. C. Myristoylation-dependent binding of HIV-1 Nef to CD4. **J Mol Biol**, v. 241, n. 2, p. 136-142, 1994.

HEENEY, J. L.; DALGLEISH, G. A.; WEISS, R. A.; Origins of HIV and the Evolution of Resistance to AIDS. **Science**, v. 313, n. 5786, p. 462-466, 2006.

HILLIS, D. M. AIDS Origins of HIV. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1757-1759, 2000.

HO, D. D. HIV-1 dynamics in vivo. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 9, n. 3, p. 76-77, 1995.

JANARDHAN, A.; SWIGUT, T.; HILL, B.; MYERS, M. P.; SKOWRONSKI, J. **Plos Biology**, v. 2, n. 1, p. 65-76, 2004.

JANVIER, K.; CRAIG, H.; GALL, S. L.; BENAROUS, R.; GUATELLI, J.; SCHATZ, O.; BENICHO, S. Nef-Induced CD4 Downregulation: a diacidic sequence in human immunodeficiency virus type 1 Nef does not function as protein sorting motif through direct binding to β -COP. **J Virol**, v. 75, n. 8, p. 3971-3976, 2001.

JIM, Y. J.; ZHANG, X.; BOURSQUOT, J. G.; BURAKOFF, S. J.; CD4 phosphorylation partially reverses Nef down-regulation of CD4. **J. Immunol**, v. 173, n. 9, p. 5495-5500, 2004.

KAPLAN, A. H.; MANCHESTER, M.; SWANSTROM, R. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and required of release to occur with maximum efficiency. **J Virol**, v. 66, n. 10, p. 6782-6786, 1994.

KIRCHHOF F.; SCHINDLER M.; SPECHT, A.; ARHEL, N.; MÜNCH, J. Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 17, p. 2621-2636, 2008.

KIRCHHOFF, F. Is the high virulence of HIV-1 an unfortunate coincidence of primate lentiviral evolution? **Nat Rev Microbiol**. v. 7, n. 6, p. 467-476, 2009.

KLATZMANN, D.; CHAMPAGNE, E.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; GUETARD, D.; HERCEND, T.; GLUCKMAN, J. C.; MONTAGNIER, L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. **Nature**, v. 312, n. 5996, p. 767-768, 1984.

LAMA, J.; MANGASARIAN, A.; TRONO, D. Cell-surface expression. of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu – inhibitable manner; **Curr Biol**, v. 9, n. 12, p. 622-631, 1999.

LI, P. L.; WANG, T.; BUCKLEY, K. A.; CHENNE, A. L.; POPOV S.; RUPRECHT, R. M. Phosphorylation of HIV Nef by c-AMP-dependent protein kinase. **Virology**, v. 331, n. 2, p. 367-374, 2005.

LU, X.; WU, X.; PLEMENITAS, A.; YU, H.; SAWAI, E. T.; ABO, A.; PETERLIN, B. M. CDC42 nad Rac1 are implicated in the activation of the Nef-associated kinase and replication of HIV-1. **Curr Biol**, v. 6, n. 12, p. 1677-1684, 1996.

MANDIC, R.; FACKLER, O. T.; GEYER, M.; LINNEMANN, T.; ZHENG, Y. H.; PETERLIN, B. M. Negative factor from SIV binds to the catalytic subunit of the V-ATPase to internalize CD4 and to increase viral infectivity. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 2, p. 463-473, 2001.

MEYAARD, L.; OTTO, S. A.; KEET, I. P.; ROOS, M. T.; MIEDEMA, F. Programmed death of T cells in human immunodeficiency virus infection. No correlation with progression to disease. *J Clin Invest*, v. 93, n. 3, p. 982-988, 1994.

MILLER, M. D.; FEINBERG, M. B.; GREENE, W. C.; The HIV-1 nef gene acts as positive viral infectivity factor. **Trends Microbiol**, v. 2, n. 8, p. 294-298, 1994.

MILLER, M. D.; WARMERDAM, M. T.; GASTON, I.; GREENE, W. C.; FEINBERG, M. B.; The human immunodeficiency virus-1 nef product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. **J Exp Med**, v. 179, n. 1, p. 101-113, 1994.

MIYAUCHI, K.; KIM, Y.; LATINOVIC, O.; MOROZOV, V.; MELIKYAN, G. B. HIV Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 433-434, 2009.

MÜNCH, J.; RAJAN, D.; SCHINDLER, M.; SPECHT, A.; RÜCKER, R.; NOVEMBRE, F. J.; NERRIENET, E.; MÜLLER-TRUTWIN, M. C.; PEETERS, M.; HAN, B. H.; KIRCHHOFF, F. Nef-mediated enhancement of virion infectivity and stimulation of

viral replication are fundamental properties of primate lentiviruses. **J Virol**, v. 81, n. 24, p. 13852-13864, 2007.

MÜNCH, J.; STOLTE, N.; FUCHS, D.; STAHL-HENNIG, C.; KIRCHHOFF, F. Efficient class I major histocompatibility complex down-regulation by simian immunodeficiency virus Nef is associated with a strong selective advantage in infected rhesus macaques. **J Virol**, v. 75, n. 21, p. 10532-10536, 2001.

MWIMANZI, P.; MARKLE, T J.; OGATA, Y.; MARTIN, E.; TOKUNAGA, M.; MACDONALD, M.; KUANG, X. T.; WALKER, B. D.; BROCKMAN, M. A.; BRUMME, Z. L.; UENO, T. Dynamic range of Nef functions in chronic HIV-1 infection. **Virology**, v. 439, n. 2, p. 74-80, 2013.

NIEDERMAN, T. M.; HASTINGS, W. R.; RATNER, L.; Myristoylation-enhanced binding of the HIV-1 Nef protein to T cell skeletal matrix. **Virology**, v. 197, n. 1, p. 420-425, 1993.

NUNN, M. F.; WARSH, J. W. Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a member of the p21-activated kinase family. **J Virol**, v. 70, n. 9, p. 6157-6161, 1996.

PALELLA, F. J.; DELANEY, K. M.; MOORMAN, A. C.; LOVELESS, M. O.; FUHRER, J.; SATTEN, G. A.; ASCHMAN, D. J.; HOLMBERG, S. D. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. Hiv Outpatient Study Investigators. **N Engl J Med**, v. 338, n. 13, p. 853-860, 1998.

PIGUET, V.; CHEN, Y. L.; MANGASARIAN, A.; FOTI, M.; CARPENTIER, J. L.; TRONO, D. Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. **EMBO J**, v. 17, n. 9, p. 2472-2481, 1998.

PRESLEY, F. J.; COLE, N. B.; SCHROER, T. A.; HISCHBERG, K.; ZAAL, K. J. M.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; ER-to-Golgi transport visualized in living cells. **Nature**, v. 389, n. 6646, p. 81-85, 1997.

PREUSSER, A.; BRIESE, L.; BAUR, A. S.; WILLBOLD, D. Direct in vitro binding of full-length human immunodeficiency virus type 1 Nef protein to CD4 cytoplasmic domain. **J Virol**, v. 75, n. 8, p. 3960-3964, 2001.

RANKI, A.; LAGERSTEDT, A.; OVOD, V.; AAVIK, E.; KROHN, K. J. Expression kinetics and subcellular localization of HIV-1 regulatory proteins Nef, Tat and Rev in acutely and chronically infected lymphoid cell lines. **Arch Virol**, v. 139, n. 3-4, p. 365-378, 1994.

RATNET, L.; FISHER, A.; JAGODZINSKI, L. L.; MITSUYA, H.; LIOU, R. S.; GALLO, R. C.; WONG-STAAAL, F. Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus. **Aids Res Hum Retroviruses**, v. 3, n. 1, p. 57-69, 1987.

RENKEMA, G. H.; MANNINEN, A.; MANN, D. A.; HARRIS, M.; SAKSELA, K. Identification of the Nef-associated kinase as p21-activated kinase 2. **Curr Biol**, v. 9, n. 23, p. 1407-1410, 1999.

ROETH, J. F.; WILLIAMS, M.; KASPER, M. R.; FILZEN, T. M.; COLLINS, K. L. HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. **J Cell Biol**, v. 167, n. 5, p. 903-913, 2004.

ROSSI, F.; GALLINA, A.; MILANESI, G. Nef-CD4 physical interaction sensed with the yeast two-hybrid system. **Virology**, v. 217, n. 1, p. 397-403, 1996.

SCHINDLER, M.; WÜRFL, S.; BENAROCHE, P.; GREENOUGH, T. C.; DANIELS, R.; EASTERBROOK, P.; BRENNER, M.; MÜNCH, J.; KIRCHHOFF, F. 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**, v. 77, n. 19, p. 10548-10556, 2003.

SCHWARZ, D. S.; HUTVÁGNER, G.; DU, T.; XU, Z.; ARONIN, N.; ZAMORE, P. D.; Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 199-208, 2003.

SHUGARS, D. C.; SMITH, M. S.; GLUECK, D. H.; NANTERMET, P. V.; SEILLIER-MOISEWITSCH, F.; SWANSTROM, R. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef gene sequences present in vivo. **J Virol**, v. 67, n. 8, p. 4639-4650, 1993.

SKOWRONSKI, J.; PARKS, D.; MARIANI, R. Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene. **EMBO J**, v. 12, n. 2, p. 703-713, 1993.

SWAIN, S. L. T cell subsets and the recognition of MHC class. **Immunol Rev**, v. 74, n. 1, p. 129-142, 1983.

UNAIDS (2013). Core Epidemiology Slides.

VILHARDT, F.; PLASTRE, O.; SAWADA, M.; SUZUKI, K.; WIZNEROWICZ, M.; KIYOKAWA, E.; TRONO, D.; KRAUSE, K. H. The HIV-1 Nef protein and phagocyte NADPH oxidase activation. **J Biol Chem**, v. 277, n. 44, p. 42136-42143, 2002.

XU, X. N.; LAFFERT, B.; SCREATON, G. R.; KRAFT, M.; WOLF, D.; KOLANUS, W.; MONGKOLSAPAY, J.; MCMICHAEL, A. J.; BAUR, A. S. Induction of Fas ligand

expression by HIV involves the interaction of Nef with T cell receptor zeta chain. **J Exp Med**, v. 189, n. 9, p. 1489-1496, 1999.

WHITTLE, H.; MORRIS, J.; TODD, J.; CORRAH, T.; SABALLY, S.; BANGALI, J.; NGOM, P. T.; ROLFE, M.; WILKINS, A. HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1-infected patients. **AIDS**, v. 8, n. 11, p. 1617-1620, 1994.

WAKANA, Y.; VILENEUVE, J.; GALEN, J. V.; CRUZ-GARCIA, D.; TAGAYA, M.; MALHOTRA, V. Kinesin-5/Eg5 is important for transport of CARTS from the trans-Golgi network to the cell surface. **J Cell Biol**, v. 2, n. 2, p. 241-250, 2013.

WU, Y.; MARSH, W. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. **Science**, v. 293, n. 5534, p. 1503-1506, 2001.

WYATT, R.; SODROSKI, J. The HIV1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. **Science**, v. 280, n. 5371, p. 1884-1888, 1998.