



**Universidade Brasília (UnB)**  
**Pós-graduação em Patologia Molecular**

*Dissertação de Mestrado*

**Caracterização da participação do Sistema de  
Ubiquitinação e Degradação Proteassômica no Bloqueio do  
Ciclo Celular Mediado pela Proteína Vpr do HIV-1**

**Carlos Maximiliano Monteiro Rego Filho**

**Brasília, Março de 2008**



Universidade de Brasília (UnB)

Pós-graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina

*Dissertação de Mestrado*

# **Caracterização da participação do Sistema de Ubiquitinação e Degradação Proteassômica no Bloqueio do Ciclo Celular Mediado pela Proteína Vpr do HIV-1**

Carlos Maximiliano do Rego Monteiro Filho

Orientador: Enrique Roberto Argañaraz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Banca examinadora

---

Prof. Dr. Bergmann M Ribeiro – Universidade de Brasília

---

Prof. Dr. Jaime Martins de Santana – Universidade de Brasília

---

Prof. Dr. Enrique Roberto Argañaraz – Universidade Brasília

**Brasília, Março 2008**

## ***Resumo***

A proteína acessória do HIV-1 Vpr ativa ATR induzindo um estresse replicativo do DNA. A ativação de ATR resulta num prolongamento da fase G2 do ciclo celular e termina induzindo a célula entrar em apoptose. No presente estudo investigou-se a função do sistema ubiquitina/proteassoma no contexto da atividade de Vpr. Reporta-se que esse sistema essencial para Vpr disparar o ponto de checagem de dano ao DNA na fase G2. Também investigou-se em detalhes as E3 ligases manipuladas por Vpr nesse processo. Foi encontrado que Vpr se liga a DCAF1, uma subunidade de Cul4-A/DDB1 E3 ligase. Mutações no domínio C-terminal da Vpr(R80A) mutante, a qual é capaz de se ligar à DCAF1, é incapaz de realizar a ativação do ponto de checagem do ciclo celular e possui um caráter dominante negativo. Em contraste, a mutação Q65R, na cadeia rica em leucina de Vpr inibe a interação com DCAF1, resultando numa forma inativa de Vpr; portanto, considerar-se-ia, então, que essa interação é requerida porém não suficiente para Vpr induzir o prolongamento de G2. Foi, então, proposto um modelo no qual Vpr recruta, através do seu domínio C-terminal, uma proteína celular desconhecida para ser degradada pelo sistema de ubiquitina- proteassoma e isto causaria o bloqueio do ciclo celular.

***Abstract:***

HIV-1 Vpr is a viral accessory protein that activates ATR through the induction of DNA replication stress. ATR activation results in cell cycle arrest in G2 and induction of apoptosis. In the present study, we investigate the role of the ubiquitin/proteasome system (UPS) in the above activity of Vpr. We report that the general function of the UPS is required for Vpr to induce G2 checkpoint activation. We further investigated in detail the specific E3 ubiquitin ligase subunits that Vpr manipulates. We found that Vpr binds to the DCAF1 subunit of a cullin 4a/DDB1 E3 ubiquitin ligase. The carboxyterminal domain Vpr(R80A) mutant, which is able to bind DCAF1, is inactive in checkpoint activation and has dominant-negative character. In contrast, the mutation Q65R, in the leucine-rich domain of Vpr that mediates DCAF1 binding, results in an inactive Vpr devoid of dominant negative behavior. Thus, the interaction of Vpr with DCAF1 is required, but not sufficient, for Vpr to cause G2 arrest. We propose that Vpr recruits, through its carboxy terminal domain, an unknown cellular factor that is required for G2-to-M transition. Recruitment of this factor leads to its ubiquitination and degradation, resulting in failure to enter mitosis.

### ***Dedicatória***

A vida é repleta de pessoas que passam e a minha não foi diferente. Hoje as pessoas que ficaram eu chamo de Pai, Mãe, irmão, irmã ou amigo. Dedicaria essa tese à essas pessoas mas preferi escolher só uma delas que, por acaso, foi a primeira pessoa que vi na vida. Meus pais investiram muito na minha educação, mas com certeza essa tese não seria possível sem o esforço e dedicação da minha mãe. Dedico cada página desse trabalho a Rosângela Barbosa de Queiroz.

### ***Agradecimentos***

A referência de um homem é aquilo que ele faz, sendo assim o trabalho que lhe provém o sustento, também lhe provém amizades inesquecíveis. Agradeço a colaboração do pessoal da FARMOL, ao time do Prof. Enrique Argañaraz, ao time do Prof. Vicente Planelles e a todos aqueles que trabalharam comigo nesses laboratórios da vida.

Pai, Mãe, irmão, irmã, avós, tios, primos e primas, agradeço também a força e incentivo que minha família me deu ao longo dos meus 26 anos. Meu agradecimento especial ao meu irmão do meio que sempre esteve ao meu lado, Gabriel valeu!

*“Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!”*

Meu muito obrigado a todos meus amigos!!

## Índice

<b><u>1 Introdução</u></b>	9
1.1 A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida	10
1.2 Epidemiologia e Avanços no Combate a AIDS.	11
1.3 O Vírus da Imunodeficiência Adquirida	12
1.4 O ciclo de vida & Infecção do HIV	16
1.5 A Proteína Viral R	18
1.6 Vpr e patogênese da AIDS	20
1.7 O ciclo celular e a modulação provocada por microorganismos.	23
1.8 O sistema ubiquitina-proteasoma.	28
1.9 Microorganismos usurpam UPS em seu favor.	30
<b><u>2 Objetivos</u></b>	33
2.1 Relevância da Pesquisa & Objetivos	34
2.2 Objetivo geral	34
2.3 Objetivos específicos	34
<b><u>3 Materiais e Métodos</u></b>	35
3.1 Linhas celulares	36
3.2 Plasmídeos e produção de vírus	36
3.3 Transfecção de plasmídeos	40
3.4 Transdução das partículas virais	41
3.5 Transfecção dos RNA de Interferência	41
3.6 Análise do ciclo celular	41
3.7 Preparação dos extratos protéicos	42
3.8 Co-imunoprecipitação	42
3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida & Western Blot	43
3.10 Simulação do Bloqueio do Ciclo Celular.	44
<b><u>4 Resultados</u></b>	45
4.1 DCAF-1 e requerida para a inibição do ciclo celular em G2 mediada por Vpr	46
4.2 DCAF1 liga Vpr a Cul4A - DDB1.	47

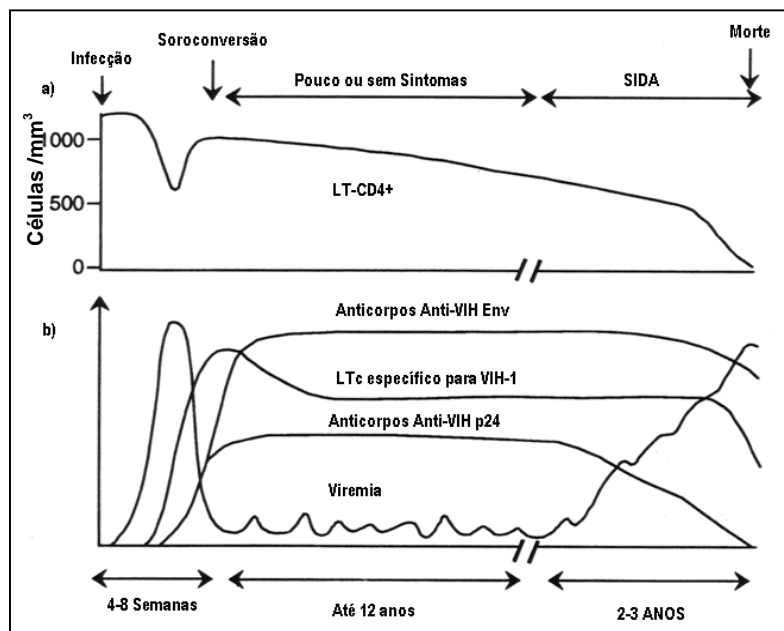
4.3 Vpr(R80A) age como um dominante negativo.	52
<b><u>5 Discussão</u></b>	54
<b><u>6. Apêndice</u></b>	58
6.1 Lista de siglas	59
6.2 Trabalho publicado	60
<b><u>7. Bibliografia</u></b>	70



## ***1. Introdução***

## 1.1 A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS)

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), na maioria das vezes, desencadeia a patologia conhecida como AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Humana). Esta doença é marcada pela progressiva diminuição das células CD4+ (células T auxiliares, monócitos, macrófagos e células dendríticas) e aumento na viremia, principalmente nos estágios finais da infecção (Figura 1 A e B) [2]. A consequência direta da patologia é uma deficiência da elaboração da resposta imunológica mediada pelas células T auxiliares (Linfócitos T CD4+) provocando uma perda da capacidade de responder ao ataque de outros parasitas ou mesmo ao câncer. Por causa disso os pacientes aidséticos são mais suscetíveis à infecções oportunistas causadas por: vírus, bactérias, fungos e protozoários e, frequentemente, desenvolvem doenças como a 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 [3]. Além do mais, cerca de 5 a 10% destes pacientes desenvolvem doenças neurodegenerativas, tais como: Alzheimer e demência, provavelmente em decorrência de mecanismos apoptóticos desencadeados pelo HIV [4, 5].



**Figura 1. Resposta imunológica e estágios clínicos da infecção pelo HIV (Adaptado de [2]).** Dentre os aspectos técnicos que envolvem a AIDS: a queda de Linfócitos T CD4+ (LT-CD4+), o aumento da carga

viral e perda da imunidade celular e humoral são os principais marcadores do avanço da doença. A) Acompanhamento dos níveis de LT-CD4+ no sangue periférico de pacientes infectados pelo HIV. Nas primeiras semanas ocorre uma queda abrupta nos níveis de células CD4+ que coincide com um aumento da viremia (comparar painel A e B), acredita-se que essa queda inicial seja uma consequência direta do efeito citopático provocado pela infecção do HIV. A recuperação do sistema imune observada logo após a soroconversão ocorre em decorrência da sua sensibilização. Com o passar do tempo o HIV provoca uma gradativa depleção dos LT CD4+ e, conseqüentemente, provoca uma imunodeficiência, a chamada AIDS. B) Dinâmica da viremia e resposta imunológica. Após o primeiro contato com o vírus o organismo começa a produzir anticorpos capazes de neutralizar a ação do HIV, entretanto o vírus provoca a morte das células infectadas. Ele consegue escapar da resposta imunológica graças a sua alta taxa de mutação. O efeito, em longo prazo, é um esgotamento do sistema imune de tal forma que o indivíduo vai perdendo a capacidade de responder à infecções oportunistas, e assim, evolui para um quadro conhecido como AIDS.

## **1.2 Epidemiologia e Avanços no Combate a AIDS.**

Em 1984, quando o HIV começou a ser entendido, o prognóstico era de que em dois anos haveria uma vacina eficaz contra o vírus [6], entretanto, de lá para cá pouca coisa mudou nesse sentido. Dados epidemiológicos de 2007 [7] mostraram que o número de pessoas vivendo com o HIV-1 em todo o mundo chega a 32 milhões e que se somados ao número de óbitos, o total de casos acumulados poderia estar próximo dos 60 milhões de pessoas[8]. O estudo também mostrou que o número de casos nunca estabilizou-se ou parou de aumentar. Diariamente são registrados cerca de 6.800 novos casos, o que demonstra que a pandemia continua sem controle. Atualmente as notícias mais animadoras dão conta que o número de mortes estão diminuindo nos últimos dois anos, mas essa diminuição ainda é muito tímida, pois o HIV continua matando mais de dois milhões de pessoas por ano. [8].

No ano de 2007 a gigante farmacêutica Merck anunciou o fim do projeto V520 que utilizava partículas do Adenovírus 5, um tipo de vírus de resfriado, que carregava genes do HIV-1. Acredita-se que uma imunidade longa e eficiente contra o HIV deva ser mediada por uma resposta imune controlada por células T[6]. A V520 pretendia fazer isso expressando as proteínas estruturais do HIV e Nef, de maneira que os epítomos virais seriam expostos na superfície celular via MHC de classe I o que teoricamente provocaria uma seleção clonal de

células T citotóxicas específica para o retrovírus[6]. As causas da falha desse projeto ainda estão sob análise, porém, especula-se que um dos principais motivos foi a escolha de um vetor viral, o qual a maior parte da população já possui imunidade: um vírus de resfriado comum . Outras vacinas encontram-se em fase de teste, porém até o momento, a AIDS é considerada uma doença incurável sem perspectivas de cura a curto prazo [6, 9].

Incurável porém tratável, os avanços das pesquisas científicas têm resultado numa melhoria na qualidade de vida dos pacientes aidéticos. Tais avanços são frutos dos esforços de diversos grupos de pesquisa nas mais variadas áreas do conhecimento que, em conjunto, permitiram o desenvolvimento de uma terapia anti-retroviral altamente ativa, popularmente conhecido como coquetel anti-AIDS, capaz de inibir a replicação viral ao ponto da carga viral atingir níveis indetectáveis. Porém, esses medicamentos não conseguem eliminar os reservatórios, e, na ausência de medicação, a viremia volta a crescer [10]. Para se chegar à cura, ainda dependemos do entendimento dos mecanismos patogênicos do vírus e do funcionamento do sistema imunológico [8].

### **1.3 O Vírus da Imunodeficiência Adquirida**

O HIV é um retrovírus do gênero *lentiviridae* que engloba os vírus HIV, SIV (Vírus da Imunodeficiência Simiana) e FIV (Vírus da Imunodeficiência Felina). Desse grupo se destacam os chamados lentivirus de primatas: HIV-1 e HIV-2 - por serem os causadores das AIDS - e SIV pela sua semelhança com o HIV[11].

Desde a descoberta do HIV muitos estudos foram focados na origem desse vírus. Esses estudos são baseados na seqüência de DNA dos provírus, sua distribuição geográfica e sua ocorrência em populações de macacos na África. Eles também dão suporte ao aparecimento dos diversos grupos que cada um desses tipos de HIV possuem. Apesar do grande número de teorias controversas, acredita-se que O HIV-2 originou-se do SIVsm (SIV originário de *Cercocebus atys*, ou, “sooty mangabeys”) e que o HIV-1 originou-se do SIVcpz (SIV que infecta chipanzés, ou, *Pan troglodydes troglodydes*) [12].

A explicação para a existência das diferentes classificações de HIV, sugere que cada um dos casos representa um determinado momento na história, em que o vírus proveniente do

macaco (SIV) conseguiu tornar-se replicante competente nos seres humanos. No caso do HIV-1 isso aconteceu cerca de três vezes (grupos M,N e O), já o HIV-2 possui nove grupos que vão de A até H. Não se sabe o porque mas o responsável pela atual pandemia é o HIV-1, sendo que o grupo M e seus subtipos (de A até K) foi o que mais contribuiu para a disseminação do HIV pelo mundo[12].

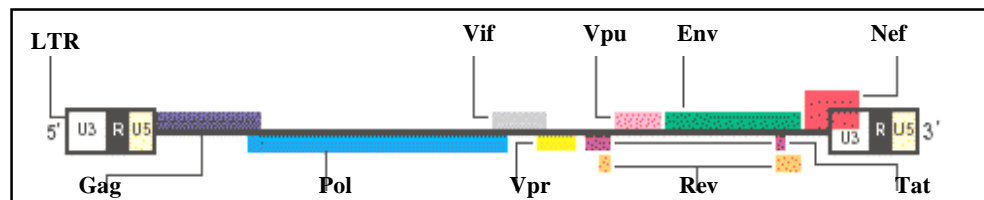
Estruturalmente o HIV se organiza em um envoltório lipoglicoproteico, denominado envelope, que recobre o capsídeo (Figura 2). O envelope apresenta na sua parte externa projeções contendo trímeros, formados pelas glicoproteínas gp120 e gp41. A gp120 localiza-se externamente ao virion estendendo-se por meio da gp41 na região hidrofóbica do envelope viral [13]. O envelope se apóia no capsídeo através da matriz (MA) que o reveste, ou, p17, essa proteína é responsável pela integridade viral e pela a incorporação das proteínas no virion maduro[11, 14].

O capsídeo possui formato cônico, típico de lentivírus, constituído principalmente pela proteína do capsídeo (CA) p24. O material genético é composto por duas fitas de RNA positivo que fica armazenado no interior do capsídeo (nucleocapsídeo). Três importantes enzimas encontram-se associadas às duas moléculas de RNA, a RT, a integrase (IN) e a protease (PR) [15] (Figura 2).



**Figura 2. Representação esquemática do vírus da Imunodeficiência Humana, HIV-1 (figura sem crédito de autoria).** O HIV-1 é envolto por um envelope de natureza lipoprotéica herdada da membrana plasmática celular durante o brotamento viral. Por causa disso pode ser encontradas proteínas de membrana do hospedeiro no envelope, como é o caso do MHC de classe I e de classe II e até mesmo CD4. O envelope cobre um capsídeo protéico que carrega além de proteínas virais tais como RT e IN que serão necessárias nos primeiros momentos da infecção e o genoma do vírus em forma de RNA estabilizado pelo nucleocapsídeo. [3].

O genoma do HIV-1 tem aproximadamente 9,8 Kb constituindo-se de nove genes (Tabela 1), sendo: três estruturais *gag*, *pol* e *env*, dois regulatórios, *tat* e *rev*, e quatro acessórios, *nef*, *vpu*, *vpr* e *vif*. Os promotores virais se encontram nas extremidades 5' e 3' na forma de longas seqüências repetidas, ou, LTRs (Long Terminal Repeats Sequences) (Figura 3)[14, 16]. Essa região também é importante no reconhecimento da integrase (IN) no momento da integração do vírus[17]. Outras proteínas atuam em diferentes estágios da patogênese do HIV conferindo-lhe uma replicação eficiente.



**Figura 3. 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 seqüências repetitivas longas, chamadas de LTRs [18].

Tabela 1. Genes do HIV-1 e as proteínas codificadas por eles.

Gene	Proteína	Função
Gag	p24	Proteína do Capsídeo, se liga ciclofilina "A".
	p17 (kDa)	Proteína Matriz (MA), por miristol auxilia Gag para lipid raft e importa (PIC) para fosforilação.
Gag	p24	Proteína do Capsídeo se liga ciclofilina "A".
	p17	Proteína associada ao RNA.
	p9	Proteína Matriz (MA), por miristol auxilia Gag para lipid raft e importa (PIC) para fosforilação.
	p6	Proteína associada ao RNA - auxilia no brotamento, interage com Vpr, PTAP-TGS101.

<b>Transcriptase Reserva</b>	<b>p66, p51</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Responsável pela transcrição reversa, com função de DNA polimerase.</li> <li>RNA dependente, RNase H e DNA polimerase – DNA dependente.</li> </ul>
<b>Protease</b>	<b>p11</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Realiza o processamento das poliproteínas precursoras virais.</li> </ul>
<b>Integrase</b>	<b>p32</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Realiza a integração do DNA proviral.</li> </ul>
<b>Envelope (Env)</b>	<b>gp160</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Clivada no retículo endoplasmático em gp120(SU) e gp41(TM).</li> <li>• gp120 se liga a CD4 e ao receptor da quimiocina (CCR5 e CXCR4).</li> <li>• Gp41 medeia fusão com a membrana citoplasmática.</li> <li>• Contém elementos responsivos ao RNA (RRE) que liga a Rev.</li> </ul>
<b>Ativador transcricional (Tat)</b>	<b>p14</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Liga-se a região de ativação transcricional (TAR).</li> <li>• Associa-se ao W da ciclina T1 e CDk9.</li> <li>• Aumenta a extensão da RNA Pol II.</li> </ul>
<b>Regulador da expressão viral (Rev)</b>	<b>p19</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Liga-se ao RRE.</li> <li>• Inibe o splicing do RNA viral.</li> <li>• Exporta RNA spliced incompleto do núcleo.</li> </ul>

<b>Fator de regulação negativa (Nef)</b>	<b>p27</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤</li> <li>➤ Modulação de CD4/MHC I.</li> <li>• Bloqueia apoptose.</li> <li>• Aumenta a infectividade viral.</li> </ul>
<b>Fator de infectividade viral (Vif)</b>	<b>p23</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Supera os efeitos inibitórios da célula do hospedeiro.</li> <li>• Estabiliza o complexo RT.</li> <li>• Aumenta a infecciosidade viral.</li> <li>• Auxilia a síntese do DNA proviral e/ou empacotamento viral.</li> </ul>
<b>Proteína viral “R” (Vpr)</b>	<b>p15</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Retarda a fase G2.</li> <li>• Facilita a infecção de Macrófagos.</li> </ul>
<b>Proteína viral “U” (Vpu)</b>	<b>p16</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Promove a degradação de CD4.</li> <li>• Auxilia a liberação do vírus.</li> </ul>

---

#### 1.4 O ciclo de vida & infecção do HIV

De modo semelhante a qualquer vírus, o HIV precisa infectar uma célula para completar seu sucesso replicativo. Especialmente no caso dos retrovírus, para completar seu objetivo, eles precisam percorrer um longo caminho que começa pela entrada na célula, formação do provírus no citoplasma até chegar ao núcleo da célula onde integram seu material genético [15]. A seguir, será proporcionada uma visão geral dessa longa jornada percorrida e os diferentes mecanismos usados pelo HIV-1 (Figura 4).

A infecção da célula hospedeira inicia-se pelo reconhecimento do receptor viral CD4 pela gp120 do envelope do HIV. Em consequência das mudanças conformacionais induzidas pela ligação CD4-gp120 uma outra glicoproteína também presente na superfície viral, a gp41, reconhece um segundo tipo de receptor (os chamados receptores de quimiocinas: CCR5 e CXCR4) que dá início a fusão das membranas do envelope viral e da membrana plasmática do hospedeiro [19]. Esse fusionamento permite que o capsídeo viral alcance o citoplasma. Uma vez dentro da célula, o vírus desmonta o capsídeo com a ajuda de proteínas celulares e virais, como a ciclofilina “A” [20], Nef e Vif [21] [22].

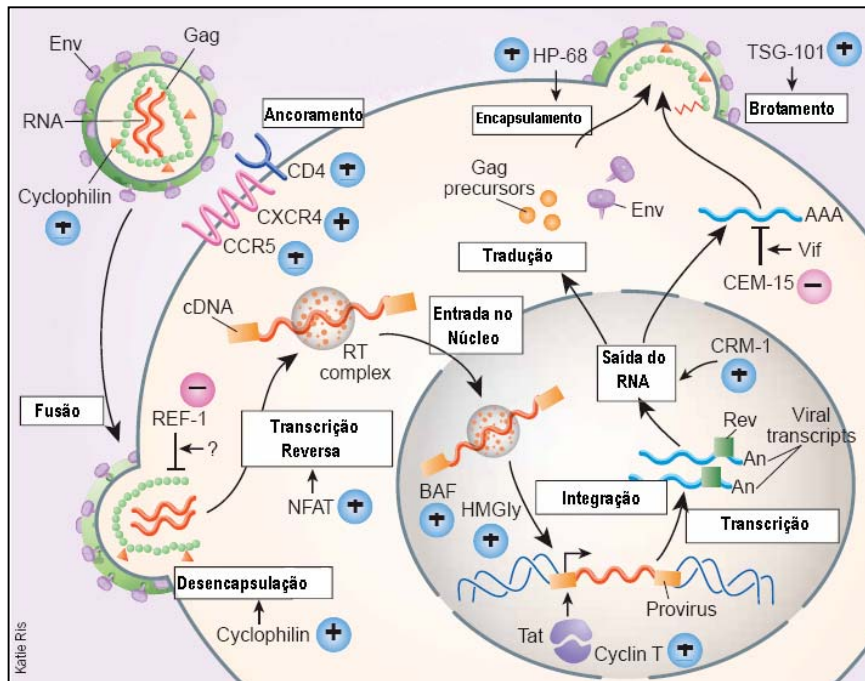
Após a desmontagem do capsídeo, forma-se um complexo denominado “complexo de pré-integração” (PIC) que envolve as moléculas de RNA viral, molécula de tRNA(3)Lys e as proteínas virais: RT, IN, MA, nucleocapsídeo, proteína viral R (Vpr), Vif e um grupo de proteínas do hospedeiro, HMGI(Y), ligada ao DNA [23]. Uma vez sintetizada a dupla cadeia de DNA (provírus) pela RT, 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 (fator de intercâmbio de guanina, GEF) desencadearia uma série de funções efetoras culminando com o reordenamento do citoesqueleto, facilitando a migração do PIC para o núcleo [24].

Uma vez na vizinhança do núcleo, o PIC deve enfrentar outro obstáculo: atravessar um poro nuclear significativamente menor que o seu tamanho. Neste processo, algumas proteínas virais teriam um papel chave. As proteínas virais IN, MA e Vpr que estão envolvidas neste fenômeno, possuem um sinal de localização nuclear (NLS) que é reconhecido pelas importinas a e b, membros da via clássica de importação de proteínas para o núcleo[23] [25] [26].

Uma vez incorporado ao genoma do hospedeiro a transcrição do DNA viral é dirigida pelo 5' LTR, o qual possui seqüências promotoras, como "TATA-box" e 3 sítios SP1. Por outro lado, acima destas seqüências encontram-se sítios para a ligação de fatores de transcrição, como NF-kB e NFAT[16]. Além disso, o HIV-1 pode auto transativar-se: a ciclina T1 se liga a Vpr e Tat para formar um complexo, interage com "domínio de transativação" presente no LTR. Essa conjugação termina recrutando a cinase celular dependente de ciclina 9 (Cdk9) e, conjuntamente com o fator "b" de alongação positivo (P-TEFb), leva a fosforilação do domínio C-terminal da RNA Polimerase II para potencializar transcrição dos genes sob controle do LTR viral[27, 28] [29] e [30].



#### **Figura 4. Ciclo infeccioso e fatores celulares que promovem ou inibem a replicação do vírus HIV-1.**

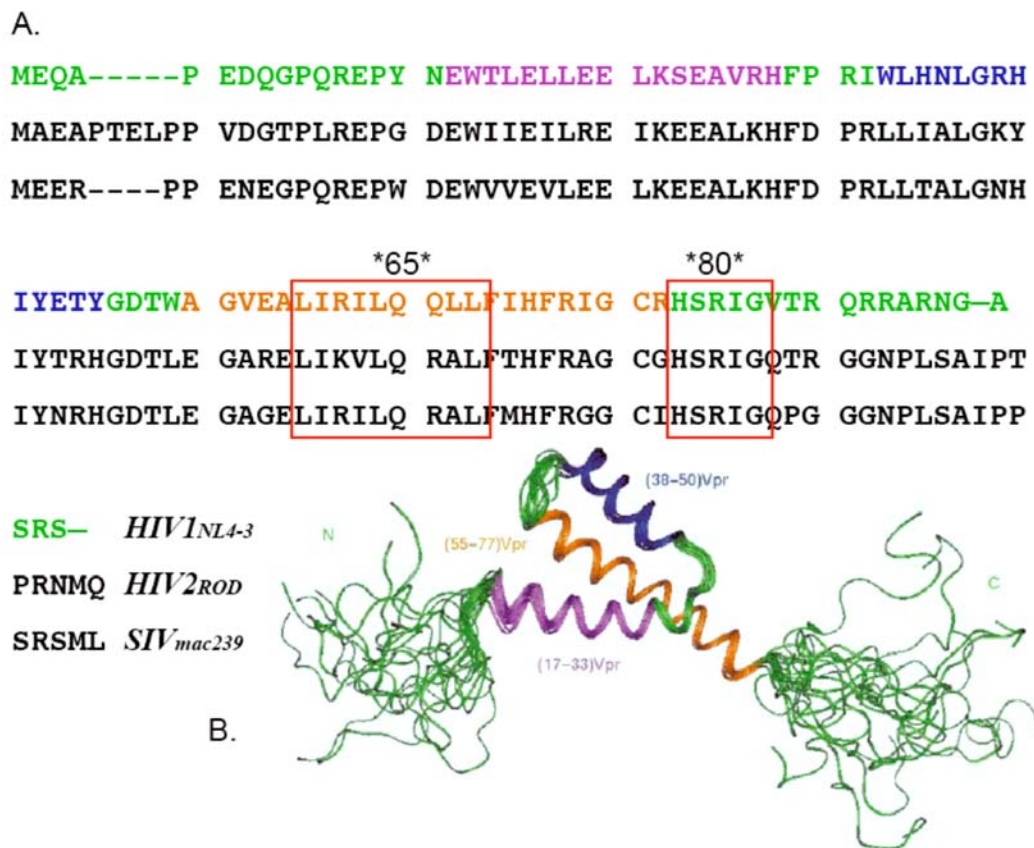
*Ancoramento - fusão:* a entrada do vírus é mediada pela ligação da gp120 ao receptor celular CD4, o que induz mudanças conformacionais na glicoproteína viral, facilitando a fusão do outro componente do envelope, a gp41 com o co-receptor CCR5 ou CXCR4. *Desencapsidização - transcrição reversa:* uma vez liberado no citoplasma, a partícula viral se desencapsida e o RNA sofre transcrição reversa, gerando um DNA dupla fita. *Entrada no núcleo:* o DNA dupla fita junto com proteínas virais (IN, Vpr) e outras proteínas celulares, formam o complexo de pré-integração (PIC), o qual migra para o núcleo. *Integração:* O DNA viral integra no genoma da célula hospedeira. *Transcrição e Saída dos RNAs mensageiros:* a transcrição do DNA proviral realizada pela RNA polimerase II celular origina transcritos que são *total, parcialmente e não processados*. Posteriormente, todos os transcritos independentemente de ser processados ou não são exportados para o citoplasma, processo mediado em alguns casos pela proteína Rev. *Tradução, encapsulação e brotamento:* os transcritos são traduzidos por ribossomos no retículo endoplasmático, gerando as poliproteínas Gag, Gag-Pol e Env e proteínas como Nef, Vif, Vpu. Posteriormente, os componentes dos virions são envelopados ocorrendo o brotamento viral por um processo de fusão com a membrana celular. Os fatores celulares que influenciam as diferentes etapas do ciclo infeccioso do HIV (fatores positivos (+) e negativos (-)), estão indicados após cada passo na replicação viral. A proteína REF-1 bloqueia a infecção do HIV-1 após entrar na célula de alguns macacos. O fator CEM-15 (APOBEC) pode modificar o RNA genômico viral, sendo inibido pela proteína viral Vif. Os fatores celulares CD4, CXCR4, CCR5, Ciclina T-1, CRM-1 e TGS-101 promovem a replicação viral [31].

### **1.5 A Proteína Viral R**

Os genes acessórios, embora dispensáveis para replicação viral *in vitro*, são essenciais para o sucesso replicativo *in vivo* e desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da doença. Vpr se destaca por desempenhar um papel crítico na infecção, replicação e patogênese viral [17, 32]. Este gene codifica uma pequena proteína, com 14kDa e 96 aminoácidos, inversamente proporcional à sua versatilidade. A sua estrutura é composta de uma extremidade N-terminal flexível, seguida de 3 hélices rígidas intercaladas por 2 loops, terminando numa cauda C-terminal flexível [33] [34] (Figura 5 B). Justamente pelo tamanho reduzido e suas duas regiões nucleofílicas, uma formada pelas  $\alpha$ -hélices e outra na porção N-terminal, é possível encontrar esta proteína no núcleo celular logo após a infecção [35].

O estudo das seqüências de resíduos de aminoácidos de Vpr entre os diferentes lentivirus de primatas indicam que certos domínios permanecem altamente conservados, como por exemplo: na 3<sup>a</sup> hélice há região rica em leucina (LR) – resíduos 55 para 77 - e na porção C-

terminal uma seqüência de aminoácidos denominada “HSRIG” presentes tanto em HIV-1<sub>NL4-3</sub> quanto HIV-2<sub>ROD</sub> e SIV<sub>mac239</sub>. (Figura 5A)[36, 37]. No passado foi descoberto que a chamada região LR funciona como o ponto de ligação com um fator celular associado a Vpr, a então denominada proteína ligante de Vpr (VprBP, ou, DCAF1), entretanto a função do domínio HSRIG ainda não está completamente compreendida. Estudos mais recentes demonstram que mutações nos aminoácidos 65 ou 80, respectivamente, posicionados no centro dos domínios LR e HSRIG são capazes de inibir algumas das funções de Vpr[38-40], indicando que esses domínios possam ser conservados em decorrência da sua função na patogênese.



**Figura 5. Alinhamento e Estrutura de Vpr [41] (adaptado).** Em verde estão representadas as regiões flexíveis de Vpr; e em púrpura, azul e laranja estão, respectivamente, a 1ª, 2ª e 3ª hélices. A) Vpr é um gene presente em todos lentivírus de primatas, bastante preservado tanto na sua seqüência de resíduos de aminoácidos quando da funcionalidade. É sabido que os domínios destacados nas caixas vermelhas, LR e HSRIG, são essenciais para o efeito de Vpr sobre o ciclo celular[37]. B) A sobreposição de 15 diferentes

clones de Vpr sugerem que a forma da proteína é determinada pela rigidez e conservação das suas hélices já a extremidades C e N terminais não possuem uma forma bem definida[41].

A proteína Vpr é empacotada dentro da partícula viral: durante a montagem do vírus Gag seqüestra Vpr do citoplasma e carrega para o interior do vírus que está sendo formado. Isso é extremamente importante porque durante o ciclo replicativo do HIV, Vpr começa a desempenhar funções antes mesmo de começar a expressão dos genes virais[14]. Por exemplo, Vpr auxilia na fidelidade da transcriptase reversa - estudos dão conta que na falta de Vpr o acúmulo de erros provocado por RT aumenta em até 18 vezes[42].

Como todos genes acessórios, Vpr não é essencial para a replicação do HIV *in vitro*. Isso poderia sugerir que esse gene é meramente um resquício evolutivo e que somente teve importância fisiológica no ancestral do HIV. Entretanto é importante ressaltar que ensaios *in vitro* são extremamente simplificados e não possuem os desafios que sistemas *in vivo* proporcionam, como por exemplo: a pressão do sistema imunológico. Em um estudo que testava uma vacina em chimpanzés feita com vírus Vpr truncado mostrou que em pouco tempo a seqüência selvagem de Vpr foi restaurada. Essa foi apenas a primeira evidência que indicaria que Vpr seria importante para o sucesso replicativo do HIV[43]. Em humanos a relevância fisiológica de Vpr ficou bastante evidente após a infecção acidental por um trabalhador que utilizava as mesmas amostras do estudo citado anteriormente: ele obteve o mesmo tipo de restauração dois anos depois [44].

## **1.6 Vpr e patogênese da AIDS**

Como dito anteriormente a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida caracteriza-se por uma deterioração progressiva do sistema imune causada principalmente pela perda de linfócitos CD4+ seguida do aumento da carga viral[45, 46]. Entretanto, os motivos para tal depleção e o porquê do Vírus da Imunodeficiência Humana causar a doença, são tópicos das mais diversas especulações e hipóteses. Dentre as diferentes linhas de raciocínio, podem ser citadas as que se baseiam num mecanismo patogênico direto [47, 48], num processo de exaustão do sistema imune em virtude de uma resposta exagerada e descontrolada [49, 50], mecanismos exercidos pelos LT citotóxicos [51] e finalmente em mecanismos apoptóticos [52, 53]. Sabendo-se que a

maioria das células do sistema imune que sofrem apoptose não se encontram infectadas, supõem-se que a morte de células não infectadas seja ocasionada pela liberação de fatores solúveis por parte das células infectadas [48]. Existem trabalhos que elencam Vpr como um desses fatores solúveis e correlacionam a liberação de Vpr na corrente sanguínea com diversas doenças neurodegenerativas, entre elas a demência, em pacientes HIV positivos. Isto porque a proteína viral regulatória “R” tem por característica induzir a liberação de Caspase 9 e citocromo c no citoplasma, disparando os sinais que levam à apoptose[4] . Outras funções atribuídas a esse gene dão fortes evidências que esteja envolvido na sobrevivência viral e progressão à AIDS [54-57]. Dentre as principais atividades relacionadas a esta proteína, podem-se citar as seguintes: a) aumento da eficiência do processo de transcrição reversa; b) transativação do promotor do HIV-1 (long-terminal repeat, LTR); b) facilita a importação do complexo de pré-integração viral (PIC); c) interrompe o ciclo celular no estágio G<sub>2</sub> e d) induz de apoptoses[37].

No início da infecção, a proteína Vpr aumenta a eficiência e fidelidade da transcrição reversa degradando duas enzimas de reparo ao dano no DNA: UNG2 e SMUG[58]. Estas duas proteínas são duas DNA uracila glicosilases, normalmente elas funcionam auxiliando o sistema de reparo do DNA na retirada de uracila incorporada erroneamente ou produzida pela desaminação da citosina. O problema consiste que UNG2 e SMUG2 são as únicas DNA uracila glicosilases que conseguem extrair esses nucleotídeos de fitas simples de DNA[58]. A formação de fitas simples de DNA não é um evento corriqueiro no interior da célula, porém acontece na transcriptase reversa: o RNA viral é copiado em uma molécula de DNA complementar de fita simples, a dupla fita só é polimerizada secundariamente pela própria ação da RT. O problema de retirar uracila de um DNA fita simples é que o sistema de reparo de DNA utiliza a fita complementar para repor o nucleotídeo retirado. Se UNG2 e SMUG2 retirar a uracila do DNA viral antes da construção da fita complementar o sistema de reparo não conseguirá completar o seu trabalho[58-60]. Acredita-se que a deleção de *Vpr* leva a um aumento de erro em 4 a 18 vezes dependendo do tipo celular [61-63].

Em relação ao segundo efeito assinado por esta proteína, a transativação do LTR, este pareceria ser modesto em comparação ao exercido pela proteína Tat. Vpr se liga ao mesmo fator de transcrição controlado por TAT, a ciclina T1, porém em posições diferentes. Ensaio com vetores contendo o luciferase sob o controle do LTR sugeriram que Vpr sozinho poderia aumentar até 4 vezes a transativação, enquanto Tat faria o mesmo 1.000 vezes mais; porém há

indícios que as duas proteínas atuem sinergeticamente: as duas proteínas juntas poderiam aumentar os transcritos em até 4.000 vezes [64, 65].

A outra função de Vpr está relacionada a uma característica diferencial do HIV que, assim como todos os outros lentivirus de primatas, não dependem da desnaturação da membrana nuclear para integrar seu genoma no cromossomo do hospedeiro. Experimentos com vetores lentivirais que expressaram Vpr truncado foram incapazes de se replicar em monócitos [34], porém em linfócitos que estão se dividindo Vpr parece ser dispensável para o sucesso da infecção [54, 66]. Apesar dessa função não estar bem esclarecida, sabe-se que Vpr é parte integrante de PIC, assim sendo, especula-se que um dos papéis de Vpr no PIC seria justamente auxiliá-lo na passagem pelo poro nuclear. Por exemplo, a marcação de Vpr com fluorescência permitiu observar que grande parte dessa proteína encontra-se concentrada na membrana do núcleo, talvez porque, como também já foi observado, Vpr interage com um componente do poro nuclear, a chamada nucleoporina hCC1. Estudos recentes mostraram que mutações na primeira  $\alpha$ -hélice de Vpr impede a interação com hCC1, o resultado direto disso é uma distribuição de Vpr difusa no citoplasma [67].

Inicialmente Vpr foi descrita como uma proteína inibidora e posteriormente como indutora de apoptose. Um dos mecanismos anti-apoptóticos possíveis seria que Vpr se ligaria a uma proteína mitocondrial anti-apoptótica, o fator HAX-1, induzindo sua saída para o citoplasma onde diminuiria o efeito pró-apoptótico de *vpr* [68]. Dentre os possíveis mecanismos pró-apoptóticos envolvidos, encontram-se os da via mitocondrial, onde a ligação de Vpr a um fator relacionado à permeabilidade da organela, o translocador de nucleotídeo adenina (ANT). Essa interação provocaria a desestabilização das membranas da mitocôndria e como resultado direto ocorreria a liberação de fatores pró-apoptóticos, como citocromo C, e conseqüentemente ativação da caspase 9 [69] [70].

Vários grupos sugerem que o potencial apoptótico de Vpr contribuiria para a marcante queda de LT-CD4+ circulantes [42, 71-73]. Porém Vpr é uma proteína muito pequena e aparentemente é excretadas de células infectadas, especula-se que a Vpr extracelular esteja envolvida em outras patologias: a proteína induz apoptose em células T infectadas ou não, assim como em outros tipos celulares como, Linfócitos B, células progenitoras hematopoiéticas, células exterminadoras naturais (NK), macrófagos, células dendríticas e neurônios [34, 52, 54, 61, 68], podendo estar relacionado a doenças paralelas à imunodeficiência como: Parkinson, Alzheimer e

demência [4, 72]. A ausência da AIDS apresentada em alguns pacientes denominados de não-progressores foi também relacionada em alguns casos com mutações nesta proteína viral. Assim, as mutações Q3R e R77Q, foram associadas à perda na capacidade apoptótica de Vpr [56, 71]. Outras mutações de interesse são as eventuais substituições na leucina na posição 64 relacionadas a um considerável aumento no potencial apoptótico. Isto é interessante pois tanto o 64º resíduo de aminoácido quanto o 65º estão exatamente dentro do domínio LR dando suporte a idéia de que mutações na extremidade C-terminal podem interferir em dois efeitos citopáticos: controle do ciclo celular e indução à apoptose [71].

A inibição do ciclo celular é uma das atividades melhor caracterizada para Vpr [57, 62, 68, 74]. Ela é uma das poucas funções que já tiveram sua relevância confirmada tanto *in vitro* quanto *in vivo*[75] e proporciona muitas vantagens para o vírus. Durante a fase G2 do ciclo celular há uma maior eficiência da transcrição dos genes virais [64, 65] o que acaba resultando num aumento da produção de partículas virais [76], além de inibir a tradução dos mRNAs cap dependentes, o que favorece a tradução de mRNAs a partir de sítios de reconhecimento internos (IRES) [77]. Acredita-se que o efeito apoptótico de Vpr seja em decorrência do estresse causado pela proteína no ciclo celular, no entanto esse assunto permanece sob discussão.

## **1.7 Controle do ciclo celular e a desregulação pelos vírus na fase G2.**

Os seres vivos, sejam eles multi ou unicelulares, dependem única e exclusivamente da divisão celular para crescer, desenvolver, maturar tecidos e se multiplicar. Não seria exagero afirmar que a vida na terra depende da multiplicação celular, prova disso é que uma em cada seis mortes em países desenvolvidos são causadas por doenças que atingem o ciclo celular, entre elas o câncer[76].

A mitose gera duas células filhas com uma fidelidade extraordinária, isso é possível graças a um sistema de controle, pontos de checagem e reparo do DNA. Todo esse sistema segue a replicação dos cromossomos bem de perto, pois um erro que ocorra numa região importante do genoma que não for reparado imediatamente, ou na fase seguinte, acaba sendo repassado às gerações sucessivas gerando conseqüências que podem comprometer a sobrevivência do organismo[78].

De acordo com os passos que segue a multiplicação do genoma, o ciclo celular é dividido em 4 etapas: G1, S, G2 e M. Logo após terminar um ciclo de divisão, a célula entra na fase G1 onde acumula nutrientes para produzir proteínas que formarão organelas e outros componentes celulares. A fase seguinte, chamada de fase S, é o momento de síntese do DNA que formará as cromatinas das células filhas. A fase G2 funciona como etapa preparatória para a mitose, ela é a última chance do sistema de reparo do DNA reverter as mutações. Por fim, a mitose ocorre na fase M: o núcleo é desmontado e os cromossomos divididos entre as células filhas[78].

Curiosamente muitos vírus controlam o ciclo celular para extrair vantagens desse mecanismo[76]. Embora nem todos os casos estejam completamente elucidados, alguns são extremamente adaptativos. O Epstein Barr, por exemplo, garante uma produção perpétua de partículas virais tornando imortais as células infectadas[79]. Já o HIV-1 interrompe o ciclo celular justamente na fase onde a replicação viral é mais intensa[76]. Observando com cuidado nota-se que esses dois vírus produzem efeitos antagônicos na célula: um bloqueia o ciclo celular e outro impede a parada do ciclo celular. Cada um executa sua função interferindo nas proteínas que dão prosseguimento ao ciclo celular e dos pontos de checagem.

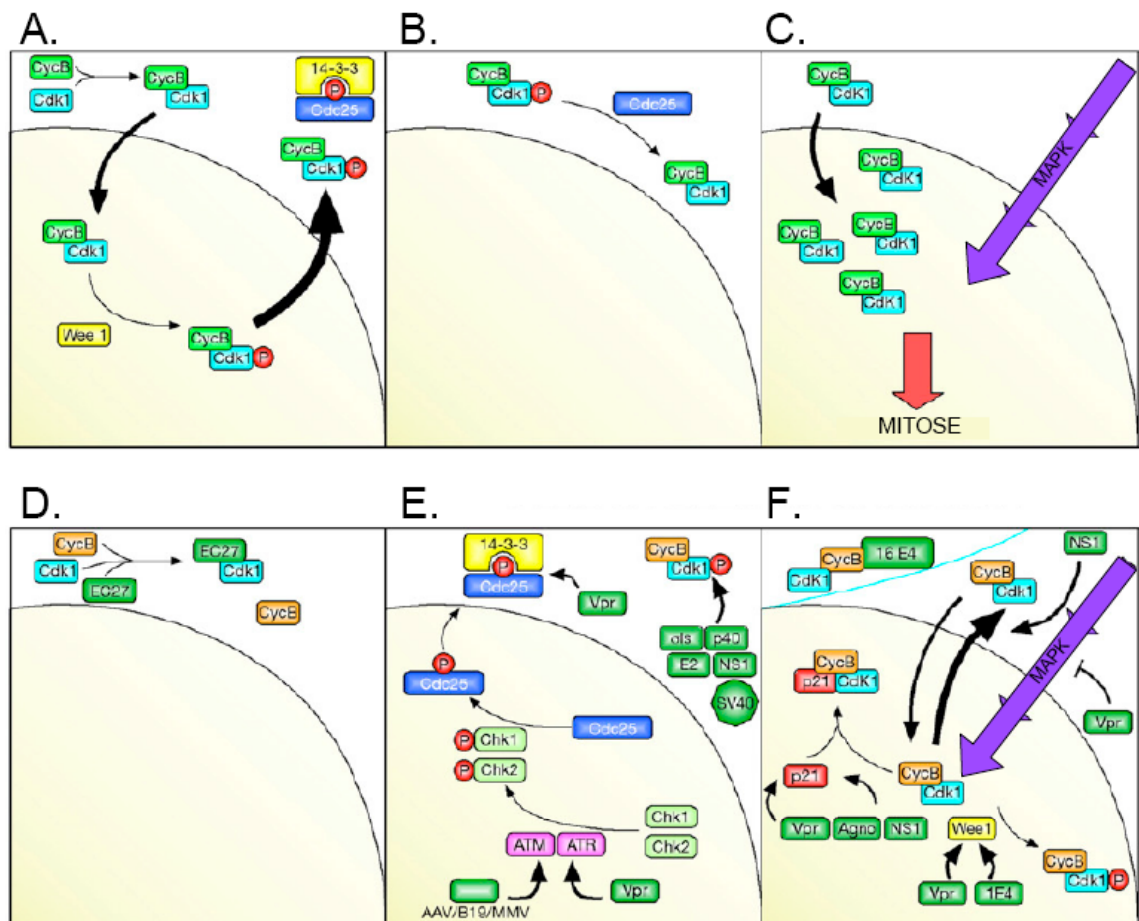
Para compreender como os patógenos conseguem regular a divisão celular é importante considerar que o controle do ciclo celular é cíclico irreversível, em outras palavras: uma vez iniciada uma fase não há como retornar a etapa anterior sem que o ciclo seja completado. Isto acontece principalmente porque a passagem de uma fase para outra depende da degradação e expressão de proteínas específicas mais conhecidas por “ciclina” (Cyc): proteínas que controlam a ativação das cinases dependentes de ciclina (Cdk)[78].

A continuidade do ciclo celular acontece de acordo com a expressão e degradação das ciclina que determinam ativação e desativação das CDKs em momentos específicos. Nesse contexto as Cdk fosforilam as proteínas que irão efetivamente dar prosseguimento à passagem para a fase seguinte do ciclo celular. Entretanto, caso algo aconteça de errado, o ciclo pode ser interrompido pelos pontos de checagem. Nesse caso ocorre um bloqueio do ciclo celular e ativação do sistema de reparo de DNA[80, 81]. Em último caso, se o sistema de reparo não conseguir sanar o problema, a célula é induzida a morte por apoptose[78].

Alguns vírus que controlam o ciclo celular atuam na cascata bioquímica responsável pela passagem da fase G2 para a mitose. Durante a fase G2 ocorre um acúmulo de ciclina B1 que se



conjugada com Cdk 1 formando B1/Cdk, também conhecido como Fator Promotor de Mitose (MPF) 1[76]. Esse complexo é mantido inativo no citoplasma pela fosforilação inibitória de Cdk1, catalisada por Wee1(Figura 7A). A inatividade de MPF permanece enquanto a fosfatase Cdc25C ficar conjugada com seu inibidor 14-3-3[76]. Somente nos estágios finais da fase G2 Cdc25C se desliga de 14-3-3 para desfosforilar Cdk1. Assim MPF é ativado e em seguida translocado para o núcleo, lá o MPF ativa uma cascata que dispara a cinase promotora de mitose (MAPK) e a célula se divide. O fim da mitose acontece quando o Fator Promotor da Anáfase (APC) recruta a ciclina B1 para degradação[76].



**Figura 7. Passagem da fase G2 para M e sua desregulação mediada por vírus [76](adaptado).** A região preenchida em branco representa o citoplasma e em bege o núcleo. No início da fase G2 há um acúmulo de Cyc B favorecendo a formação de MPF. A) Wee1 catalisa a fosforilação de MPF (forma inativa) posicionando-o no citoplasma, essa condição é mantida pela fosforilação de Cdc25C que induz a interação com seu inibidor 14-3-3. B) Num momento tardio da fase G2 Cdc25C é desfosforilado, se desliga de 14-3-3 e retira o fosfato MPF que por sua vez se torna ativo. C) Na sua forma ativa MPF é chamada de é, então, translocada para o núcleo onde irá ativar e desativar as proteínas prosseguirão com saída de G2 e

dar início a mitose. D) os baculovírus provocam o prolongamento do ciclo celular seqüestrando Cdk 1 para inibir a formação de MPF. E) Alguns vírus podem induzir a ligação de 14-3-3 à Cdc25C por intermédio de ATR e ATM, como por exemplo os parvovírus AAV, B19 e MMV e o HIV. Já outros vírus conseguem impedir a mitose pela fosforilação direta de MPF, são eles: SV-40, a proteína E2 do HPV tipo 16, proteína p40 do BDV, proteína NS1 do MMV e a proteína  $\sigma$ 1S dos retrovírus. F) Ambas proteínas E4 e NS1, respectivamente pertencentes à linhagem 16 do HPV e ao parvovírus B19, inibem a translocação do MPF ativado para o núcleo. A proteína p21 é um outro importante alvo para o prolongamento da fase G2 pois impede a permanência de MPF no núcleo, essa proteína é expressada em grandes quantidades na presença das proteínas Vpr do HIV. Adicionalmente, as proteínas E14 do HPV e Vpr HPV desregulam o ciclo celular induzindo a fosforilação inibitória de MPF por intermédio de Wee1. Por fim, sabe-se que Vpr interfere na sinalização da ativação da cinase promotora de mitose.

A passagem da fase G2 para mitose pode ser interrompida pelas fosfocinases ATM ou ATR. As proteínas ATM (Ataxia Telangectasia Mutada) e ATR (proteína homóloga à rad 3 de *Schizosaccharomyces pombe* e a ATM humana) são extremamente sensíveis a danos ou instabilidades nas cromatinas[38, 57, 82]. Essas duas proteínas funcionam como pontos de checagem do ciclo celular e são auto-fosforiladas na presença de radiação ionizante ou agentes químicos mutagênicos. Ambas são capazes de provocar o bloqueio do ciclo celular na fase G2 porém de maneiras distintas: enquanto ATM fosforila preferencialmente Chk2, ATR faz o mesmo fosforilando Chk1[82].

As proteínas Chk1 e Chk2, também conhecidas como proteínas do ponto de checagem 1 e 2, respectivamente, são duas cinases capazes de fosforilar Cdc25C. Por sua vez, a fosforilação de Cdc25C permite que seu inibidor 14-3-3 sequestre-a. Como dito anteriormente: a atividade de Cdc25C que retira o fosfato inibitório de MPF. A conjugação de Cdc25C com 14-3-3 é suficiente para manter MPF inativo e difuso no citoplasma, provocando assim o bloqueio do ciclo celular na fase G2[57, 80-84].

Curiosamente descobriu-se que o vírus Epstein Barr, que causa imortalidade de linfócitos B, é capaz de suprimir os pontos de checagem de dano ao DNA na fase G2[79]. Mostrou-se que o antígeno 3C desse vírus é capaz de inibir a ação de nocodazole (uma droga capaz disparar ATM e provocar o prolongamento do ciclo celular na fase G2. Isso aconteceria porque proteína 3C se liga a Chk2 o que, por sua vez, impede a fosforilação inibitória de Cdc25C[76].

Outros tantos vírus provocam efeito inverso ao do Epstein Barr, eles induzem o bloqueio do ciclo celular na fase G2. Eles fazem isso de diversas maneiras (Figura 7, painéis D, E e F):

seqüestrando Cdk 1 para impedir a conjugação com Cyc B1 como é o caso do baculovírus; o HIV, AAV, B19 e MMV prolongam a fase G2 pela ativação dos pontos de checagem de dano ao DNA, ATM e ATR, induzindo a fosforilação Cdc25C e conseqüentemente inativando-a pela conjugação com seu inibidor 14-3-3; através da fosforilação direta de MPF catalizando a expressão da enzima p21, como é o caso do HPV tipo 16, SV40, BDV e MMS; HIV, JCV e MMV; o HPV e o HIV também induzem à fosforilação inibitória de MFP por intermédio de Wee1; por fim, o HIV também interfere na sinalização da ativação da cinase promotora de mitose (MAPK) [57, 80-83].

A usurpação do ciclo celular pelo HIV é um dos casos mais estudados no contexto de Vpr. Já foi demonstrado, *in vitro*, que o bloqueio da divisão celular na fase G2 favorece a transativação do seu LTR, também foi possível observar aumento de até 18 vezes na produção de partículas virais[43]. Para o vírus da imunodeficiência humana o bloqueio do ciclo celular parece ter conseqüências diretas para a sua patogênese, pelo menos é o que sugere o maior número de células em G2 (se comparado com as células nas outras fases do ciclo celular) na população de linfócitos infectados extraídos de pacientes com AIDS[75]. Novos estudos sustentam que a indução da morte celular por apoptose provocada por Vpr seria uma das conseqüências da ativação de ATR[85].

Embora não exista nenhuma prova de que o HIV cause danos ao DNA ele dispara o ponto de checagem para prolongar a fase G2. A expressão de Vpr, seja sozinho ou no contexto do HIV completo, resulta na ativação de ATR seguido dos seus alvos: Variante X da Histona 2A (H2A-X), subunidade 32kd da Proteína de replicação A (RPA 32), Cinase 1 do ponto de checagem (Chk1), Proteína Associada ao Câncer de Mama (BRCA1) e Proteína 1 ligante de p53(53BP1). Todas essas proteínas desempenham funções importantes no bloqueio do ciclo celular: H2A-X é uma histona sensível à quebra da dupla fita de DNA: quando ocorre dano na estrutura da cromatina H2A-X é fosforilada e recruta o sistema de reparo[86, 87]; RPA 32 é sensível em detectar fitas simples de DNA no genoma e recrutar ATR ativado para o local[86]; a função de Chk1 é parar o ciclo celular quando o DNA apresenta alguma instabilidade[57, 75, 86]; BRCA1 interage com Rad 5 para facilitar a ligação de fitas de cromatinas danificadas[87] e p53BP1 também funciona como um guardião dos danos sofridos pelo DNA ativando p53[72].

Desde a descoberta da ativação de ATR por Vpr o conhecimento em torno do controle do ciclo celular realizado pelo HIV evoluiu relativamente pouco. A maior parte dos novos trabalhos

esclarece apenas o que acontece após a ativação do ponto de checagem de dano ao DNA[88]. A pergunta principal permanece sem resposta: “o que causa a ativação de ATR e consequentemente bloqueio da fase G2 do ciclo celular?”. Ironicamente os mais recentes trabalhos apontam para uma proteína que foi descoberta justamente no contexto de Vpr há mais de dez anos atrás. Inicialmente ela foi chamada de proteína ligante de Vpr (VprBP) mas desde a revisão de Angers [89] VprBP passou a ser chamada de Fator de Associação com Cul4A e DDB1 1(DCAF1).

As funções Cul4A e DDB1 serão exploradas a fundo no próximo tópico, porém, breves comentários são necessários para esclarecer os atuais paradigmas envolvidos no arrasto da fase G2 provocado pelo HIV.

As proteínas Cul4A e DDB1 são subunidade do Sistema Proteassoma-Ubiquitina (UPS), um mecanismo responsável pela degradação de proteínas celulares. Foi demonstrado que o nocaute de DCAF1 simplesmente interrompe a funcionalidade de Vpr sobre o ciclo celular, sugerindo que a degradação de um alvo desconhecido desencadearia o bloqueio do ciclo celular [1, 33, 38-40, 58, 60, 89-93]. Curiosamente o HIV não possui só um gene responsável pelo induzimento do bloqueio da fase G2, ele possui dois. Além do conhecido Vpr, recentemente foi descoberto que Vif também tem sua participação no controle do ciclo celular. Apesar do bloqueio da fase de G2 mediado por Vif ser tímido se comparado com o provocado por Vpr, aparentemente UPS está envolvido em ambos os casos[50].

### **1.8 O sistema ubiquitina-proteasoma.**

O UPS é um mecanismo pós-traducional que a célula utiliza para controlar proteínas que já foram produzidas, através dele é possível degradar determinados peptídeos de acordo com diferentes estímulos do ambiente. Ele é organizado por uma seqüência de adaptadores que recrutam a proteína específica a ser degradada [89]. Falhas nesses adaptadores podem gerar conseqüências desastrosas como a morte celular, inibição do desenvolvimento embrionário e doenças neurodegenerativas. Isto porque o UPS controla vias metabólicas importantíssimas, entre elas o ciclo celular, o que o torna um ótimo nicho a ser explorado por microorganismos patogênicos, entre eles vírus e bactérias[89].

Enfatizando no controle do ciclo celular, nota-se que UPS está presente em muitas etapas dessas vias metabólicas, por exemplo: durante o progresso do ciclo celular a passagem da fase

G1 para a fase S é marcada pela degradação dos inibidores do complexo ciclina-CDK da fase S. Basicamente o que acontece é que o complexo ciclina-CDK de G1 fosforila os inibidores do complexo ciclina-CDK da fase S[78], isso provoca o recrutamento de UPS que por sua vez induz a degradação da proteína inibitória via proteassoma. Assim, sem o inibidor, o complexo ciclina-CDK da fase S fica livre para ativar a síntese de DNA.

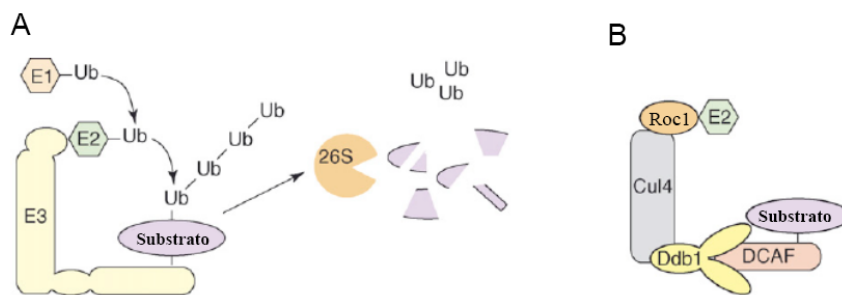
O funcionamento do UPS é bastante simples: ele recruta a proteína alvo para adicioná-la a uma cadeia de ubiquitina (Ub). A Ub é uma unidade proteica que liga-se a ela mesma e forma longos polímeros. A chamada poliubiquitinação de uma proteína funciona como um sinal de envio para o proteassoma 26S, um complexo protéico especializado em degradar proteínas[89].

Se por um lado o funcionamento de UPS é simples, por outro lado a sua organização é bastante complexa. Essa complexidade é devida à quantidade de vias metabólicas que ele controla e o número significativamente menor de fatores envolvidos[78, 89, 92, 94, 95]. Esses fatores são ligases que podem ser divididas em 3 categorias E1, E2 e E3. O mais complexo deles é a ligase E3 e o motivo é óbvio, através da E3 que o sistema pode recrutar o alvo celular de maneira específica. Na dinâmica do UPS a ligase E3 segura o alvo celular enquanto permanece ligada à ligase E2, a E1 carrega a Ub para dentro do sistema e transfere para E2 que então adiciona o monômero ao substrato [89].

Como dito anteriormente, ligase E3 é uma categoria de fatores de UPS de alta complexidade, isso porque a E3 ligase pode ser formada desde apenas uma proteína que liga UPS até a combinação de um ou mais adaptadores, ou, fatores de associação à ligase E3. Até o momento só são conhecidos três principais tipos de ligases E3: HECT Ub ligase, RING de ligação simples e RING de múltiplas subunidades de ligação que também são conhecidos como CRUL - Cullin RING Ub Ligase - onde Cullin é o nome da família das proteínas: Cul1, Cul2, Cul3, Cul4A e Cul5[89].

Especialmente no caso de Cul4A por exemplo ela pode recrutar alvos celulares através da associação com outros adaptadores como a proteína ligante ao dano de DNA (DDB1). Análises proteômicas dessa associação, Cul4A-DDB1, revelou 20 Fatores Associados a DDB1-Cul4A (DCAF) (Figura 6B) e entre esses fatores foi encontrado DCAF1 que anteriormente foi descrito como proteína ligante de Vpr (VprBP)[89, 96]. Curiosamente já havia sido reportado que inibidores de UPS impediam Vpr de bloquear o ciclo celular, Lê Rouzic e seus colaboradores foram os primeiros a sugerir que DDB1-Cul4A e DCAF1 estariam envolvidos no efeito

citopático induzido por Vpr, em seguida pelo menos outros 6 laboratórios chegaram a mesma conclusão [1, 33, 38-40, 58, 60, 89-93]. Embora saibam-se que Vpr induz o prolongamento da fase G2 do ciclo celular pela ativação do ponto de checagem de dano ao DNA via ATR, como Vpr induz a fosforilação de ATR é uma questão que permanece sem esclarecimento[37]. Nosso grupo tem demonstrado que inibição da expressão de DCAF1 por ação de um RNA de interferência impede o efeito de afidicolina, uma droga que interrompe o ciclo celular na fase G2 através da ativação de ATR[38].



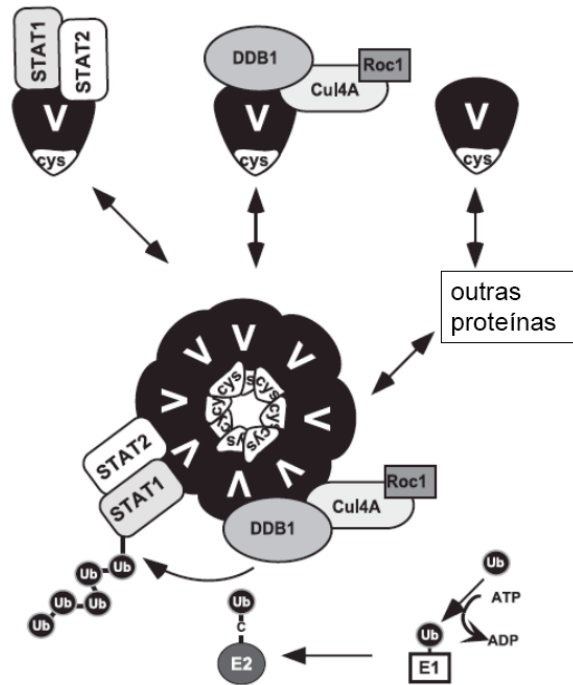
**Figura 8. Esquematização do UPS [89] (adaptado).** O sistema ubiquitina proteassoma controla diversas vias metabólicas, entre elas o ciclo celular, através da degradação de proteínas específicas. A) Ele é composto de 3 ligases e um proteassoma; a ligase E1 trás Ub para dentro do sistema e transfere para a ligase E2, essa segunda encontra-se ancorada na ligase E3. A ligase E2 tem como função principal transferir os monômeros de Ub para o substrato que deverá ser degradado, já a ligase E3 é composta de diversos adaptadores que combinados consegue se ligar seletivamente à alvos que devem ser poliubiquitinados. A poliubiquitinação funciona como um sinal que direciona o substrato ao proteassoma 26S que por sua vez executa a degradação da proteína alvo. B) A ligase E3 Cul4-DDB1 possui uma série de adaptadores que permite recrutar alvos diferentes, esses adaptadores são chamados de DCAFs. Curiosamente um desses DCAFs, no caso DCAF1, interage com Vpr, porém, essa interação ainda não é completamente entendida.

### 1.9 Microorganismos usurpam UPS em seu favor.

É com extrema precisão, e porque não dizer audácia, que patógenos utilizam UPS para controlar o metabolismo celular em seu benefício. Já foram descritos diversas vias metabólicas controladas por UPS que são exploradas por microorganismos patogênicos, um dos exemplos mais elegantes é a modulação do sistema imunológico pelo Vírus Simiano 5 (SV5) (Figura 9).

A resposta imunológica contra vírus pode ser modulada através de IFN- $\gamma$ , esta citocina controla uma série de genes antivirais que modulam mecanismos inflamatórios, multiplicação celular e induzem à apoptose, tudo isso na tentativa de impedir a proliferação desses patógenos através do organismo [1]. No entanto, esse controle não é necessariamente direto, ou seja, o IFN- $\gamma$  necessita de fatores chamados de sinais de transdução e ativadores da transcrição (STAT). São conhecidos pelo menos três tipos de STAT: STAT1, STAT2 e STAT3. Tais fatores são essenciais para a expressão de genes sensitivos a IFN- $\gamma$ , pois são eles que se ligam aos promotores desses genes[1].

Curiosamente a meia vida dos STATs é bastante longa, normalmente as suas atividades são inibidas por tirosina fosfatoses nucleares, entretanto, a simples expressão da proteína V de SV5 provoca o desaparecimento de STAT1. Ulane e seus colaboradores demonstraram que V é capaz de ligar-se à DDB1 e Cul4A e auto-polimerizar-se para então recrutar STAT2 em associação com STAT1, em seqüência V induz a poliubiquitinação de STAT1 e sua conseqüente degradação via proteassoma 26S[1].



**Figura 9. A proteína V de SV5 induz a degradação de STAT1 para modular a resposta imune induzida por IFN- $\gamma$  [1] (adaptado).** V se liga a UPS através da sua afinidade por Cul4A-DDB1, com ajuda de outras proteínas V se polimeriza e recruta STAT1-STAT2 para o sistema. Somente STAT1 é poliubiquitinada e degradada.

Atualmente sabe-se que o HIV é um vírus que explora UPS extensivamente durante sua patogênese. Por exemplo, para aumentar o brotamento viral e evitar superinfecção, a proteína Vpu do HIV induz a degradação do receptor viral, a molécula CD4, através de uma ligase E3  $\beta$ Trcp [92]. Outro exemplo clássico diz respeito à imunidade inata contra retrovírus, as células de

primatas possuem deaminases que durante a transcriptase reversa induzem inúmeras mutações no DNA viral. Essas enzimas, APOBEC3G e APOBEC3F, retiram o grupamento amino das citosinas transformando-as em uracilas numa taxa tão elevada que inviabiliza a replicação viral. Através da sua proteína Vif, o HIV se liga a UPS através da ligase E3 Clu5 para poliubquitinar APOBEC3G/F e, conseqüentemente, degradá-las[94].

O gene Vpr, como dito anteriormente, é extremamente conservado em lentivírus de primatas, reflexos do seu fenótipo, como bloqueio do ciclo celular na fase G2 e indução à apoptose, podem ser observados tanto *in vitro* quanto *in vivo* e, além disso, a restauração da ORF de vírus Vpr defectivos demonstrou que ele é extremamente relevante para a patogênese do vírus causador da AIDS. A exemplo de outras proteínas do HIV, Vpr também interage com UPS através da ligase E3 Cul4A-DDB1-DCAF1[37]. Aparentemente a inibição dessa interação previne a ativação de ATR e conseqüentemente impede que Vpr bloqueie o ciclo celular. Isso sugere que a associação de Vpr com UPS visaria a degradação de um alvo celular que levaria à ativação de ATR[38]. A descoberta desse alvo celular poderia ajudar a explicar como o HIV provoca o bloqueio do ciclo celular. Assim, no presente estudo nos propomos explorar a possível participação da proteína viral Vpr em mecanismos patogênicos envolvidos na Síndrome de Imunodeficiência Adquirida.



## ***2. Objetivos***

## **2.1 Relevância da Pesquisa & Objetivos**

Levando em consideração a situação atual da pesquisa em HIV / AIDS, a qual atingiu uma encruzilhada marcada pelo surgimento de novos paradigmas, como: a presença de variantes resistentes a inibidores presentes no coquetel anti-retroviral; a permanência de reservatórios virais latentes; a falha dos testes de vacinas; a presença de efeitos tóxicos colaterais causados pelo tratamento e por último o alto custo das drogas disponíveis no mercado, a pesquisa de mecanismos básicos de patogêneses tornou-se de crucial importância na identificação de novos alvos farmacológicos e no conseqüente desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

A indução a apoptose e inibição do ciclo celular durante a fase G2 são apenas algumas das atividades desempenhadas pela proteína viral R do HIV que já foram observadas *in vivo*. O conhecimento dos mecanismos patogênicos dessa proteína poderiam ajudar na compreensão da patogênese da AIDS, bem como na descoberta de novos alvos terapêuticos.

## **2.2 Objetivo geral**

Determinar a relevância fisiológica de proteínas celulares relacionadas ao sistema ubiquitina-proteassoma na inibição do ciclo celular mediada pela proteína Vpr.

## **2.3 Objetivos específicos**

- Avaliar a participação da proteína DCAF-1 na inibição do ciclo celular por Vpr.
- Estudar a possível ligação de DCAF e DBD1 a Vpr.

### *3. Materiais e Métodos*

### 3.1 Linhas celulares

Foram usadas as linhagens celulares 293FT (células embrionárias de rim humano) e HeLa (células derivadas de tumor cervical), ambas foram cultivadas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em meio “Dulbecco Modified Eagle Medium” (DMEM) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal e 2 mM de L- Glutamina.

### 3.2 Plasmídeos e produção de vírus

Os mutantes de Vpr - Vpr(Q65R), Vpr(R80A) e Vpr(Q65R-R80A) - foram construídos baseado na arquitetura de pHR-HA Vpr-IRES-GFP. Estes clones foram pontualmente mutados, seguindo as direções da STRATAGENE® no seu kit de mutação direcionada por “primers”: Quikchange II XL. As substituições dos aminoácidos foram forçadas pela mudança dos códons através da substituição de nucleotídeos localizados nos pontos de interesse. As mutações foram feitas utilizando os seguintes pares de primers

Vpr(Q65R)

5'CCATAATAAGAATTCTGCAACGACTGCTGTTTATCCA3' e  
5'TGGATAAACAGCAGTCGTTGCAGAATTCTTATTATGG3';

Vpr(R80A)

5'GAATTGGGTGTCGACATAGCGCAATAGGCGTACTCGACAG3' e  
5'-CTGTCGAGTAACGCCTATTGCGCTATGTCGACACCCAATTC-3'.

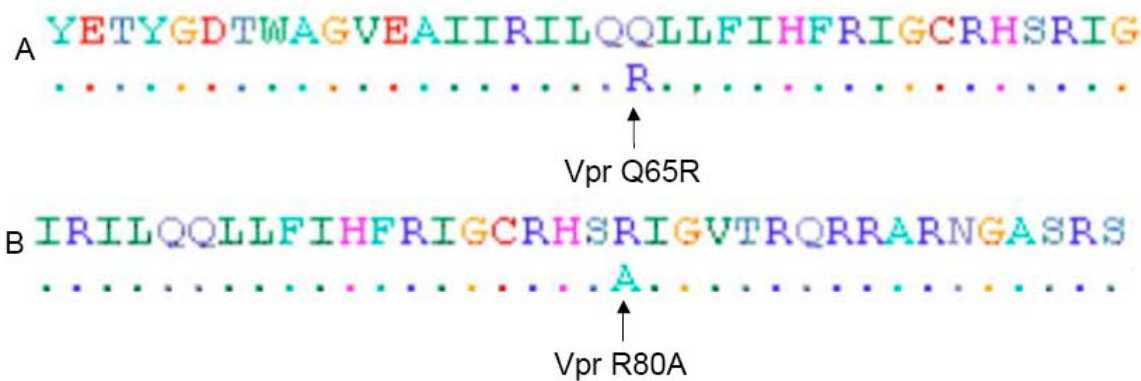


Figura 10. Substituições de resíduos de aminoácidos na sequência de Vpr. Nas figuras A e B as letras

representam a sequência de aminoácidos de Vpr (tipo selvagem) e os pontos indicam onde os mutantes possuem resíduos idênticos em posições equivalentes, as setas indicam onde os aminoácidos foram substituídos. A) Esquema da mutação induzida em Vpr (Q65R). B) Esquema da mutação induzida em Vpr(R80A).

Para construir os vetores lentivirais foram utilizados os plasmídeos: pHR-HAVpr-IRES-GFP, que carrega virions capazes de expressar Vpr, ou, seus respectivos mutantes Vpr(Q65R), Vpr(R80A) e Vpr(Q65R-R80A); pCMV-VSVG[97] que expressa o envelope viral do vírus VSV-G (Vírus da Estomatite Infecciosa) [97] e pCMV  $\Delta$ R8.2 $\Delta$ Vpr[98] que expressam apenas proteínas essenciais para o empacotamento viral e integração do vetor como p24, IN e RT. Como controle foi utilizado um pHR-GFP, que tem as mesmas seqüências de pHR-HAVpr-IRES-GFP, porém, não expressa nenhum Vpr ou HA, apenas GFP.

Partículas virais produzidas por esse método são incapazes de se replicar dentro da célula, por isso também são chamados de replicantes incompetentes. Isso porque o genoma que é empacotado dentro do vetor lentiviral não possui os genes estruturais (essenciais) para a formação de capsídeo, transcriptase reversa, integrase ou mesmo um envelope.

O empacotamento do virion contido em pHR-HAVpr-IRES-GFP ocorre graças a um fragmento do gene Gag, que é essencial para o recrutamento do virion para o interior da partícula viral. As seqüências de LTR permitem o reconhecimento da IN e conseqüentemente integração do genoma viral no hospedeiro.

Os genes contidos nos plasmídeos pCMV-VSVG e pCMV  $\Delta$ R8.2 $\Delta$ Vpr não são incorporados aos vírus produzidos através desse protocolo. O envelope utilizado, bem como os componentes que formam a partícula viral só são expressos nas células transfectadas por esses plasmídeos, porque eles não possuem LTR e nem o sinal para o empacotamento viral.

Quando novas células são infectadas com esses vetores lentivirais a transcriptase reversa e a integração ocorre graças à RT e IN, que foram empacotadas dentro do vírus quando eles foram formados. A deleção do gene que codifica o envelope do HIV-1 é substituída pela expressão do envelope de outro vírus, o VSV-G. O uso desse envelope possibilita a infecção de células CD4-, conseqüentemente facilita o estudos em linhagens celulares como Hela e 293T.



foi ressuspenso e finalmente congelado em alíquotas de 200 µl a -80 °C.

A titulação das partículas virais foi realizada por meio de transdução de  $3 \times 10^5$  células Hela num volume total de 1,5ml ; nessa mistura continha DMEM completo mais 10ug/ml de Polibrene e solução de vírus. As infecções eram feitas em três diferentes concentrações de vírus: 100µl, 33µl e 11µl.

A quantidade de unidade de partículas infecciosas (vírus) foi mensurada indiretamente pela expressão de GFP. Brevemente, após 48 h de infecção, as células foram tripsinizadas, ressuspenso em 1ml de tampão FACS (1 x PBS. 0.1% BSA. 0.09% Sódio azidico), centrifugado a 1000rpm por 5 minutos e ressuspenso novamente em 0,5 ml de tampão FACS. As células foram então analisadas no FACS para determinação dos níveis de expressão da proteína GFP. O programa Cellquest foi utilizado para validar a frequência de células (porcentagem) GFP positivas. A titulação foi realizada usando a seguinte fórmula:

$$(F \times C_0 / V)D$$

*F*: é a porcentagem de expressão de GFP; *C<sub>0</sub>*: o número total de células no momento da infecção; *V*: o volume total do inoculo e *D* é o fator de diluição.

Nos casos onde foram utilizados vetores lentivirais as células foram infectadas de acordo com a unidade infecção múltipla (MOI) calculada na titulação de cada vírus. Entende-se por um MOI ideal, o volume mínimo da suspensão de vetores lentivirais suficiente para infectar 100% do número de células.

Nos vetores pHR, a expressão de Vpr e GFP não são necessariamente iguais pois ambos possuem seus próprios códons de iniciação e de parada e, ainda, eles possuem diferentes distâncias do promotor CMV exatamente por causa disso que existe um IRES antes de GFP. É importante ressaltar isto, pois ao longo desses anos que nosso grupo vem trabalhando com o vetor pHR, observou-se que a MOI ideal encontra-se por volta de 70% de células GFP positiva. Quando utilizando a MOI correspondente a 70% de células GFP positivas nos nossos experimentos, foi possível observar que cerca de 90% das células apresentam o ciclo celular bloqueado na fase G2/M quando Vpr está presente.

O cálculo de MOI é necessário, pois principalmente no caso do gene Vpr, que por natureza é um gene que provoca apoptose, altas dosagens de partículas virais causam a morte precoce das células. Experimentalmente nunca foi observado uma transdução que resultasse mais de 99% de células GFP positivas, isso demonstra que nossos métodos de análise são

extremamente sensíveis e podem detectar variações ocorridas em uma única célula.

Apesar do método de quantificação de vetores lentivirais baseado na expressão de gene repórter, seja uma quantificação indireta, ela é amplamente utilizada e aceita por jornais de alto impacto. Dentre as vantagens de se utilizar GFP como gene repórter na titulação de vetores lentivirais, se destaca o protocolo que é extremamente simples e baixo custo, uma vez que não é preciso usar nenhum tipo de kit comercial. De qualquer forma, cálculo preciso de MOI é necessário para evitar os efeitos de uma indesejável super infecção que poderia influenciar principalmente os experimentos onde mais de um tipo de vírus é contransfectado.

Se for seguido o protocolo aqui descrito para a produção de vetores lentivirais, recomenda-se o que foi feito neste trabalho: quantificar os vírus, separadamente, em volumes 100µl, 33µl e 11µl e calcular a titulação (ver fórmula página anterior) estimada pela média aritmética dos resultados obtidos; após isso é necessário calibrar titulação em um novo experimento com 3 amostras variando cerca de 15% da titulação média, por exemplo: se a titulação estimada indicar que 50µl de solução contendo vírus é suficiente para que 70% expressem GFP a o experimento de calibração será com amostras contendo:  $50\mu\text{l}-15\%=42,5\mu\text{l}$ ;  $50\mu\text{l}$  e  $50\mu\text{l}+15\%=57,5\mu\text{l}$ .

### **3.3 Transfecção de plasmídeos**

As células foram plaqueadas com um dia de antecedência em quantidades dependentes do tamanho do recipiente, de forma que no dia da transfecção fosse possível obter uma confluência de 50-80%. Antes de qualquer tipo de transfecção, o meio de cultura era substituído com 1h de antecedência.

Foram utilizadas três técnicas de transfecção: as células Hela e HEK293T foram transfectadas utilizando oligofectamina® (invitrogen) e Polyfect® (Quiagen), respectivamente, seguindo as instruções do fabricante; alternativamente ambas as linhagens celulares foram transfectadas utilizando pelo método do fosfato de cálcio seguindo o protocolo abaixo.

Brevemente, a transfecção por fosfato de cálcio era utilizada principalmente para a produção de vetores lentivirais. Para isso, utilizava-se uma mistura de plasmídeos que codificavam o gene de estudo, o capsídeo e as proteínas necessárias para integração e o envelope viral. No momento da transfecção, a solução de plasmídios era diluída em 900 µl de água



destilada contendo 100ul de  $\text{CaCl}_2$  2,5 M. Posteriormente, adicionava-se, gota a gota, 1ml de 2X HBS (NaCl 280 mM; KCl 10 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.5 mM; dextrose 12 mM; Hepes 50 mM) sob agitação para favorecer a formação dos cristais de fosfato de cálcio. Finalmente a solução era espalhada sobre a camada de células seguida de leve agitação. Em seguida as células eram postas na incubadora por cerca de 12-16 horas e logo depois o meio de cultura era trocado por meio de cultura novo.

### **3.4 Transdução das partículas virais:**

Para estimar a titulação seguindo os procedimentos básicos de passagem de células, do dia anterior as células eram passadas recipientes de placas de 6 poços numa densidade de aproximadamente  $3 \times 10^6$ / poço e o meio de cultura foi substituído por um novo no dia da infecção. Em um volume final de 1,5ml, a quantidade de vírus indicada pelo MOI era diluída em DMEM completo contendo 10 $\mu$ g de polibrene. Após a infecção, o meio de cultura era trocado a cada 24h.

### **3.5 Transfecção dos RNA de Interferência:**

Nos experimentos onde foi necessário inibir a expressão de DCAF1 utilizou-se RNA complementar a seqüência do mRNA de DCAF1 numa técnica conhecida por RNA de interferência (siRNA). Para evidenciar que a inibição de DCAF1 foi específica utilizou-se como controle uma seqüência de siRNA aparentemente sem especificidade por nenhum mRNA celular. Os siRNAs não específicos (NESiRNA) e específicos para DCAF1 (DCAF1siRNA) (CACACACACACACACACACAC E CCACAGAAUUUGUUGCGCAUU, respectivamente), foram adquiridos da companhia Dharmacon e transfectados com oligofectamina® (invitrogen) como indicado pelo fabricante.

### **3.6 Análise do ciclo celular**

48h após transdução com os diferentes vetores lentivirais, as células Hela foram ressUSsendidas em tampão de FACS e centrifugadas a 1000 rpm por 5min. O sobrenadante foi

aspirado e as células fixadas adicionando-se 2 ml de Etanol 70% a -20 °C, gota a gota, e incubado-as a -20 °C por 12h. No dia seguinte as células foram ressUSendidas em 0,5 ml de tampão PI (20 g/ml iodeto de propídio, 11.25 kunitz unidades/ml RNase A in PBS) e seu ciclo celular analisado por citometria de fluxo. O iodeto de propídio se liga ao DNA da célula, essa ligação pode ser observada pela incidência de luz ultravioleta (UV). O aparelho FACS possui um feixe de UV seguido de um receptor super sensível que permite captar a fluorescência de uma única célula. O programa Cellquest agrupa esses pontos em populações de acordo com o seu conteúdo celular, nesse caso de acordo com a quantidade de DNA. Dessa forma é possível determinar se as células estão na fase G2/M, momento em que genoma se encontra multiplicado em 2. Através de um sistema de selecionamento é possível escolher as células que não estão grudadas a outras células e também separar das células mortas e, ou, rompidas. O programa conta 10.000 eventos dentro da janela selecionada e o cálculo da porcentagem de células nas fases G1, S e G2/M foi obtida com o programa ModFit®.

### **3.7 Preparação dos extratos protéicos**

24 horas pós-transfecção o meio de cultura foi aspirado e as células lavadas com solução de PBS. Posteriormente, as células foram coletadas pela adição de 2ml de solução de tripsina 10% diluída em PBS e posteriormente a tripsina inativada pela adição de 3 ml de DMEM completo. Finalmente, a sUSensão celular foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos e o precipitado lavado com 5ml de PBS.

O precipitado celular foi lisado em 2ml de tampão para lise-e-imunoprecipitação (IP) (20 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.5mM EDTA) suplementado com inibidores de protease (Complete tablets; Roche) e incubado por 10 minutos no gelo. Os lisados foram centrifugados a 2.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante estocado a -80 °C. A determinação da concentração protéica foi realizada em alíquota de 1 ml pelo método de Bradford (Bradford (1976)).

### **3.8 Co-imunoprecipitação**

Para facilitar a detecção das diferentes proteínas, as células HEK293FT foram

transfectadas com vetores que expressam as proteínas de interesse fusionadas com as proteínas HA ou Flag. Dessa forma os imunoprecipitados puderam ser analisados quanto à presença simultânea de Flag e HA. A marcação foi realizada utilizando-se 1µl (quantidade padronizada por titulação) de anticorpo policlonal específico, sob agitação por uma hora a 4 °C. Em seguida, foi adicionado 20ul Proteína A/G agarose (Santa Cruz Biotechnology) incubando-se durante a noite a 4 °C sob agitação. Na manhã do dia seguinte as amostras foram centrifugadas à 2500 rpm por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado 5 vezes com tampão IP para finalmente ser ressuspensionado em 40ul em tampão para eletroforese.

### **3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida & Western Blot (WB)**

Aproximadamente 15µg de cada amostra foi misturada com 9,5 µl da solução desnaturante 4X XT, 0,5µl da solução redutora XT (ambas disponibilizadas pela BioRad, Hercules, Calif) e tampão IP até volumem final de 40 µl.. Posteriormente, ferveu-se as amostras por 5 min.. As amostras foram analisadas por eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando-se géis de poliacrilamida Criterion XT bis-tris gel (Bio-Rad, Hercules, Calif.) com gradiente de concentração de 4-12%.

A eletroforese foi realizada verticalmente em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8; glicina 250 mM e SDS 0,1%) a uma voltagem constante de 100 Volt, utilizando-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 "polivinilene difluoride" (Millipore, Bedford, MA) em um sistema semi-seco de transferência horizontal (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) conforme as recomendações do fabricante. A transferência teve duração de 60 min. à corrente constante de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> 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 1:100 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 1:10.000 em tampão PBS-leite por 1 hora à temperatura ambiente, ou durante a noite a 4 °C. 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<sub>2</sub> 5 mM. A reação de revelação foi interrompida com lavagens sucessivas com água destilada. As massas moleculares das proteínas foram determinadas por comparação com o marcador de peso molecular.

A hemaglutinina (HA) fusionada aos vetores pHR foi marcada utilizando-se o anticorpo policlonal primário de rato anti-HA.11 (16B12) adquiridos pela Covance®. O radical Flag que está fusionado a DCAF1 foi marcado utilizando-se o anticorpo policlonal primário de rato anti-Flag da Sigma®. Para detectar DDB1 endógeno utilizou-se o anticorpo policlonal primário de rato anti-DDB1 da ABMCAM® e DCAF1 endógeno foi marcado pelo anticorpo policlonal sedido pelo Dr. Ling-Jun Zhao da Universidade de Saint Louis.

### **3.10 Indução do Bloqueio do Ciclo Celular.**

Nos experimentos onde foram usados Afidicolina e Etoposide para simular o prolongamento do ciclo celular na fase G2 as concentrações dessas drogas foram mantidas respectivamente a 0,3 µM e 10 µM.

#### ***4.Resultados***

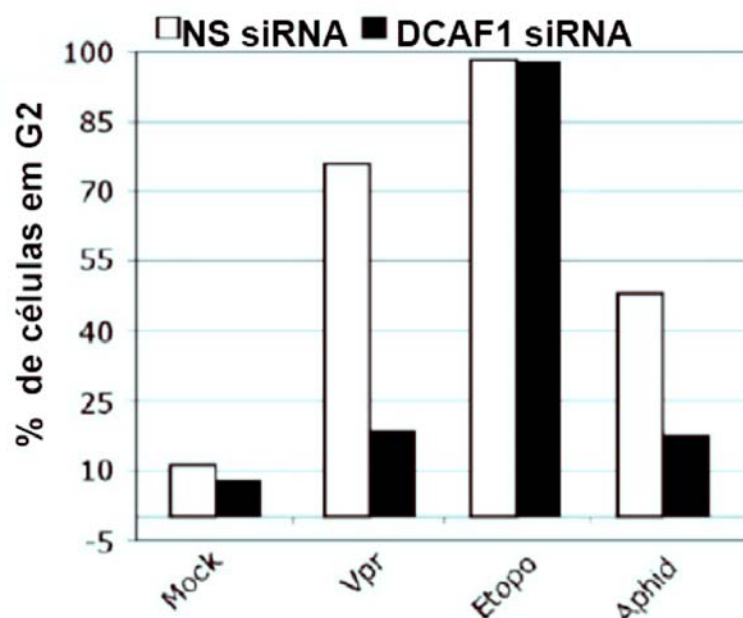
#### 4.1 DCAF-1 e requerida para a inibição do ciclo celular em G2 mediada por Vpr

Os primeiros indícios de que DCAF1 poderia atuar no UPS foram descobertos em 2006 [89], mais de 10 anos após a descoberta da interação de DCAF1 com Vpr [96]. Mesmo depois de tanto tempo até o momento não se sabe a função de DCAF1 no ciclo celular e, ou, da relevância fisiológica de sua interação com Vpr [37]. Dentro deste contexto traçamos como primeiro objetivo elucidar o papel de DCAF1 numa das principais funções de Vpr: o bloqueio do ciclo celular. Para isto a atividade da proteína viral foi avaliada em células Hela onde a expressão endógena da proteína DCAF1 foi inibida pelo uso da técnica de RNA de interferência (siRNA) (Figura 12A). A deleção de DCAF1 não afetou o ciclo celular na ausência de Vpr conforme indica o controle negativo (Figura 12A). Entretanto, a diminuição da expressão da proteína do hospedeiro inibiu quase por completo a influência de Vpr sobre o ciclo celular (Figura 12B). Esse resultado nos sugeriu que DCAF1 seria requerida por Vpr para induzir inibição do ciclo celular uma vez que na falta de DCAF1 ocorre o a liberação do bloqueio do ciclo celular provocado por Vpr.

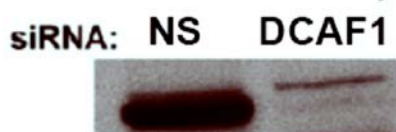
Com objetivo de verificar a especificidade da participação de DCAF1 no bloqueio do ciclo celular mediado por Vpr avaliamos o efeito do etoposide [10  $\mu$ M], um inibidor da atividade de topoisomerase II e conseqüentemente do ciclo celular. Interessantemente, a deleção de DCAF1 não teve efeito na inibição do progresso do ciclo celular mediada por esta droga (Figura 12B).

O tratamento com etoposide induz a quebra da fita dupla de DNA levando ao bloqueio do ciclo celular por ativação de ATM, ATR e, ou, DNA-PK [100]. Entretanto, é conhecido que o bloqueio mediado por Vpr envolve apenas a via de ATR [57, 87] Com objetivo de confirmar a participação de DCAF-1 na inibição do ciclo celular exclusivamente pela via de ATR, repetimos os experimentos usando afidicolina, uma droga que utilizada em baixas dosagens inibe a atividade da DNA polimerase levando ao bloqueio do ciclo celular na fase G2 em decorrência da indução da auto fosforilação única e específica de ATR [80]. A inibição da produção endógena de DCAF1 pelo uso de siRNA resultou numa forte inibição do efeito da afidicolina, sugerindo que DCAF1 estaria especificamente relacionado ao bloqueio do ciclo celular via ATR (Figura 12B).

**A.**



**B.**



**Figura 12. Função de DCAF1 no bloqueio do ciclo celular induzido por Vpr.** Células Hela foram transfectadas com NE-siRNA e DCAF1-siRNA. NE-siRNA é um RNA de interferência não específico com tamanho comparável ao outro RNA de interferência utilizado, o DCAF1-siRNA, que inibe por sua vez é capaz de inibir a especificamente a expressão de DCAF1. A) A especificidade e eficiência da deleção do DCAF1 endógeno pela técnica de RNA interferência pode ser observado comparando as colunas NE e DCAF1, respectivamente transfectadas com NE-siRNA e DCAF1-siRNA. B) siRNA-DCAF1 é capaz de inibir o bloqueio do ciclo celular induzido por Vpr e afidicolina (Afid) porém não afeta o bloqueio provocado por etoposide (Etopo), sugerindo que DCAF1 atuaria especificamente no ponto de checagem de dano ao DNA mediado por ATR.

#### **4.2 DCAF1 liga Vpr a Cul4A - DDB1.**

A chamada VprBP mudou de nome para DCAF1 em 2006 quando foi descoberto que essa proteína atuaria como um adaptador de Cul4A-DDB1, formando uma E3 ligase que potencialmente recruta alvos celulares para serem degradados[89]. Em 2007 Lê Rouzic e seus colaboradores foram os primeiros a demonstrar que DCAF1 estaria envolvido no bloqueio do

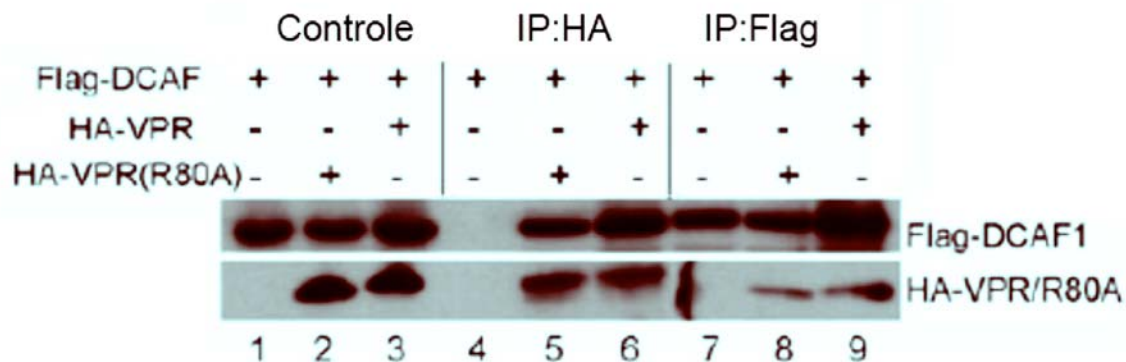
ciclo celular induzido por Vpr [39]. Poucos meses depois outros 6 laboratórios, inclusive o nosso grupo de pesquisa, chegaram à mesma conclusão [38, 40, 60, 90, 91, 93] . A maioria desses trabalhos foram consistentes em propor um modelo para a interação de Vpr com UPS através de DCAF1. Schrofelbauer e seus colaboradores propuseram um modelo onde a interação de VPR com a E3 ligase Cul4A-DDB1 direcionaria a degradação de duas dUTPases UGN2 e SMUG porém sem considerar que DCAF1 poderia estar participando dessa via metabólica [58]. A interação de Vpr com DCAF1 já foi demonstrada anteriormente, porém gostaríamos de saber se Vpr interage com DCAF1 para provocar o prolongamento da fase G2 do ciclo celular. Além disso, sabendo que naturalmente DCAF1 interage Cul4A-DDB1 na ausência de HIV-1 [89], também decidimos avaliar a possível a função de DCAF1 no contexto de Vpr e DDB1.

Dessa forma células Hela foram transfectadas separadamente com plasmídeos que codificam as proteínas: DCAF-1 (Flag-DCAF1), Vpr do tipo selvagem (HA-Vpr) e uma mutante Vpr-R80A [HA-Vpr(R80A)] que é incapaz de induzir o bloqueio do ciclo celular [75, 85]. Após 48h, o extrato celular foi imunoprecipitado com os anticorpos anti-Flag ou anti-HA, posteriormente foram analisados por WB (Figura 13).

A análise pontual das linhas 5 e 8 da Figura 8 apontam que a mutante Vpr(R80A) é capaz de se ligar a DCAF1 com eficiência similar ao tipo selvagem de Vpr (Figura 13, linhas 6 e 9). A única diferença de Vpr para Vpr(R80A) é uma substituição na posição do resíduo aminoácido de número 80. Essa mutação é suficiente para impedir que a mutante provoque o bloqueio do ciclo celular. A respeito dessa substituição cabe ressaltar que ela se encontra numa região extremamente conservada nos lentivírus de primatas, a região conhecida como: HSRIG.

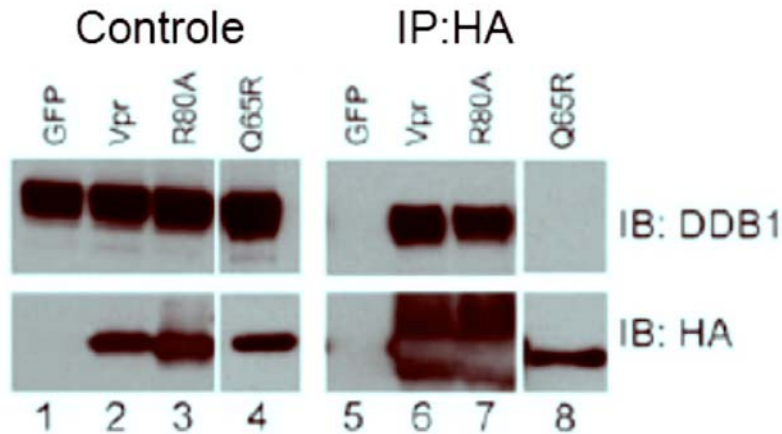
Se a simples interação com DCAF1 fosse suficiente para Vpr provocar o prolongamento de G2 seria esperado que Vpr(R80A) não se ligaria a DCAF1, porém tomando como base os dados da figura 12(que indicam que DCAF1 é necessário Vpr provocar o arrasto da fase G2 ) somados ao mostrado na figura 13 (até uma mutante de Vpr inativa foi capaz de se ligar a DCAF1) concluímos que a interação de Vpr com DCAF1 é necessária porém não é suficiente para Vpr induzir o bloqueio do ciclo celular.





**Figura 13. Co-imunoprecipitação de Vpr e DCAF1.** Após 48h de transfecção os extratos celulares foram imunoprecipitados com anticorpo anti-HA (IP:HA) e anti-Flag (IP:Flag) e posteriormente submetidos a WB usando anticorpos anti-Flag e anti-HA, como indicado. Bandas nas linhas 6 e 9; 5 e 8 indicam que ambas as versões de Vpr (HA-Vpr e Vpr-R80A) co-imunoprecipitam com DCAF1 independentemente de causarem o prolongamento do ciclo celular ou não.

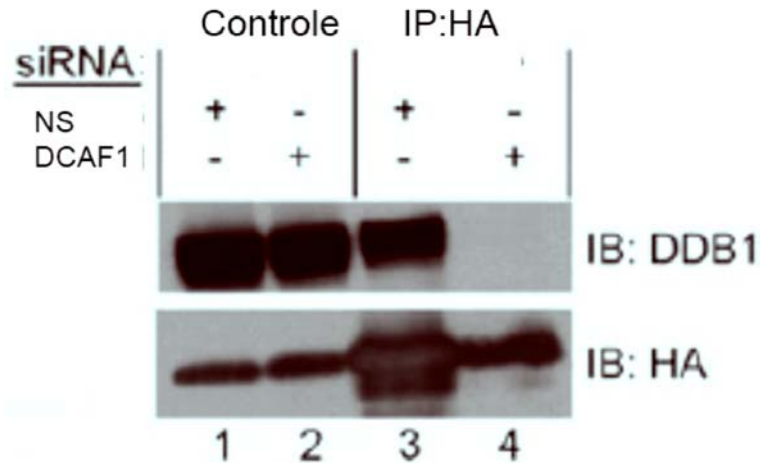
Sabendo que DDB1 é o ligante natural de DCAF1 [89], nos perguntamos se Vpr poderia se ligar também a DDB1. Para testar esta hipótese foram obtidos extratos protéicos de células Hela transfectadas separadamente com HA-Vpr, HA-Vpr(R80A), HA-Vpr(Q65R) e a proteína fluorescente verde (GFP). Esses dois últimos vetores foram usados como controle negativo uma vez que GFP e a mutante Q65R não interagem com DCAF1. Os extratos foram imunoprecipitados com anticorpo anti-HA e analisados por WB com anticorpo anti-DDB1 ou anti-HA (Figura 14A). Dessa forma foi possível observar que R80A continua se ligando a DDB1(Figura 14A, coluna 7) e, curiosamente, a interação ocorre na mesma intensidade da ligação Vpr(R80A)-DCAF1 (Figura 13, linhas 5 e 8); também observou-se que Vpr(Q65R) é incapaz de ser co-imunoprecipitado com DDB1 (Figura 14 B, linha 6). Paralelamente, corroborando com estudos anteriores, foi demonstrado que Vpr (Q65R) também é incapaz de se ligar a DCAF1 (Figura 14 B, coluna 6).



**Figura 14. Co-imunoprecipitação de Vpr-DDB1 e Vpr-DCAF1.** Células Hela foram transfectadas com os vetores expressando as diferentes versões de Vpr e a proteína fluorescente verde, co-imunoprecipitados com anticorpos anti-HA e submetidos a WB com anticorpos anti-DDB1 e anti-HA. A) Os extratos celulares foram imunoprecipitados com anticorpos anti-HA e submetidos a WB na presença de anticorpos anti-DDB1 e anti-HA. Na coluna 7 é possível observar que R80A continua interagindo com DDB1 enquanto Q65R, na linha 8, não pode ser co-imunoprecipitado. B) Os extratos celulares foram imunoprecipitados na presença de anticorpos anti-HA e submetidos a WB para verificação da interação entre Q65R e DCAF1, como demonstrado na coluna 6 Q65R é incapaz de interagir com DCAF1.

Aparentemente a ligação de Vpr com UPS é dependente de DCAF1. Essa teoria é corroborada pelo fato de Vpr(R80A) - que possui o domínio LR intacto - continua interagindo com DCAF1 consequentemente foi co-imunoprecipitada com DDB1 (Figura 14, coluna 7), ao mesmo tempo em que Vpr(Q65R) - que possui o domínio LR alterado - não se liga a DDB1.

Para avaliar a relevância de DCAF1 no contexto da interação de Vpr com DDB1 transfectamos células Hela com o vetor HA-Vpr e eliminamos o DCAF1 endógeno por meio de um siRNA-DCAF1, em seguida os extratos celulares foram imunoprecipitados na presença de HA. Como esperado, análises por WB demonstraram que a interação Vpr-DDB1 é inibida na ausência de DCAF1 (Figura 15, coluna 4), entretanto o experimento controle com siRNA não específico (siRNA-NS) não interferiu na ligação das proteínas (Figura 15, coluna 3).



**Figura 15. Inibição da ligação de Vpr-DBD1 por inibição da expressão de DCAF.** Células Hela foram transfectadas com siRNA-NS e siRNA-DCAF1, imunoprecipitadas com anticorpos anti-HA e analisadas por WB com anticorpos específicos anti-HA e anti-DBD1. Na imagem é possível observar que a inibição da expressão de DCAF1 foi suficiente para abolir a interação entre DDB1 e Vpr (coluna 4), no controle onde a expressão foi mantida a ligação DCAF1-Vpr não foi afetada.

Aqui mostramos que esses mutantes Vpr(Q65R) e Vpr(R80A) interagem com DDB1 e DCAF1 de forma diferente. Como mostrado anteriormente (Figura 12A) que DCAF1 é um componente necessário para o funcionamento de Vpr e, também, já está solidificado na literatura que Vpr(Q65R) desestrutura o sítio de ligação com DCAF1, o domínio LR, e embora a Vpr(Q65R) não se ligue a DDB1 a sua inatividade poderia ser explicada simplesmente pela falta de interação com DCAF1. [60, 96]. Nesse ponto a interação de Vpr(R80A) com DDB1 continua sem esclarecer: porque essa mutante não tem efeito sobre o ciclo celular.? Talvez a resposta para essa questão esteja na estrutura de Vpr e como a proteína interage com o UPS. Estudos recentes apontam que o bloqueio do ciclo celular mediado por VPR é dependente do sistema UPS: tanto o uso de inibidores de proteassoma quanto a super expressão de Ub mutadas (que são incapazes de formar as longas cadeias que sinalizam para a degradação via proteassoma 26S) impedem Vpr de bloquear o ciclo celular[38]. Isso poderia sugerir também que mutações que impedem a interação de Vpr com UPS não induziriam o arrasto de G2. Como dito acima essa hipótese funcionaria perfeitamente para Vpr(Q65R) mas para Vpr(R80A) a explicação não seria plausível.

O HIV usurpa o UPS pelo menos em dois outros bem conhecidos casos: Vpu induz a degradação de CD4 e Vif degrada APOBEC. Atualmente o que falta para explicar a interação de

Vpr com UPS é justamente um alvo celular que quando degradado provoque a ativação do ponto de checagem de dano do DNA via ATR e consequentemente o bloqueio do ciclo celular. Dentro desse contexto especulamos que a inatividade de Vpr(R80A) seria causada pela desestruturação do sítio HSRIG, um domínio que recrutaria o alvo ainda desconhecido.

### **4.3 Vpr(R80A) age como um dominante negativo.**

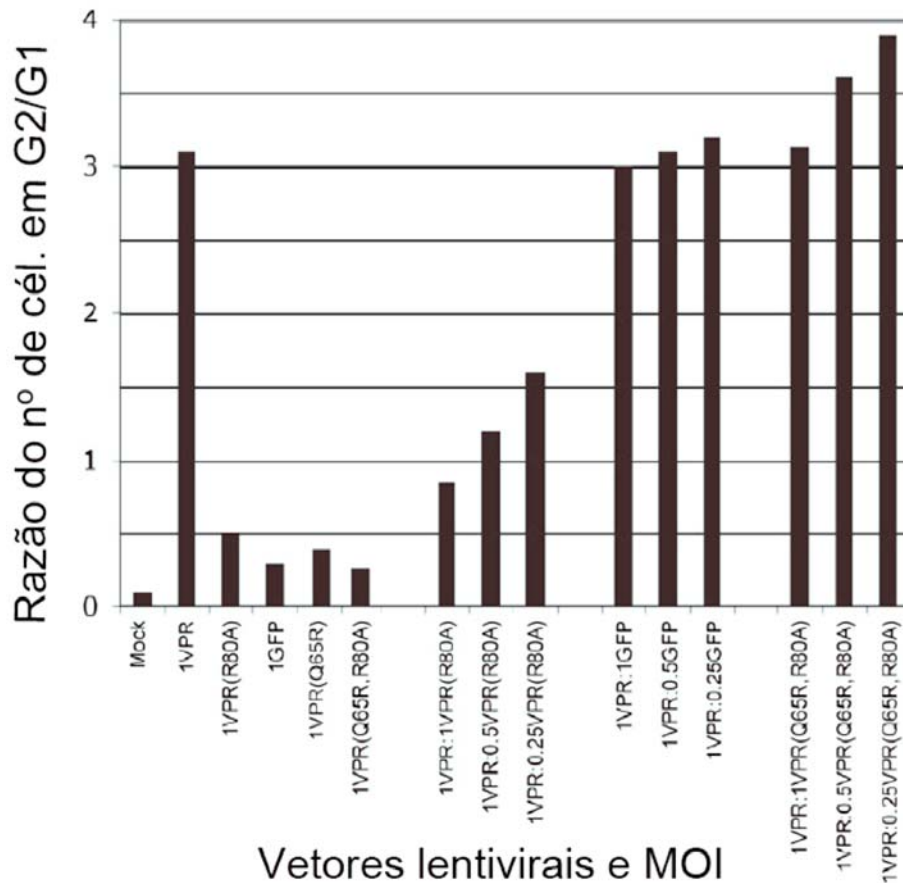
Os resultados obtidos até aqui nos sugerem que a ligação de Vpr depende de DCAF1 para causar a inibição do progresso do ciclo celular e que essa interação é essencial para a conjugação com Cul4A-DDB1. Já foi reportado que esta E3 ligase utiliza uma série de adaptadores, entre eles DCAF1, para regular as mais diversas vias metabólicas; entre elas o ciclo celular. Apesar da função biológica de DCAF1 ainda ser desconhecida acredita-se que a sua interação com Vpr recrutaria um alvo celular - também desconhecido - que dispararia o prolongamento do ciclo celular a um passo anterior a via clássica mediada por ATR[38-40, 90, 91, 93].

Nós aqui sugerimos que HSRIG poderia ser o domínio e ligação de Vpr com o alvo celular que é degradado via DCAF1-DDB1-Cul4A. Se nossa hipótese for verdadeira Vpr(R80A) atuaria como proteína dominante negativa (DN) em relação a Vpr tipo selvagem, isso porque Vpr(R80A) ocuparia o UPS impedindo alostericamente que Vpr entre no sistema. Em decorrência disso o alvo celular de Vpr permaneceria estável na célula e o ciclo celular correria normalmente.

Para testar esta possibilidade avaliamos a inibição do ciclo celular em células Hela co-transduzidas com quantidades constantes do vetor lentiviral pHR-Vpr (MOI=1.0) e quantidades decrescentes de um vetor contendo a versão mutante Vpr(R80A) ( MOIs de 1, 0,5 e 0,25). Como controle negativo foi utilizado um vetor lentiviral expressando GFP apenas.

A transdução com de unidades infecciosas contendo apenas GFP não impediram o efeito de Vpr no bloqueio do ciclo celular. Entretanto, Vpr(R80A) inibiu a atividade de Vpr de maneira dose dependente como se fosse uma proteína DN. Para avaliar se o efeito DN de Vpr(R80A) é realmente dependente do seu domínio LR intacto, repetimos os experimentos com um vetor lentiviral duplamente mutante - Vpr(Q65R-R80A) - com substituições em R80A e Q65R. A desestabilização de LR provocada por Q65R foi suficiente para abolir o efeito DN de Vpr(R80A). Reunidos esses resultados corroboram a hipótese de que HSRIG poderia ser o ponto

onde Vpr se liga ao alvo celular que dispara o prolongamento da fase G2 do ciclo celular ( Figura 16).



**Figura 16. A mutante R80A funciona como uma proteína dominante-negativa.** As células Hela foram transduzidas com vetores lentivirais expressando os clones indicados na figura. Os vírus foram titulados e a quantidade de partículas infecciosas utilizadas foram padronizadas para infectar aproximadamente 100% das células. Após 48h de infecção as células foram processadas para análise do ciclo celular, graficando-se a razão do numero de células na fase G2/G1 vs vetores lentivirais e MOI.

## ***5. Discussão***

Como na maioria dos vírus, o agente etiológico da síndrome de imunodeficiência humana, o HIV-1, consegue através da expressão de seus genes, controlar a maquinaria celular, e assim, driblar a resposta imune do hospedeiro, aperfeiçoar sua infectividade e capacidade replicativa assegurando desta forma a sobrevivência no seu hospedeiro[14, 50, 101]. A proteína Vpr é um típico exemplo, já que exerce funções cruciais no contexto da infecção viral, como, aumentar a eficiência do processo de transcrição reversa; incrementar a atividade do promotor LTR; facilitar a importação nuclear do complexo de pré-integração viral (PIC); inibir o ciclo celular no estágio G<sub>2</sub> e induzir apoptose na célula hospedeira[42]

Dentro deste contexto a inibição do ciclo celular é uma das funções mais relevantes, já que foi relacionada a outras duas importantes características da infecção, como são a transativação do promotor viral e apoptose celular[85]. Estudos recentes sugeriram que Vpr induziria o bloqueio do ciclo celular por intermédio de Cul4-A e DDB1[37, 38, 57, 80, 83, 86].

Curiosamente outros vírus utilizam se ligam diretamente a DDB1. A proteína 5 de paramixovírus V (SV5-V) domina Cul4A-DDB1 para degradar STAT1 via proteassoma, interferindo na resposta induzidas pela expressão de INF[1]. A exemplo de Vpr, proteína X do vírus da hepatite B (HBX)[102] provoca prolongamento do ciclo celular, transativação e desencadeamento de atividades proapoptóticas. Ambas SV5-V e HBX recrutam seus alvos ligando-se diretamente a DDB1. Diferentemente, nossos resultados sugerem que para provocar o prolongamento do ciclo celular Vpr não interage diretamente com DDB1, a ligação de Vpr com UPS seria realizada pelo adaptador DCAF1.

A presença de DCAF1 no complexo não explicaria, por si só, o prolongamento de G<sub>2</sub>. Primeiro porque a falta de DCAF1 leva ao prolongamento de G<sub>1</sub>(dados não publicados), sugerindo que DCAF1 é essencial para degradar um alvo que impede o prosseguimento da fase G<sub>1</sub> para S diferentemente do que acontece com Vpr que atua entre as fases G<sub>2</sub> e M. Segundo porque Vpx, uma proteína semelhante a Vpr presente em HIV-2 e SIV<sub>sm</sub>, é capaz de se ligar a Cul4A-DDB1-DCAF1 sem causar bloqueio do ciclo celular em G<sub>2</sub> [39, 40].

Baseados em nossos resultados desenvolvemos um modelo onde sugerimos que para causar a inibição do ciclo celular em G<sub>2</sub> (Figura 17), Vpr se ligaria a Cul4A-DDB1 através de DCAF1 para induzir a degradação de uma proteína essencial para o progresso da fase G<sub>2</sub> para mitose. Primeiro, porque siRNA de DCAF1 previne a co-immunoprecipitação de Vpr e DDB1, sugerindo que DCAF1 poderia estar atuando como uma ponte de ligação entre as duas proteínas.

Segundo, porque a inibição da expressão de DCAF1 previne o efeito citopático de Vpr sem causar o prolongamento da fase G2, dando indício que DCAF1 seria necessário para o fenótipo provocado por Vpr. Terceiro, Vpr(R80A) se liga a DCAF1 mas não interfere no ciclo celular sugerindo que o conjunto Cul4A-DDB1-DCAF1 é requerido mas não essencial para provocar arrasto de G2.

Vpr(Q65R) desestabiliza o LR de Vpr o que inibe a ligação com DCAF1 como já era esperado. Outras análises de mutações pontuais, fora de HFRIGC, demonstraram que substituições em H71G ou R85A são instáveis e fracamente expressas porém continuam sendo imunoprecipitadas com DDB1. A atividade DN de Vpr(R80A) fortalece a hipótese de que HFRIGC é a região por onde Vpr recruta a proteína para induzir o efeito citostático. Nossos resultados corroboram para a tese que a extremidade N-terminal de Vpr é responsável pelo efeito citopático, os estudos de outras mutações ao redor de HFRIGC poderá dizer se esse é realmente o sítio de ligação com o alvo desconhecido.

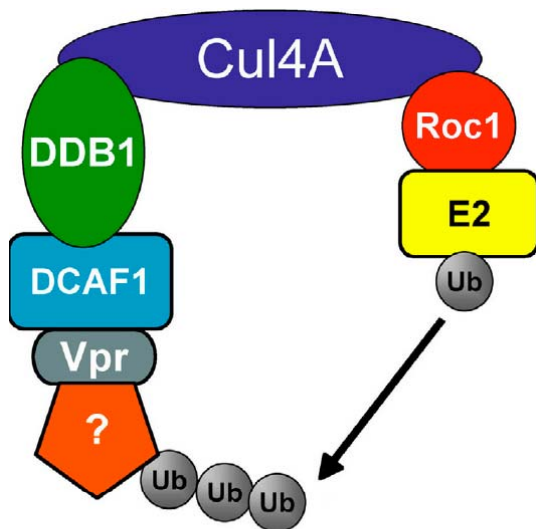
O modelo proposto difere de outros que sugerem que Vpr se ligaria a DDB1[93] ou que não levam em conta a presença de DCAF1[60]. É importante ressaltar que nossos resultados são consistentes com o apresentados por outros grupos de pesquisa[38-40, 90, 91, 93] porém ele ainda não é completamente testável pois o alvo putativo desse sistema permanece desconhecidos. Outros modelos que descrevem a cascata bioquímica que leva ao bloqueio do ciclo celular sem considerar a participação de UPS, por exemplo Huard[88] e seus colaboradores propuseram que o bloqueio do ciclo celular poderia ser causado pela fosforilação de Cdc25. Esta proteína é necessária para ativar Cdc2 e dar prosseguimento ao ciclo celular entre a fase G2 e M. O que Huard mostrou foi que Cdc25 é controlada por uma série de cinases entre elas Srk1, uma cinase que na presença de Vpr fosforila Cdc25 e induz sua realocização do núcleo para o citoplasma. O modelo de Huard não invalida o que propomos nesse trabalho, ele apenas detalha como a ativação de ATR consegue parar o ciclo celular. Nossos experimentos demonstram que a ativação de ATR pode ser prevenida com a deleção de DCAF1, sugerindo que a utilização de UPS é anterior a ativação de ATR.

Mesmo após 12 anos a sua descoberta principais perguntas a respeito de DCAF1 permanecem sem esclarecimento. Qual o papel biológico de DCAF1 fora do contexto de Vpr, qual a influência de DCAF1 no ciclo celular e quais são os alvos de DCAF1 que poderiam ser explorados por Vpr são perguntas que poderiam esclarecer como Vpr causa o prolongamento do



ciclo celular. Embora não seja comprovado que Vpr cause danos diretos ao DNA já está bastante claro que essa proteína bloqueia o ciclo celular na fase G2 através da indução do ponto de checagem de dano ao DNA, mais especificamente Vpr provoca o prolongamento da fase G2 através da ativação de ATR[57, 80, 86]. A falta de evidências que Vpr estaria causando a quebra dos cromossomos tem alimentado hipóteses de que essa proteína viral poderia estar causando apenas uma instabilidade no genoma porém suficiente para ativar os pontos de checagem. O fato que mais colabora para essa teoria é que inibindo a interação de VPR com Cul4A-DDB1-DCAF1 inibi-se também a ativação de ATR. Acredita-se, então, que a o bloqueio do ciclo celular induzido por Vpr seja causado pela degradação de uma proteína que levaria à ativação de ATR e não necessariamente um dano ao DNA[37, 38, 57, 80, 83, 86].

A descoberta do alvo putativo de Vpr ampliará os horizontes do estudo do HIV-1, será possível entender melhor como acontece o bloqueio do ciclo celular e os efeitos patológicos decorrentes disso. Acredita-se que a interrupção de do bloqueio celular induzido por Vpr *in vivo* poderia diminuir a morte celular e a produção de partículas virais, podendo ser usado como alvo terapêutico futuramente.



**Figura 17. Modelo proposto para interação de Vpr UPS.**

Nossos resultados suportam a idéia de que Vpr induz o bloqueio da fase G2 do ciclo celular mediante a degradação um alvo celular via DCAF1-DDB1-Cul4A E3 ubiquitina ligase.

## *5. Apêndice*

## 5.1 Abreviações:

Siglas	Definição
APOBEC	Deaminase que funciona como proteção contra lentivírus elevando à mutação da transcriptase reversa
ATM	Ataxia Telangectasia Mutada: cinase que funciona como ponto de checagem de danos ao DNA
ATR	Proteína semelhante a ATM e Rad-3 que funciona como ponto de checagem de danos à estrutura do DNA
B19,	parvovírus
BDV	Vírus da Doença de Borna
CA	Capisídeo do vírus
CCR5,	Receptor de quimiocina
Cdc25C	Fosfatase reguladora do ciclo celular
Cdk9	Cinase dependente de ciclina 9
Chk1	Proteína do Ponto de Checagem 1
Chk2	Proteína do Ponto de Checagem 2
Cul	Ligase de Ubiquitina 3 pertencente à família CRUL
CXCR4	receptor de quimiocina
Cyc	Ciclina
DDB1	Proteína Ligante ao Dano de DNA que funciona como adaptador para Cul4-A
Env	Gene que codifica as proteínas do envelope do HIV: gp120 e gp41
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
Gag	Gene do HIV que codifica todas as

	proteínas que compõem o capsídeo viral.
gp120	proteína do envelope que se liga ao CD4
gp41	proteína do envelope que se liga aos receptores de quimiocina
HAX-1,	fator apoptótico
hCC1.	proteína componente do poro nuclear que interage com Vpr
HECT	Tipo de Ligase de Ubiquitina 3
HPV	vírus papiloma
HSRIG	Sequência de aminoácidos encontrada em lentivírus de primatas correlacionada ao prolongamento do ciclo celular
IN	integrase
IRES	Sítio de reconhecimento de Ribossomos
LR	Região rica em leucina
LT CD4+	Linfócitos T CD4+
LTR	Sequências Terminais Longas Repetidas (Long Terminal Sequences): promotor dos genes do HIV
MAPK	Cinase Promotora de Mitose
MHC	Principal Complexo de Histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex): família de receptores celulares que modulam entre outros a resposta imune.
MMV	mice minute virus
Nef,	Fator Negativo: gene do HIV que codifica a proteína NEF que é responsável pela modulação de CD4
PIC	Complexo de Pré Integração

REF-1	Fator encontrado em células de certas espécies de símios que impede a replicação do HIV
Rev	Proteína Regulatória Viral: regula a expressão dos genes do HIV
RT	Transcriptase reversa: proteína codificada pelo gene Pol do HIV que é responsável pela transcriptase reversa
SIV	Vírus da Imunodeficiência Simiana
SIV <sub>mac239</sub>	Linhagem de SIV que infecta o gênero Rhesus
SIV <sub>sm</sub>	linhagem sooty mangabey do SIV
SMUG2	tipo de uracil DNA glicosilase
STAT	Família de proteínas conhecidas como: Sinais de Transdução e Ativadores da Transcrição
Tat	Transativador: gene do HIV que codifica a proteína TAT que é responsável por transativar o LTR do HIV.
Ub	ubiquitina
UNG2	tipo de uracil DNA glicosilase
<b>UPS</b>	Sistema Ubiquitina Proteassoma
V520	Linhagem de vacina baseada num vírus da gripe testada contra o HIV sem sucesso
Vif	Fator de Infectividade Viral: gene do HIV que codifica a proteína VIF responsável pela degradação de APOBEC
Vpr	Proteína Viral Regulatória: gene do HIV que codifica a proteína VPR que é responsável pelo bloqueio do ciclo celular,

	apoptose e modulação do LTR viral entre outras.
Vpu	Proteína Viral U: gene do HIV que codifica a proteína VPU que é responsável pela degradação de CD4
Wee1	Cinase reguladora do ciclo celular degradada na presença de Vpr

















## ***7. Bibliografia***

1. Precious, B., et al., *Simian virus 5 V protein acts as an adaptor, linking DDB1 to STAT2, to facilitate the ubiquitination of STAT1*. J Virol, 2005. **79**(21): p. 13434-41.
2. Janeway, C.A., et al., *Immunobiology* 2001. **5**: p. Acessado através do site da NCBI dia 5/02/2008 no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=AIDS&rid=imm.section.1518#1520>.
3. Wigg, M.D., M.T.V. Romanos, and N.S.O. Santos, *Introdução à Virologia Humana*. 2002, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 183-197.
4. Kaul, M., G.A. Garden, and S.A. Lipton, *Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia*. Nature, 2001. **410**(6831): p. 988-94.
5. Cossarizza, A., *Apoptosis and HIV infection: about molecules and genes*. Curr Pharm Des, 2008. **14**(3): p. 237-44.
6. Steinbrook, R., *One step forward, two steps back--will there ever be an AIDS vaccine?* N Engl J Med, 2007. **357**(26): p. 2653-5.
7. Saúde, M., [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br). 2005.
8. UNAIDS, *AIDS epidemic update*. <http://www.unaids.org/>, 2007: p. 1-60.
9. Ledford, H., *HIV vaccine may raise risk*. Nature, 2007. **450**(7168): p. 325.
10. Cotelle, P., *Patented HIV-1 integrase inhibitors (1998-2005)*. Recent Patents Anti-Infect Drug Disc, 2006. **1**(1): p. 1-15.
11. Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H.E. Varmus, *Retroviruses*. 1997: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
12. Heeney, J.L., A.G. Dalgleish, and R.A. Weiss, *Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS*. Science, 2006. **313**(5786): p. 462-6.
13. Turner, B.G. and M.F. Summers, *Structural biology of HIV*. Journal of Molecular Biology, 1999. **285**: p. 1-32.
14. Freed, E.O., *HIV-1 replication*. Somat Cell Mol Genet, 2001. **26**(1-6): p. 13-33.
15. Greene, W.C. and B.M. Peterlin, *Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy*. Nat Med, 2002. **8**(7): p. 673-80.

16. Pereira, L.A., et al., *A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(3): p. 663-8.
17. Adachi, A., et al., *[Functional roles of HIV-1 accessory genes for its pathogenicity]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2007. **52**(10 Suppl): p. 1261-7.
18. Greene, W.C. and B.M. Peterlin, *Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy*. Nature Medicine, 2002. **8**(7): p. 673-80.
19. 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.
20. 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.
21. 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*. Journal of Virology, 2001. **75**(6): p. 2993-3000.
22. Ohagen, A. and D. Gabuzda, *Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core*. Journal of virology, 2000. **74**(23): p. 11055-66.
23. Miller, M.D., C.M. Farnet, and F.D. Bushman, *Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition*. Journal of Virology, 1997. **71**(7): p. 5382-90.
24. Pulkkinen, K., et al., *Nef associates with p21-activated kinase 2 in a p21-GTPase-dependent dynamic activation complex within lipid rafts*. Journal of Virology, 2004. **78**(23): p. 12773-80.
25. Sherman, M.P., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr*. Journal of Virology, 2001. **75**(3): p. 1522-32.
26. Gallay, P., et al., *HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase*. Cell, 1997. **83**(4): p. 569-76.
27. Nekhai, S. and K.T. Jeang, *Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev*. Future Microbiol, 2006. **1**: p. 417-26.



28. Sawaya, B.E., et al., *Cooperative interaction between HIV-1 regulatory proteins Tat and Vpr modulates transcription of the viral genome*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35209-14.
29. Wei, P., et al., *A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA*. Cell, 1998. **92**(4): p. 451-62.
30. Price, D.H., *P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II*. Molecular and cellular biology, 2000. **20**(8): p. 2629-34.
31. Stevenson, M., *HIV-1 pathogenesis*. Nature Medicine, 2003. **9**(7): p. 853-60.
32. Aldrovandi, G.M. and J.A. Zack, *Replication and pathogenicity of human immunodeficiency virus type 1 accessory gene mutants in SCID-hu mice*. J Virol, 1996. **70**(3): p. 1505-11.
33. Zhao, L. and H. Zhu, *Structure and function of HIV-1 auxiliary regulatory protein Vpr: novel clues to drug design*. Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders, 2004. **4**: p. 29-36.
34. Le Rouzic, E. and S. Benichou, *The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle*. Retrovirology, 2005. **2**(11).
35. Le Rouzic, E., et al., *Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1*. The Journal of biological chemistry., 2002. **277**(47): p. 45091-8.
36. Planelles, V., et al., *Vpr-induced cell cycle arrest is conserved among primate lentiviruses*. J Virol, 1996. **70**(4): p. 2516-24.
37. Dehart, J.L. and V. Planelles, *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr links proteasomal degradation and checkpoint activation*. J Virol, 2008. **82**(3): p. 1066-72.
38. DeHart, J.L., et al., *HIV-1 Vpr activates the G2 checkpoint through manipulation of the ubiquitin proteasome system*. Virol J, 2007. **4**: p. 57.
39. Le Rouzic, E., et al., *HIV1 Vpr arrests the cell cycle by recruiting DCAF1/VprBP, a receptor of the Cul4-DDB1 ubiquitin ligase*. Cell Cycle, 2007. **6**(2): p. 182-8.

40. Wen, X., et al., *The HIV1 protein Vpr acts to promote G2 cell cycle arrest by engaging a DDB1 and Cullin4A-containing ubiquitin ligase complex using VprBP/DCAF1 as an adaptor*. J Biol Chem, 2007. **282**(37): p. 27046-57.
41. Morellet, N., et al., *NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR*. J Mol Biol, 2003. **327**(1): p. 215-27.
42. Andersen, J.L. and V. Planelles, *The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis*. Curr HIV Res, 2005. **3**(1): p. 43-51.
43. Goh, W.C., et al., *HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo*. Nat Med, 1998. **4**(1): p. 65-71.
44. Reitz, M.S., Jr., et al., *Viral variability and serum antibody response in a laboratory worker infected with HIV type 1 (HTLV type IIIB)*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1994. **10**(9): p. 1143-55.
45. Levy, J., *Infection by human immunodeficiency virus--CD4 is not enough*. The New England journal of medicine, 1996. **335**(20): p. 1528-30.
46. Gallo, R., *Human retroviruses after 20 years: a perspective from the past and prospects for their future control*. Immunological reviews., 2002. **185**: p. 236-65.
47. Ho, D., et al., *Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection*. Nature, 1995. **373**(6510): p. 123-6
- .
48. Perelson, A., et al., *HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time*. Science, 1996. **271**(5255): p. 1582-6.
49. Appay, V., et al., *Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections*. Nature medicine, 2002. **8**(4): p. 379-85
- .
50. Sakai, K., J. Dimas, and M. Lenardo, *The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell cycle arrest*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **130**(9): p. 3369-3374.

51. Borrow, P., et al., *Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection*. Journal of virology, 1994. **68**(9): p. 6103-10.
52. Groux, H., et al., *Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals*. Journal of experimental medical sciences., 1992. **175**(2): p. 331-40.
53. Meyaard, L., H. Schuitemaker, and F. Miedema, *T-cell dysfunction in HIV infection: anergy due to defective antigen-presenting cell function?* Immunology today, 1993. **14**(4): p. 161-4.
54. Connor, R., et al., *Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes*. Virology, 1995. **206**(2): p. 935-944.
55. Lum, J., et al., *Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis*. The Journal of clinical investigation., 2003. **111**(10): p. 1547-54.
56. Somasundaran, M., et al., *Evidence for a cytopathogenicity determinant in HIV-1 Vpr*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(14): p. 9503-9508.
57. Roshal, M., et al., *Activation of the ATR-mediated DNA damage response by the HIV-1 viral protein R*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25879-86.
58. Schrofelbauer, B., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases*. J Virol, 2005. **79**(17): p. 10978-87.
59. Chen, R., et al., *Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages*. The Journal of biological chemistry., 2004. **279**(27): p. 28419-25
60. Schrofelbauer, B., Y. Hakata, and N.R. Landau, *HIV-1 Vpr function is mediated by interaction with the damage-specific DNA-binding protein DDB1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 4130-5.

61. Iordanskiy, S., et al., *Intracytoplasmic maturation of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription complexes determines their capacity to integrate into chromatin*. *Retrovirology*, 2006. **3**: p. 4.
62. Harrington, P., et al., *Compartmentalized human immunodeficiency virus type 1 present in cerebrospinal fluid is produced by short-lived cells*. *Journal of virology*, 2005. **79**(13): p. 7959-66
63. Mansky, L., *The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene*. *Virology*, 1996. **222**(2): p. 391-400.
64. Cohen, E., et al., *Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein*. *Journal of virology*, 1990. **64**(6): p. 3097-9.
65. Sawaya, B., et al., *Cooperative interaction between HIV-1 regulatory proteins Tat and Vpr modulates transcription of the viral genome*. *The Journal of biological chemistry*, 2000. **275**(45): p. 35209-14.
66. Balliet, J., et al., *Distinct effects in primary macrophages and lymphocytes of the human immunodeficiency virus type 1 accessory genes vpr, vpu, and nef: mutational analysis of a primary HIV-1 isolate*. *Virology*, 1994. **200**(2): p. 623-31.
67. Jacquot, G., et al., *Localization of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope: impact on Vpr functions and virus replication in macrophages*. *Retrovirology*, 2007. **4**: p. 84.
68. Venkat, S., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with antiapoptotic mitochondrial protein HAX-1*. *Journal of virology*, 2005. **79**(21): p. 13735-46.
69. Muthumani, K., et al., *The HIV-1 Vpr and glucocorticoid receptor complex is a gain-of-function interaction that prevents the nuclear localization of PARP-1*. *Nature cell biology*, 2006. **8**(2): p. 170-9.
70. Sabbah, E., et al., *Interaction between the HIV-1 Protein Vpr and the Adenine Nucleotide Translocator*. *Chemical biology & drug design*, 2006. **67**: p. 145-154.
71. Jian, H. and L. Zhao, *Pro-apoptotic activity of HIV-1 auxiliary regulatory protein Vpr is subtype-dependent and potently enhanced by nonconservative changes of*

- the leucine residue at position 64.* The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(45): p. 44326-30.
72. Moon, H. and J. Yang, *Role of HIV Vpr as a Regulator of Apoptosis and an Effector on Bystander Cells.* Molecules and cells, 2006. **21**(1): p. 7-20.
  73. Muthumani, K., et al., *HIV-1 Vpr induces apoptosis through caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37820-31.
  74. He, J., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity.* Journal of virology, 1995. **69**(11): p. 6705-11.
  75. Zimmerman, E.S., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces DNA replication stress in vitro and in vivo.* J Virol, 2006. **80**(21): p. 10407-18.
  76. Davy, C. and J. Doorbar, *G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses.* Virology, 2007. **368**(2): p. 219-26.
  77. Brasey, A., et al., *The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle.* Journal of virology, 2003. **77**(7): p. 3939-49.
  78. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of The Cell.* 2002, Garland Science: New York and London.
  79. Choudhuri, T., et al., *The ATM/ATR signaling effector Chk2 is targeted by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C to release the G2/M cell cycle block.* J Virol, 2007. **81**(12): p. 6718-30.
  80. Casper, A.M., et al., *ATR regulates fragile site stability.* Cell, 2002. **111**(6): p. 779-89.
  81. Lavin, M.F. and S. Kozlov, *ATM activation and DNA damage response.* Cell Cycle, 2007. **6**(8): p. 931-42.
  82. Yang, J., et al., *ATM and ATR: sensing DNA damage.* World J Gastroenterol, 2004. **10**(2): p. 155-60.
  83. McGowan, C.H. and P. Russell, *The DNA damage response: sensing and signaling.* Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(6): p. 629-33.

84. Goh, W.C., N. Manel, and M. Emerman, *The human immunodeficiency virus Vpr protein binds Cdc25C: implications for G2 arrest*. *Virology*, 2004. **318**(1): p. 337-49.
85. Andersen, J.L., et al., *HIV-1 Vpr-induced apoptosis is cell cycle dependent and requires Bax but not ANT*. *PLoS Pathog*, 2006. **2**(12): p. e127.
86. Lai, M., et al., *Activation of the ATR pathway by human immunodeficiency virus type 1 Vpr involves its direct binding to chromatin in vivo*. *Journal of virology*, 2005. **79**(24): p. 15443-51.
87. Zimmerman, E.S., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G2 arrest requires Rad17 and Hus1 and induces nuclear BRCA1 and gamma-H2AX focus formation*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(21): p. 9286-94.
88. Huard, S., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces cell cycle G2 arrest through Srk1/MK2-mediated phosphorylation of Cdc25*. *J Virol*, 2008. **82**(6): p. 2904-17.
89. Angers, S., et al., *Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery*. *Nature*, 2006. **443**(7111): p. 590-3.
90. Belzile, J.P., et al., *HIV-1 Vpr-Mediated G2 Arrest Involves the DDB1-CUL4A(VPRBP) E3 Ubiquitin Ligase*. *PLoS Pathog*, 2007. **3**(7): p. e85.
91. 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.
92. Lindwasser, O.W., R. Chaudhuri, and J.S. Bonifacino, *Mechanisms of CD4 downregulation by the Nef and Vpu proteins of primate immunodeficiency viruses*. *Curr Mol Med*, 2007. **7**(2): p. 171-84.
93. Tan, L., E. Ehrlich, and X.F. Yu, *DDB1 and Cul4A are required for human immunodeficiency virus type 1 Vpr-induced G2 arrest*. *J Virol*, 2007. **81**(19): p. 10822-30.
94. Holmes, R.K., M.H. Malim, and K.N. Bishop, *APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing?* *Trends Biochem Sci*, 2007. **32**(3): p. 118-28.
95. Malim, M.H., *Natural resistance to HIV infection: The Vif-APOBEC interaction*. *C R Biol*, 2006. **329**(11): p. 871-5.

96. Zhao, L.J., S. Mukherjee, and O. Narayan, *Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function. Specific interaction with a cellular protein.* J Biol Chem, 1994. **269**(22): p. 15577-82.
97. Akkina, R.K., et al., *High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G.* J Virol, 1996. **70**(4): p. 2581-5.
98. An, D.S., et al., *An inducible human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vector which effectively suppresses HIV-1 replication.* J Virol, 1999. **73**(9): p. 7671-7.
99. Barker, E. and V. Planelles, *Vectors derived from the human immunodeficiency virus, HIV-1.* Front Biosci, 2003. **8**: p. d491-510.
100. Yang, J., et al., *ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses.* Carcinogenesis, 2003. **24**(10): p. 1571-80.
101. Rucker, E., et al., *Vpr and Vpu are important for efficient human immunodeficiency virus type 1 replication and CD4+ T-cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo.* Journal of virology, 2004. **78**(22): p. 12689-93.
102. Chen, H.Y., et al., *Hepatitis B virus X protein induces apoptosis and cell cycle deregulation through interfering with DNA repair and checkpoint responses.* Hepatol Res, 2008. **38**(2): p. 174-82.