

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Inibição de cinases e/ou fosfatases celulares por
bibliotecas de siRNA: aplicação na infecção do HIV-1**

Leonor Marques Resende

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2008

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Inibição de cinases e/ou fosfatases celulares por
bibliotecas de siRNA: aplicação na infecção do HIV-1**

Dissertação orientada pelo Professor Doutor João Gonçalves
(Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa) e pela Professora
Doutora Filomena Caeiro (Faculdade de Ciências da Universidade de
Lisboa)

Leonor Marques Resende

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2008

ÍNDICE GERAL

Índice Geral	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	iv
Abreviaturas	v
Agradecimentos	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1. Introdução	1
1.1. A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida	1
1.2. A estrutura do HIV-1	1
1.3. O genoma do HIV-1	2
1.4. O ciclo de vida do HIV-1	2
1.4.1. A fase inicial do ciclo de vida	3
1.4.2. A fase tardia do ciclo de vida	4
1.5. A interação do HIV-1 com a célula hospedeira	5
1.6. A interferência de RNA	7
1.7. As bibliotecas de shRNA	8
1.8. A identificação de cinases e fosfatases importantes na replicação do HIV-1	8
1.9. O complexo DNA-PK	9
1.9.1. A junção terminal não homóloga	10
1.9.2. A importância da DNA-PK para os retrovírus	12
1.10. Objectivo deste trabalho	13
2. Resultados	14
2.1. A DNA-PKcs é silenciada pela expressão estável de shRNAs	14
2.2. A DNA-PKcs é importante para o ciclo de replicação do HIV-1	15
2.3. A DNA-PKcs não é importante ao nível da encapsidação	16
2.4. A replicação do HIV-1 leva à formação de focos de lesão no DNA	16
3. Discussão e Conclusões	18
4. Perspectivas Futuras	21
5. Materiais e Métodos	22
5.1. Bactérias e plasmídeos	22
5.2. Linhas celulares	22
5.3. Produção de DNA plasmídico	23

5.4.	Produção de partículas lentivirais para transdução de shRNAs	23
5.5.	Transdução de vectores lentivirais que codificam para shRNAs	23
5.6.	Avaliação dos níveis intracelulares de DNA-PKcs	24
5.6.1.	Extractos proteicos para <i>Western Blot</i>	24
5.6.2.	Detecção de DNA-PKcs por <i>Western Blot</i>	24
5.7.	Produção de partículas virais de HIV-1 NL4-3	25
5.8.	Ensaio de produção viral	25
5.9.	Ensaio de viabilidade celular	26
5.10.	Avaliação dos níveis intracelulares de p24 por <i>Western Blot</i>	26
5.11.	Fixação de células e marcação imunofluorescente de focos de DSBs	27
6.	Bibliografia	28
7.	Anexos	31
7.1.	Linhas celulares	31
7.2.	Anticorpos	31
7.3.	Plasmídeos	32
7.4.	Esquema do processo de retrotranscrição do HIV-1	34
7.5.	Locais de emparelhamento dos shRNAs contra DNA-PKcs	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do HIV-1	2
Figura 2. Genoma do HIV-1	2
Figura 3. Replicação do HIV-1	3
Figura 4. Interferência de RNA por shRNAs	8
Figura 5. Esquematização do processo de NHEJ	10
Figura 6. Silenciamento de DNA-PKcs por expressão estável de shRNAs em células Jurkat	14
Figura 7. Efeito do silenciamento de DNA-PKcs na produção viral	15
Figura 8. Avaliação da produção intracelular de p24	16
Figura 9. Focos de acumulação de γ -H2AX	17
Figura 10. Mapa e características do plasmídio pLKO.1	32
Figura 11. Mapa e características do plasmídio pCMV Δ R8.9	33
Figura 12. Mapa e características do plasmídio pHCMV-VSV-G	33
Figura 13. Mapa e características do plasmídio pNL4-3	33
Figura 14. Processo de transcrição reversa do genoma retroviral	34
Figura 15. Locais de emparelhamento dos shRNAs contra DNA-PKcs	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Linhas celulares utilizadas neste trabalho	31
Tabela 2. Anticorpos utilizados neste trabalho e as suas condições de utilização	31

ABREVIATURAS

Reagentes e Unidades

µg	Micrograma
µL	Microlitro
CY3	<u>Cyanine 3</u>
DAPI	<u>4',6-diamidino-2-phenylindole</u>
DMEM	<u>Dulbecco's Modified Eagle Medium</u>
EDTA	<u>Ácido etilenodiamino tetra-acético</u>
h	Horas
HBS	<u>HEPES Buffered Saline</u>
HEPES	<u>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</u>
HPEM	Tampão com HEPES, PIPES, EDTA e Magnésio
HRP	<u>Horseradish peroxidase</u>
kDa	KiloDalton
m.o.i.	<u>Multiplicity of Infection</u> , multiplicidade de infecção
mA	MiliAmpere
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
°C	Grau Celsius
PBS	<u>Phosphate Buffered Saline</u>
Pen/Strep	<u>Penicilina-Estreptomicina-Fungizona</u>
PIPES	<u>Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)</u>
PMSF	<u>Phenylmethanesulphonylfluoride</u>
RPMI	<u>Roswell Park Memorial Institute medium</u>
SFB	<u>Soro Fetal Bovino</u>
T.A.	<u>Temperatura Ambiente</u>
TBS-T	<u>Tris-Buffered Saline</u> , com 0,1% (v/v) <u>Tween-20</u>
TE	<u>Tris-EDTA</u>
V	Volt
x g	Unidade de força centrífuga relativa

Geral

AAV	<u>Avian Sarcoma Virus</u>
ATM	<u>Ataxia Telangectasia Mutated protein</u>

ATR	<i><u>A</u>taxia <u>T</u>elangectasia-<u>R</u>elated protein</i>
BAF	<i><u>B</u>arrier-to-<u>A</u>utointegration <u>F</u>actor</i>
BLAST	<i><u>B</u>asic <u>L</u>ocal <u>A</u>lignment <u>S</u>earch <u>T</u>ool</i>
CA	<i><u>C</u>ápside</i>
CCR5	<i><u>C</u>hemokine (<u>C</u>-<u>C</u> motif) <u>R</u>eceptor <u>5</u></i>
CD24	<i><u>C</u>luster of <u>D</u>ifferentiation <u>24</u></i>
CD4	<i><u>C</u>luster of <u>D</u>ifferentiation <u>4</u></i>
Cdc2	<i><u>C</u>yclin <u>D</u>ependent <u>K</u>inase <u>2</u></i>
Cdk9	<i><u>C</u>yclin <u>D</u>ependent <u>K</u>inase <u>9</u></i>
Chk1	<i><u>C</u>heckpoint <u>K</u>inase <u>1</u></i>
Chk2	<i><u>C</u>heckpoint <u>K</u>inase <u>2</u></i>
CIB1	<i><u>C</u>alcium and <u>I</u>ntegrin <u>B</u>inding family member <u>1</u></i>
CIB2	<i><u>C</u>alcium and <u>I</u>ntegrin <u>B</u>inding family member <u>2</u></i>
CRM1	<i><u>C</u>hromosome <u>M</u>aintenance Region <u>1</u></i>
CXCR4	<i><u>C</u>hemokine (<u>C</u>-<u>X</u>-<u>C</u> motif) <u>R</u>eceptor <u>4</u></i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonucleico, <u>D</u>esoxyribo<u>n</u>ucleic <u>A</u>cid</i>
DNA-PK	<i><u>D</u>NA-dependent <u>P</u>rotein <u>K</u>inase</i>
DNA-PKcs	<i><u>D</u>NA-dependent <u>P</u>rotein <u>K</u>inase <u>C</u>atalytic <u>S</u>ubunit</i>
DSB	<i><u>D</u>ouble <u>S</u>trand <u>B</u>reak</i>
dsRNA	<i><u>D</u>ouble <u>S</u>tranded <u>R</u>NA</i>
ELISA	<i><u>E</u>nzyme-<u>L</u>inked <u>I</u>mmunosorbent <u>A</u>ssay</i>
Env	<i>Poliproteína do invólucro, <u>E</u>nvelope</i>
Gag	<i><u>G</u>roup-specific <u>A</u>ntigen polyprotein</i>
GAPDH	<i><u>G</u>lyceraldehyde 3-<u>P</u>hosphate <u>D</u>ehydrogenase</i>
GFP	<i><u>G</u>reen <u>F</u>luorescent <u>P</u>rotein</i>
H2AX	<i><u>H</u>istona <u>2</u>AX</i>
HAART	<i><u>H</u>ighly <u>A</u>ctive <u>A</u>nti-<u>R</u>etroviral <u>T</u>herapy</i>
HIV-1	<i><u>H</u>uman <u>I</u>mmunodeficiency <u>V</u>irus type <u>1</u></i>
HIV-2	<i><u>H</u>uman <u>I</u>mmunodeficiency <u>V</u>irus type <u>2</u></i>
hRIP	<i><u>H</u>uman <u>R</u>ev <u>I</u>nteracting <u>P</u>rotein</i>
HSA	<i><u>H</u>eat <u>S</u>table <u>A</u>ntigen</i>
IN	<i><u>I</u>ntegrase</i>
Ini1	<i><u>I</u>ntegrase <u>I</u>nteractor <u>1</u></i>
Lck	<i><u>L</u>eukocyte-specific protein tyrosine <u>k</u>inase</i>
LEDGF	<i><u>L</u>ens <u>E</u>pithelium-<u>D</u>erived <u>G</u>rowth <u>F</u>actor</i>
LTR	<i><u>L</u>ong <u>T</u>erminal <u>R</u>epet</i>

MA	<u>M</u> atriz
MAPKs	<u>M</u> itogen <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inases
miRNAs	<u>M</u> icro <u>R</u> NAs
mRNA	<u>R</u> NA <u>m</u> essageiro
NC	<u>N</u> ucleocápside
Nef	<u>N</u> egative <u>F</u> actor
NHEJ	<u>N</u> on- <u>H</u> omologous <u>E</u> nd <u>J</u> oining, junção terminal não homóloga
OMS	<u>O</u> rganização <u>M</u> undial de <u>S</u> aúde
ORF	<u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame
PBS	<u>P</u> rimer <u>B</u> inding <u>S</u> ite
PCR	<u>P</u> olimerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction, Reacção de polimerização em cadeia
PI3K	<u>P</u> hosphatidylinositol-3- <u>k</u> inase
PIC	<u>P</u> re- <u>I</u> ntegration <u>C</u> omplex
PIKK	<u>P</u> hosphatidylinositol-3- <u>k</u> inase-like <u>k</u> inase
Pol	<u>P</u> olimerase
PP1	<u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatase <u>1</u>
PP2A	<u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatase <u>2A</u>
PPT	<u>P</u> olypurine <u>T</u> ract
PR	<u>P</u> rotease
P-TEFb	<u>P</u> ositive <u>T</u> ranscription <u>E</u> longation <u>F</u> actor <u>b</u>
RAG1	<u>R</u> ecombination- <u>A</u> ctivating <u>G</u> ene <u>1</u>
RAG2	<u>R</u> ecombination- <u>A</u> ctivating <u>G</u> ene <u>2</u>
RE	<u>R</u> etículo <u>E</u> ndoplasmático
Rev	<u>R</u> egulator of <u>V</u> irion
RISC	<u>R</u> NA- <u>I</u> nduced <u>S</u> ilencing <u>C</u> omplex
RNA	Ácido ribonucleico, <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
RNAi	<u>I</u> nterferência de <u>R</u> NA
RNase H	<u>R</u> ibonuclease <u>H</u>
RRE	<u>R</u> ev <u>R</u> esponse <u>E</u> lement
RT	<u>R</u> everse <u>T</u> ranscriptase, Transcriptase Reversa
scid	<u>S</u> evere <u>C</u> ombined <u>I</u> mmunodeficiency
shRNAs	<u>S</u> hort <u>h</u> airpin <u>R</u> NAs
SIDA	<u>S</u> índrome da <u>I</u> munodeficiência <u>A</u> dquirida
siRNAs	<u>S</u> hort <u>i</u> nterfering <u>R</u> NAs
SNF	<u>S</u> ucrose <u>N</u> on <u>F</u> ermentable
SNF5	<u>S</u> ucrose <u>N</u> on <u>F</u> ermentable protein <u>5</u>

SU	Glicoproteína de <u>S</u> uperfície
SWI	<u>S</u> witch
TAR	<u>T</u> rans <u>a</u> ctivation <u>R</u> esponse
Tat	<u>T</u> rans- <u>a</u> ctivator of <u>T</u> ranscription
TM	Proteína <u>T</u> rans <u>m</u> embranar
tRNA	<u>R</u> NA <u>t</u> ransferência
Vif	<u>V</u> iral <u>I</u> nfectivity <u>F</u> actor
Vpr	<u>V</u> iral <u>P</u> rotein <u>R</u>
Vpu	<u>V</u> iral <u>P</u> rotein <u>U</u>
VSV-G	Glicoproteína do Vírus da Estomatite Vesicular (<u>V</u> esicular <u>S</u> tomatitis <u>V</u> irus)
XLF	<u>X</u> RCC4- <u>L</u> ike <u>F</u> actor
XRCC4	<u>X</u> - <u>R</u> ay <u>C</u> ross <u>C</u> omplementation group <u>4</u> protein

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor João Gonçalves por ter aceite ser meu orientador e ter permitido que eu realizasse este trabalho no seu laboratório. Agradeço também à Professora Doutora Filomena Caeiro por ter aceite ser minha orientadora interna e ao Professor Doutor Moniz Pereira por permitir que eu realizasse este trabalho na URIA-CPM da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Gostaria de agradecer a todos os meu colegas de laboratório pela simpatia e pelo conhecimento que me transmitiram. Em especial, agradeço muito à Sylvie por tudo o que me ensinou e por todo o apoio que me deu durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, obrigada pelo apoio e amizade.

À minha família, muito obrigada pelo apoio incondicional e carinho que me deram.

Sem todas estas pessoas, não teria chegado onde cheguei hoje. Muito obrigada!

RESUMO

O mecanismo de reparação do DNA após a integração do HIV-1 ainda não foi esclarecido. A cinase dependente de DNA (DNA-PK) já foi descrita como podendo desempenhar um papel importante na integração, contudo existem estudos que contestam tal afirmação. Este trabalho tem como objectivo esclarecer o papel da DNA-PK na replicação do HIV-1. Neste sentido, criaram-se clones onde a subunidade catalítica da DNA-PK (DNA-PKcs) é silenciada pela expressão estável de shRNAs. O nível de silenciamento da DNA-PKcs foi avaliado por *Western Blot*, verificando-se uma diminuição acentuada dos níveis de expressão de DNA-PKcs para todos os clones. Através destes clones pretendeu avaliar-se a importância da DNA-PKcs para a replicação do HIV-1. Para tal, infectaram-se os clones com HIV-1 e determinou-se a sua resistência à infecção ao fim de sete dias. Todos os clones demonstraram uma inibição quase total de produção de partículas virais e da proteína da cápside (p24), demonstrando que a DNA-PKcs é importante para o ciclo de replicação do HIV-1. Uma vez que a DNA-PKcs tem um papel importante na reparação de danos de DNA de cadeia dupla (DSBs), foi avaliado se a infecção com HIV-1 leva à formação de DSBs e se a DNA-PKcs está envolvida na sua reparação. Demonstrou-se que a infecção de HIV-1 leva à formação de DSBs. Obtiveram-se alguns dados preliminares onde a formação das DSBs devido à infecção com HIV-1 não é tão evidente nos clones que expressam shRNAs contra DNA-PKcs, sugerindo que o papel da DNA-PKcs poderá não ser importante ao nível da reparação das DSBs provocadas pela infecção do HIV-1. O esclarecimento do papel que a DNA-PKcs desempenha na replicação do HIV-1 levará a um maior conhecimento acerca da dinâmica entre o vírus e o hospedeiro, o que poderá levar à descoberta de novos alvos terapêuticos eficazes.

Palavras-chave: Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1); cinases e fosfatases importantes para a replicação do HIV-1; cinase de proteínas dependente de DNA (DNA-PK); junção terminal não-homóloga (NHEJ); *short hairpin* RNAs (shRNAs)

ABSTRACT

The mechanism of DNA repair after HIV-1 integration is yet to be fully understood. The DNA dependent protein kinase (DNA-PK) has been described as possibly having an important role in integration, however there are studies that contradict this statement. The goal of this work is to clarify the role of DNA-PK in HIV-1 replication. For this purpose, clones where the catalytic subunit of the DNA-PK (DNA-PKcs) is silenced by the stable expression of shRNAs were created. The knock down level of DNA-PKcs was evaluated by Western Blot, showing a considerable decrease of DNA-PKcs expression levels in every clone. These clones allow for the study of the importance of DNA-PKcs in HIV-1 replication. To this end, the clones were infected with HIV-1 and their resistance to infection was evaluated after seven days. All clones showed an almost complete inhibition of viral particle and capsid protein (p24) production, showing that DNA-PKcs is important for HIV-1 replication. Since DNA-PKcs has an important role in the repair of DNA double strand breaks (DSBs), it was evaluated if infection with HIV-1 leads to the formation of DSBs and if DNA-PKcs is involved in their repair. It was demonstrated that infection with HIV-1 leads to the formation of DSBs. Some preliminary results show that the formation of DSBs due to HIV-1 infection is not evident in the clones that have stable expression of shRNAs against DNA-PKcs, suggesting that the role of DNA-PKcs in HIV-1 replication might not be important in the repair of DSBs formed during infection. Understanding the role of DNA-PKcs in HIV-1 replication could widen our knowledge on the dynamics between the virus and the host. This could lead to the discovery of novel therapeutic targets effective in the battle against HIV-1.

Keywords: Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1); important kinases and phosphatases for HIV-1 replication; DNA-dependent protein kinase (DNA-PK); *non-homologous end joining* (NHEJ); *short hairpin* RNAs (shRNAs)

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) foi reconhecida em 1981 como um declínio da capacidade de resposta imunitária celular em humanos, caracterizada pelo aparecimento de diversas doenças oportunistas em indivíduos previamente saudáveis [1, 2]. Em 1983 identificou-se o vírus responsável por esta síndrome como sendo um retrovírus capaz de infectar linfócitos T CD4⁺ [3, 4]. O vírus é actualmente designado de Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) e tem duas variantes: o tipo 1 e o tipo 2, sendo que a primeira variante tem maior prevalência do que a segunda. Desde a sua descoberta, a SIDA já provocou mais de 25 milhões de mortes a nível mundial. A região mais afectada é a África Sub-Sahariana, onde se encontram 67% dos casos registados de pessoas infectadas com HIV, e onde se deram 75% das mortes causadas por SIDA em 2007 (OMS, 2008).

O HIV pode transmitir-se através de relações sexuais desprotegidas, pelo sangue, e de mãe para filho durante a gravidez, o parto ou o aleitamento [5]. O vírus tem um período de latência inicial, que pode durar até 15 anos, a seguir ao qual a população de linfócitos T auxiliares começa a decair gradualmente, alterando a proporção entre linfócitos T auxiliares (CD4⁺) e citotóxicos (CD8⁺). Em consequência, a integridade do sistema imunitário diminui, permitindo o aparecimento de diversas doenças oportunistas, tais como infecções do tracto respiratório ou tumores [5].

Até hoje não foi possível encontrar uma cura ou vacina contra o HIV, embora a esperança média de vida dos indivíduos infectados com HIV tenha aumentado significativamente devido ao desenvolvimento de fármacos anti-retrovirais cada vez mais eficientes. A Terapia Anti-Retroviral Altamente Eficaz (HAART, do inglês *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*), que combina anti-retrovirais que inibem proteínas virais como a transcriptase reversa, a protease e a integrase, é o método de tratamento contra o HIV mais eficaz da actualidade [6]. No entanto, devido à elevada taxa de mutação do vírus, novas estirpes de HIV resistentes aos fármacos actuais surgem continuamente [6], pelo que é de grande importância descobrir novos alvos terapêuticos que permitam a diversificação e melhoramento das estratégias de tratamento existentes.

1.2. A estrutura do HIV-1

O HIV-1 pertence ao género *Lentivirus* da família *Retroviridae*, que é caracterizado por ter um período de latência longo [7]. A partícula viral do HIV-1 (Figura 1) tem um genoma composto por duas cadeias simples de RNA associadas a proteínas da nucleocápside (NC).

Este complexo encontra-se envolvido por uma cápside cónica (CA) que é formada por monómeros de uma proteína de 24 kDa designada por p24. No interior da cápside encontram-se também as enzimas protease (PR), transcriptase reversa (RT, do inglês *Reverse Transcriptase*) e integrase (IN), e as proteínas auxiliares Nef (*Negative Factor*), Vpr (*Viral Protein R*) e Vif (*Viral Infectivity Factor*). Envolvendo as proteínas da cápside existe a matriz (MA) da partícula viral, que é formada por monómeros da proteína p17, e à superfície da partícula viral existe uma membrana lipídica. Existem ainda proteínas transmembranares (TM) às quais se encontram ancoradas as glicoproteínas de superfície (SU), formando heterodímeros que, por sua vez, se associam em trímeros. As proteínas SU e TM, juntamente com a membrana lipídica, formam o invólucro que envolve a partícula viral [7].

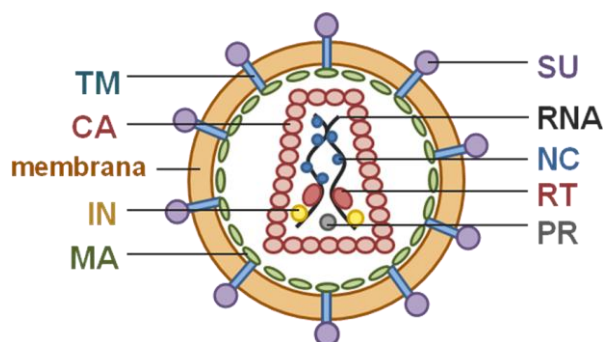


Figura 1. Estrutura do HIV-1.

1.3. O genoma do HIV-1

O genoma do HIV-1 (Figura 2) é ladeado por duas zonas terminais repetidas que se designam por LTR (*Long Terminal Repeats*). O promotor dos transcritos virais encontra-se no LTR da extremidade 5' [7].

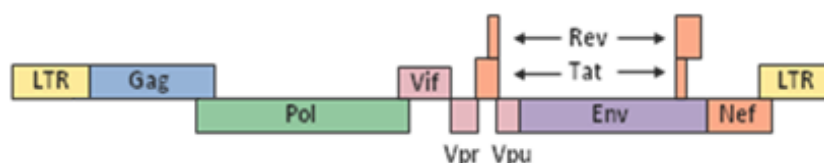


Figura 2. Genoma do HIV-1. Esquema adaptado de Flint, S. J. *et al.* Principles of Virology. ASM Press, 2000.

Os genes *gag* (*Group-specific Antigen*), *pol* (*Polimerase*) e *env* (*Envelope*) são comuns a todos os retrovírus. O gene *gag* dá origem às proteínas estruturais MA, CA e NC e o gene *pol* codifica para as enzimas virais PR, RT e IN. As proteínas do invólucro viral SU e TM são codificadas pelo gene *env*. Os restantes genes codificam para as proteínas auxiliares específicas do HIV, que desempenham diversos papéis no ciclo de vida do vírus: *vif*, *vpr*, *nef*, *vpu* (*Viral Protein U*), *tat* (*Trans-Activator of Transcription*) e *rev* (*Regulator of Virion*) [7].

1.4. O ciclo de vida do HIV-1

O HIV-1 infecta células que expressam o receptor CD4 à sua superfície, nomeadamente os linfócitos T CD4⁺ (auxiliares), podendo também infectar outros tipos celulares como células dendríticas e macrófagos [7]. O ciclo de vida do HIV-1 tem duas fases distintas: a fase inicial, que se inicia com a entrada do vírus na célula até à integração no genoma do

hospedeiro, e a fase tardia, que tem início na transcrição do RNA viral e termina na libertação de partículas virais infecciosas (Figura 3) [7].

1.4.1. A fase inicial do ciclo de vida

O ciclo de vida do HIV-1 inicia-se com a ligação do vírus à célula hospedeira por interação específica entre a proteína viral SU e o receptor celular CD4. De seguida, dá-se a fusão das membranas virais e celulares promovida por receptores de quimiocinas como o CXCR4 e o CCR5 [8, 9]. Após a fusão, o complexo nucleoproteico entra no citoplasma e ocorre um processo de desencapsidação, durante o qual há despolimerização da cápside e libertação do seu conteúdo para o citoplasma [7]. O RNA viral é então convertido em DNA de cadeia dupla pela acção da transcriptase reversa (Figura 14 em anexo). A transcrição reversa tem início com a ligação de um oligonucleótido de tRNA (RNA de transferência) a um local de ligação de oligonucleótidos (PBS, do inglês *Primer Binding Site*) próximo da região 5' do RNA viral. A RT inicia a síntese de DNA nesta região, formando uma cadeia de DNA complementar à extremidade 5'. De seguida, a RT, devido à sua actividade de RNase H, degrada a secção de RNA que já foi copiada, permitindo que o tRNA, a RT e o DNA copiado se dissociem do RNA viral e se liguem à extremidade 3', por complementaridade com o domínio repetido (R). A RT continua a retrotranscrição da cadeia de DNA, acompanhada de degradação da cadeia de RNA viral pela actividade de RNase H. Existe um zona na cadeia de RNA que é resistente à degradação, designada de PPT (*Polypurine Tract*), que funciona como *primer* para a síntese da segunda cadeia de DNA. A síntese dá-se até à região PBS que existe no tRNA. Posteriormente, a RNase H degrada o tRNA e o DNA circulariza, de forma a que as regiões PBS das duas cadeias emparelhem, permitindo a continuação da síntese da segunda cadeia de DNA e completando o LTR da primeira cadeia de DNA [10].

Outras proteínas (MA, IN, NC e Vpr) também se mantêm associadas ao complexo de RNA viral e RT, formando, após a retrotranscrição, um complexo de pré-integração (PIC, do inglês *Pre-Integration Complex*) que é importado

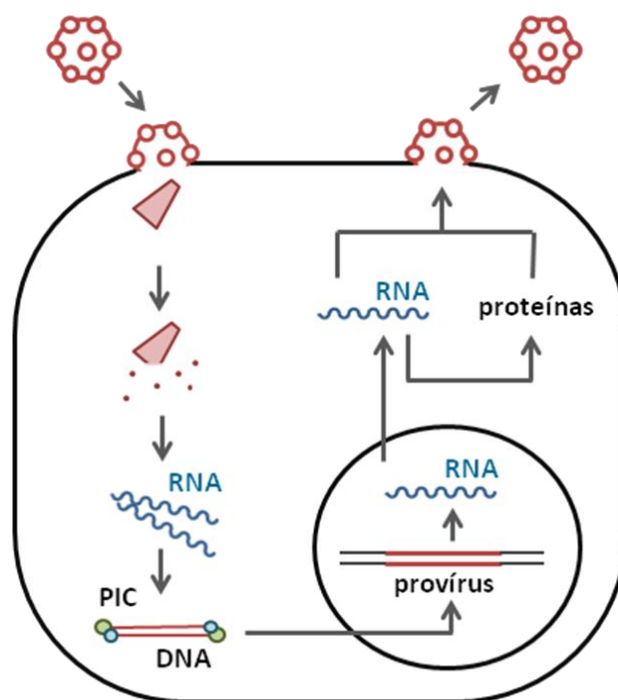


Figura 3. Replicação do HIV-1.

para o núcleo. No interior do núcleo, a integrase (IN) leva à integração do DNA viral no genoma do hospedeiro. A IN processa as extremidades do DNA viral, removendo alguns nucleótidos das extremidades 3', e cliva o DNA genómico. Após a ligação covalente das extremidades de DNA viral às extremidades 5' do DNA genómico, há reparação do DNA por enzimas celulares. A forma integrada do genoma viral tem a designação de provírus [7]. Actualmente os factores celulares de reparação ainda não foram identificados, no entanto, alguns dados sugerem que esta reparação possa ser feita pelo mecanismo de reparação não homóloga (NHEJ, do inglês *Non-Homologous End Joining*) [11].

1.4.2. A fase tardia do ciclo de vida

Após a integração do provírus, o DNA viral integrado serve de molde para a transcrição de RNA viral, que tanto é utilizado na síntese de proteínas virais como é encapsidado, constituindo o genoma viral. Inicialmente a actividade de transcrição não é muito elevada, pelo que se formam apenas algumas cópias de RNA altamente processado, que codificam para as proteínas auxiliares Tat, Rev e Nef [7]. A Tat é um activador de transcrição que se liga à região TAR (*Transactivation Response*) da extremidade 5' dos RNAs emergentes. Esta ligação leva ao recrutamento de maquinaria celular que permite o alongamento da transcrição pela polimerase de RNA II e também ao aumento dos níveis de transcrição [7]. Os transcritos longos (parcialmente processados ou não processados) ficam temporariamente retidos no núcleo. Quando há ligação da proteína Rev à região RRE (*Rev Response Element*) dos transcritos longos, há recrutamento de maquinaria celular que permite a exportação destes para fora do núcleo, onde são traduzidos [7, 12]. Os transcritos longos não processados funcionam como mRNAs para as poliproteínas precursoras Gag e GagPol e os transcritos parcialmente processados para as proteínas Env, Vif, Vpr e Vpu [7]. A poliproteína Env é sintetizada no retículo endoplasmático (RE) e é inserida co-traducionalmente no lúmen do RE, onde fica ancorada à membrana no domínio TM. A Env é clivada nas proteínas TM e SU no complexo de Golgi durante o seu transporte para a superfície celular, onde é posteriormente incorporada na partícula viral juntamente com a membrana plasmática. As poliproteínas Gag e GagPol ligam-se à face interna da membrana através da interacção com uma região de carga electropositiva do domínio MA. O RNA retroviral é então encapsidado devido à interacção entre um sinal específico de encapsidação (ψ) que se encontra na região 5' e o domínio NC da poliproteína Gag. [7].

Após a encapsidação e já no exterior da célula, dá-se o processo de maturação da partícula viral, no qual as poliproteínas são clivadas pela PR de forma a gerar enzimas independentes e proteínas estruturais, originando assim partículas virais maduras infecciosas [7].

1.5. A interação do HIV-1 com a célula hospedeira

O HIV-1 é um vírus que evoluiu de forma a utilizar os recursos da célula hospedeira para completar o seu ciclo de vida, e que adquiriu estratégias para eliminar as defesas do hospedeiro. Durante o processo de replicação do vírus no interior da célula, o HIV-1 necessita de diversos factores celulares que auxiliam, e que podem mesmo ser fulcrais, para a sua replicação, designados por factores de ajuda [7, 12].

O factor BAF (*Barrier-to-Autointegration Factor*) é uma proteína da cromatina que se liga inespecificamente a DNA de cadeia dupla, e é um constituinte do PIC [13]. O BAF tem um papel importante na manutenção da integridade do DNA viral, impedindo a sua auto-integração e promovendo a integração no genoma do hospedeiro [14].

Existem diversos factores que foram descritos como interagindo directamente com a IN, tais como o SNF5/Ini1 [15] e o LEDGF/p75 [16]. O LEDGF/p75 (*Lens Epithelium-Derived Growth Factor*) é um membro da família de proteínas relacionada com factores de crescimento derivados de hepatocarcinomas. Estudos anteriores indicam que o LEDGF/p75 tem um papel importante no direccionamento nuclear e cromossomal da IN [16], sendo também importante na protecção da IN por degradação proteossomal [17]. O SNF5/Ini1 (*Sucrose NonFermentable protein 5/Integrase Interactor 1*) é uma subunidade do complexo remodelador da cromatina SWI/SNF (*Switch/Sucrose NonFermentable*), complexo este que regula a expressão de vários genes, alterando as interacções entre o DNA e as histonas [18]. O SNF5/Ini1 liga-se especificamente à IN [15] e é encontrado nas partículas virais de HIV-1 [19]. Após a infecção pelo HIV-1, o SNF5/Ini1 desloca-se do núcleo para o citoplasma, onde interage com o PIC [20]. Diversos dados sugerem que esta interacção é prejudicial para a progressão do ciclo de replicação do HIV-1 [20, 21]. No entanto, dados contraditórios indicam que esta associação facilita a transcrição mediada pela Tat [22], e que o complexo SWI/SNF funciona como um cofactor importante na transactivação do promotor do HIV pela Tat [23]. Dados recentes implicam a Transportina-SR2, um membro da família das importinas β , no transporte nuclear do PIC por interacção com a IN [24].

O transporte dos transcritos virais longos para o citoplasma pela Rev é auxiliado pelo hRIP (*human Rev Interacting Protein*) [25], um cofactor da proteína Rev, e por diversas importinas [26] como, por exemplo, o CRM1/exportina 1 (*Chromosome Maintenance Region 1*) [27], um receptor de exportação nuclear que pertence à família de importinas β . A especificidade do sinal de exportação do complexo CRM1-Rev é mediada pela interacção deste com a GTPase Ran, um componente crítico na maioria das vias de transporte citoplasmático [28].

As cinases e as fosfatases celulares são proteínas que desempenham um papel central na regulação das vias de sinalização celular. Algumas cinases já foram implicadas na replicação do HIV-1, como é o caso de MAPKs [29], a Cdk9 [30], a Wee1 [31] e a Lck [32].

As proteínas virais Tat e SU são capazes de induzir vias de sinalização de MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*) [33, 34]. As MAPKs são cinases activadas por mitogénios que estão envolvidas na sinalização de estímulos à superfície da célula até ao núcleo. As vias de sinalização das MAPKs estão envolvidas em diversos processos celulares tais como diferenciação, movimento, divisão e morte celular [35].

A cinase dependente de ciclinas Cdk9 (*Cyclin Dependent Kinase 9*) forma complexos com ciclinas T ou K, designados por P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor b*), que controlam a transcrição pela RNA polimerase II [36]. A ciclina T1, em particular, interage com a proteína Tat, recrutando o complexo ciclina T1/Cdk9 para o transcrito de RNA viral emergente, onde a Cdk9 fosforila a RNA polimerase II, permitindo assim o alongamento da transcrição do provírus [30].

Um mecanismo que é capaz de impedir a progressão celular da fase G2 para M é a fosforilação da proteína Cdc2 (*Cell Division Cycle 2*) pela cinase Wee1. Foi demonstrado recentemente que a proteína viral Vpr, responsável pela paragem da progressão do ciclo celular da fase G2 para M em células infectadas com HIV-1, interage com a cinase Wee1, aumentando a fosforilação da proteína Cdc2 [31].

Dados recentes implicam a proteína Lck (*Leukocyte-specific protein tyrosine Kinase*), uma cinase crítica na activação de linfócitos T, no direccionamento da proteína Gag para a membrana plasmática [32].

As fosfatases PP1 e PP2A já foram implicadas na desfosforilação da cinase Cdk9, possivelmente contribuindo para a regulação da transcrição activada pela Tat [37].

Tal como foi descrito, são conhecidos alguns factores celulares importantes para a replicação do HIV-1. No entanto, este conhecimento é muito reduzido, havendo a necessidade de estudar e encontrar novos factores de ajuda para a replicação do vírus que possam levar à descoberta de novos alvos terapêuticos eficazes no combate ao HIV-1.

O projecto global onde este trabalho está inserido tem como objectivo a identificação de novos factores celulares importantes para a fase inicial do ciclo de vida do HIV-1, em particular cinases e fosfatases, uma vez que estas são os principais intervenientes nas vias de sinalização celular. Neste trabalho pretende-se desvendar o papel da cinase DNA-PK na replicação do HIV-1.

A abordagem utilizada para determinar a importância das cinases e fosfatases na replicação do HIV-1 foi a avaliação *in vitro* da resistência à infecção com HIV-1 de células onde a expressão das cinases e fosfatases estivesse individualmente silenciada. O silenciamento dos genes foi obtido por expressão estável de shRNAs (*short hairpin RNAs*), um mecanismo de interferência de RNA (RNAi), levando à diminuição da expressão das cinases e fosfatases.

1.6. A interferência de RNA

O mecanismo de interferência de RNA (RNAi) foi inicialmente descrito em 1998 por Fire *et al* [38], ao verificarem que a introdução exógena de RNA de cadeia dupla (dsRNA, do inglês *double stranded RNA*) em *Caenorhabditis elegans* levava ao silenciamento de genes endógenos. Este silenciamento era específico para a sequência de mRNA (RNA mensageiro). Posteriormente verificou-se que o RNAi é um mecanismo conservado em eucariotas e que é importante para a regulação da expressão gênica em diversos processos, tais como resistência a patógenos e regulação do desenvolvimento [39].

Existem dois mecanismos naturais distintos de RNAi que diferem na sua origem e função: os pequenos RNAs de interferência (siRNAs, do inglês *short interfering RNAs*) e os micro RNAs (miRNAs). Os siRNAs são fragmentos de 21 a 26 pares de bases que derivam da clivagem de dsRNAs longos pela ribonuclease Dicer. Os dsRNAs são formados durante a replicação de vírus, ou pela hibridação de sequências repetidas de transcritos de transposões ou de vírus latentes. Os siRNAs são incorporados no complexo de silenciamento RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), que reconhece sequências complementares de RNA, levando à sua degradação pela actividade de RNase H do RISC [40].

Os miRNAs são originados a partir de sequências de RNA endógeno que não são traduzidos e que tem sequências complementares que provocam uma auto-hibridação. Esta estrutura de dsRNA é processada inicialmente pela nuclease Drosha, formando pré-miRNAs, e posteriormente pela Dicer, originando miRNAs de cadeia simples com 21 a 23 nucleótidos. Os miRNAs são incorporados no complexo RISC e levam à degradação do mRNA homólogo [40].

A descoberta do RNAi levou ao desenvolvimento de novas técnicas que permitem estudar a importância de genes específicos através do seu silenciamento. Os siRNAs podem ser introduzidos na célula por transfecção ou através de shRNAs. Os shRNAs (Figura 4) são siRNAs que têm uma *loop* de 6 nucleótidos numa das suas extremidades, formando um *hairpin*. A *loop* é removida por clivagem do shRNA pela Dicer, formando um siRNA [40]. Os shRNAs podem ser introduzidos na célula por diversos métodos, nomeadamente por clonagem em vectores lentivirais que permitem tanto uma expressão transiente na célula, por simples transfecção, como uma expressão estável após transdução de partículas virais.

1.7. As bibliotecas de shRNA

As bibliotecas de shRNA usadas no projecto global no qual este trabalho está inserido foram desenvolvidas pelo Broad Institute de MIT e Harvard. As bibliotecas são constituídas por shRNAs clonados em vectores lentivirais que permitem a produção de partículas lentivirais contendo o shRNA. Após transdução, o gene que codifica para o shRNA é integrado no genoma da célula hospedeira e é expresso de forma estável, activando a via do RNAi (Figura 4).

As bibliotecas de shRNAs contêm entre 3 a 5 shRNAs diferentes para cada gene, de forma a emparelharem com regiões diferentes do mRNA. O nível de degradação do mRNA depende do local de emparelhamento do shRNA. No projecto global de identificação de novas cinases e fosfatases importantes para a replicação do HIV-1 foram usadas bibliotecas enriquecidas em shRNAs de cinases e fosfatases humanas. A biblioteca enriquecida em cinases inclui 2855 shRNAs diferentes, que correspondem a 622 genes de cinases humanas, e a biblioteca enriquecida em fosfatases contém 735 shRNAs diferentes, que correspondem a 180 genes de fosfatases humanas.

1.8. A identificação de cinases e fosfatases importantes na replicação do HIV-1

Como já foi referido, o projecto global onde este trabalho está inserido tem como objectivo indentificar novas cinases e fosfatases importantes para a replicação do HIV-1. Neste projecto usou-se como modelo de estudo a linha celular Jurkat, que é uma linha de linfócitos T CD4⁺. As bibliotecas lentivirais foram utilizadas para transduzir células Jurkat, de forma a criar uma população onde cada célula expresse, em média, um shRNA diferente.

Para seleccionar as células onde a expressão do shRNA leva ao silenciamento de uma proteína importante para a replicação do HIV-1, procedeu-se à selecção de células resistentes à infecção com HIV-1. Para tal, infectaram-se as células com HIV-1-HSA, que contém a proteína HSA em vez do gene *nef*. O HSA (*Heat Stable Antigen*) é um antigénio termoestável de ratinho que é expresso na superfície celular, também conhecido por CD24 (*Cluster of Differentiation 24*). A infecção com HIV-1-HSA permite a expressão de HSA na superfície das células que não são resistentes à infecção.

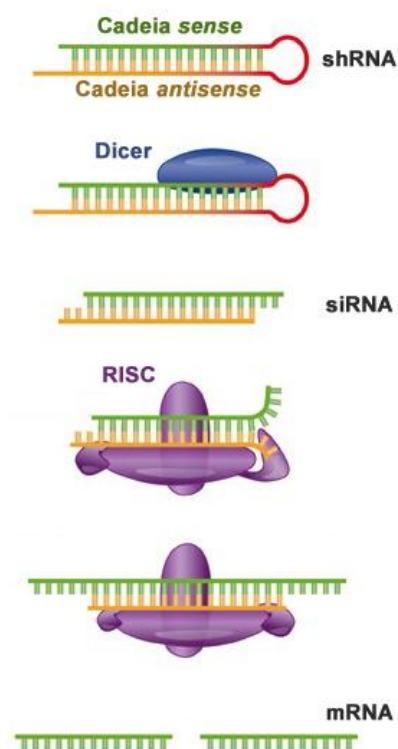


Figura 4. Interferência de RNA por shRNAs. Esquema adaptado de MISSION® shRNA (Sigma Aldrich).

As células resistentes à infecção foram submetidas a selecção negativa com *beads* magnéticas conjugadas com o anticorpo monoclonal anti-CD24, sendo seleccionadas as células que não se ligaram às *beads*. No final, obteve-se uma população resistente à infecção pelo HIV-1. Posteriormente, isolaram-se clones (células que expressam um único shRNA) e os shRNAs foram sequenciados e identificados por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

No total, foram identificadas 14 proteínas que são potenciais factores celulares importantes para a replicação do HIV-1, 6 das quais são cinases e 2 são fosfatases. As bibliotecas usadas são enriquecidas em cinases e fosfatases, o que permitiu a identificação de proteínas com outro tipo de funções, como é o caso de 2 proteínas de ligação a fosfatases, entre outros.

Uma das proteínas identificadas com este procedimento foi o CIB2 (*Calcium and Integrin Binding family member 2*). O CIB2 foi uma proteína muito pouco estudada até hoje, e tem uma grande homologia com a proteína de ligação a cálcio e integrinas CIB1 (46% idêntica e 64% de semelhança) [41]. Em 1997, foi descrita uma interacção entre o CIB1 e a subunidade catalítica da cinase de proteínas dependente de DNA (DNA-PKcs, do inglês *DNA-dependent Protein Kinase Catalytic Subunit*) [42]. O CIB2, devido à sua semelhança com o CIB1, poderá ser uma proteína de ligação a cálcio e integrinas capaz de se associar à DNA-PKcs [41, 42]. Este trabalho centra-se, em particular, na proteína DNA-PKcs e o seu papel na replicação do HIV-1.

1.9. O complexo DNA-PK

A cinase de proteínas dependente de DNA (DNA-PK, do inglês *DNA-dependent Protein Kinase*), é uma cinase nuclear de serinas e treoninas envolvida na reparação de danos de cadeia dupla de DNA (DSB, do inglês *Double Strand Break*) durante o mecanismo de junção terminal não homóloga (NHEJ, do inglês *Non-Homologous End Joining*) [43].

A DNA-PK é um complexo formado pela subunidade catalítica DNA-PKcs, com um peso molecular de 460 kDa, e pelo heterodímero Ku, que é constituído pelas subunidades Ku70 e Ku80 (ou Ku86), com 70 e 83 kDa respectivamente [43]. A sequência de aminoácidos da DNA-PKcs permite classificá-la como uma proteína pertencente à superfamília da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K). No entanto, contrariamente à PI3K, a DNA-PKcs não é capaz de fosforilar lípidos. A proteína DNA-PKcs pertence a uma subfamília das PI3Ks que tem a capacidade de fosforilar proteínas, à qual se dá a designação de PIKK (*Phosphatidylinositol-3-Kinase-like Kinase*), juntamente com a ATM (*Ataxia Telangectasia Mutated protein*) e a ATR (*Ataxia Telangectasia-Related protein*), proteínas envolvidas na sinalização de danos de DNA [43].

O heterodímero Ku é reconhecido como antígeno em algumas doenças auto-imunes, tais como o Lupus [44]. Cada subunidade do heterodímero Ku tem uma sequência de leucinas que permite a ligação ao DNA. Esta ligação é independente da sequência de nucleótidos, havendo uma grande afinidade do heterodímero para terminais livres de DNA de cadeia dupla [45].

1.9.1. A junção terminal não homóloga

As DSBs são lesões graves de DNA que podem levar à activação de *checkpoints* do ciclo celular ou mesmo à morte celular se não forem reparadas. As DSBs podem ser provocadas por agentes mutagénicos como espécies reactivas de oxigénio ou radiação ionizante; ou durante processos biológicos como a recombinação meiótica e recombinação V(D)J no processo de maturação de linfócitos T e B [43].

As DSBs podem trazer graves consequências para as células em divisão, pelo que a célula precisa de parar a progressão do ciclo celular e proceder à reparação da DSB. A paragem do ciclo celular é necessária para que a célula tenha tempo de reparar a DSB adequadamente. A paragem do ciclo celular é induzida pela activação da ATM e da ATR, que levam à fosforilação dos reguladores do ciclo celular p53, Chk1 e Chk, resultando na paragem da progressão do ciclo celular [43].

Existem dois mecanismos principais de reparação de DSBs: a reparação homóloga, que requer o alinhamento das extremidades da quebra de DNA com o cromatídeo irmão, e a junção terminal não homóloga, que não necessita de uma sequência homóloga de DNA para reparar a quebra. O NHEJ é um mecanismo que actua essencialmente nas fases G0 e G1, embora também possa desempenhar um papel de menor importância noutras fases do ciclo celular [46].

Após a formação de uma DSB, o heterodímero Ku liga-se às extremidades soltas do DNA [43] (Figura 5). Esta ligação não é estática, já que existe uma reciclagem contínua entre o heterodímero livre e o associado. Pensa-se que esta renovação seja importante para que as proteínas do NHEJ consigam aceder ao DNA da DSB, acesso este que seria bloqueado se o heterodímero Ku se associasse de forma rígida [47]. Seguidamente, a DNA-PKcs associa-se ao DNA e ao heterodímero Ku, protegendo e alinhando as extremidades da quebra [48, 49]. A

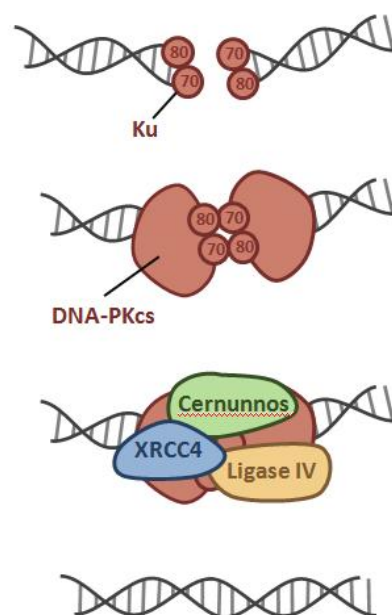


Figura 5. Esquemática da junção terminal não-homóloga (NHEJ).

associação da DNA-PKcs permite o recrutamento de factores adicionais que são necessários à reparação do DNA, como a ligase IV, o factor XRCC4 (*X-Ray Cross Complementation group 4 protein*) e a nuclease Artemis. O complexo XRCC4-Ligase IV é mobilizado para a DSB, onde é responsável pela ligação das extremidades da DSB [50]. Recentemente foi identificado um factor adicional que tem um papel importante no NHEJ, o Cernunnos, também conhecido por XLF (*XRCC4-Like Factor*). Este factor forma um complexo com o XRCC4 e parece ser importante no processamento de extremidades não compatíveis, antes da ligação [51]. A seguir à ligação das extremidades da DSB são necessárias polimerases de DNA para sintetizar a cadeia complementar. Alguns dados implicam a polimerase μ e a λ neste processo [52, 53].

No NHEJ que se processa durante a recombinação V(D)J de imunoglobulinas, as DSBs são introduzidas pelas proteínas RAG1 e RAG2 (*Recombination-Activating Genes*) em locais específicos, formando estruturas de *hairpin* nas extremidades dos segmentos que vão ser ligados. A endonuclease Artemis associa-se à DNA-PKcs, mediando a abertura destes *hairpins* e permitindo então a recombinação V(D)J pelo NHEJ [54].

O papel que a DNA-PK tem no NHEJ, no que diz respeito à sua função de cinase, ainda não está bem definido. Sabe-se que a DNA-PK é capaz de fosforilar diversas proteínas *in vitro*, tais como o factor XRCC4, o autoantígeno Ku e a proteína p53; contudo, a significância *in vivo* da fosforilação destes factores pela DNA-PK ainda não foi determinada [55, 56].

O alvo de fosforilação da DNA-PKcs mais estudado até hoje é a própria DNA-PKcs [57]. A ligação da DNA-PKcs nas extremidades da DSB bloqueia o acesso de nucleases e ligases, possivelmente protegendo o terminais de degradação e ligação prematura ou incorrecta. A autofosforilação em *trans* da DNA-PKcs nas extremidades da DSB leva a alterações conformacionais que deixam estes terminais acessíveis aos outros componentes do NHEJ, permitindo o prosseguimento da reparação [58-61].

A DNA-PKcs e o heterodímero Ku encontram-se também nos terminais cromossomais, sugerindo um papel adicional na prevenção da fusão destes últimos, e na manutenção da estabilidade dos telómeros [62-65].

Recentemente foi demonstrado que durante a resposta à formação de DSBs, o DNA-PK fosforila a cinase de serinas e treoninas Akt1, activando-a, resultando num sinal anti-apoptótico que promove a sobrevivência celular [66]. A Akt1 é uma das três isoformas da proteína Akt, uma cinase que tem um papel central na regulação do metabolismo, sobrevivência e proliferação celular. A activação do Akt controla a transição da fase G1 para a S. A Akt fosforila a Mdm2 (*Mouse Double Minute 2*), estabilizando-a, e promovendo a sua translocação para o núcleo. A Mdm2 leva à degradação da proteína reguladora do ciclo

celular p53, o que resulta na diminuição da transcrição de proteínas inibidoras do ciclo celular [67].

1.9.2. A importância da DNA-PK para os retrovírus

O papel da DNA-PK no ciclo de vida de retrovírus tem sido alvo de alguma controvérsia. Em 1999, Daniel *et al* [11] sugeriram que o NHEJ poderia desempenhar um papel importante na reparação após a integração do provírus, através de estudos com células *scid* (Severe Combined Immunodeficiency) de ratinho, que têm um DNA-PKcs defectivo. A infecção de células *scid* com HIV-1 e AAV (Avian Sarcoma Virus) levava à apoptose de cerca de 80-90% da população celular. O processo de apoptose não se verificava quando as células eram infectadas com retrovírus defectivos para a integrase [11] ou quando as células *scid* eram complementadas com DNA-PKcs [68]. A infecção retroviral de células deficientes em XRCC4 e ligase IV também causava morte celular e diminuição na eficiência de integração proviral [68]. Estes dados sugerem um papel importante do NHEJ na integração do provírus.

Os dados anteriores foram apoiados por estudos que observaram que a infecção retroviral de linfócitos tratados com Wortmanina (um inibidor de PIKKs), numa concentração capaz de inibir a DNA-PKcs e a ATM, mas não a ATR, também causava morte celular e diminuição da eficiência da integração proviral [68, 69]. No entanto, quando este procedimento foi efectuado com células deficientes em DNA-PKcs, o fenótipo foi agravado, o que sugere que a ATM poderá estar envolvida numa via de sinalização secundária que compense parcialmente o efeito que é causado pela ausência de DNA-PKcs no NHEJ.

Outros dados sugerem que as proteínas ATM e ATR, envolvidas na sinalização celular de danos de DNA e que desempenham um papel importante na progressão do ciclo celular, também poderão estar envolvidas na replicação do HIV-1 [70, 71].

O papel da DNA-PKcs na integração do HIV-1 foi inicialmente posto em causa por Baekelandt *et al* [72], ao verificarem que fibroblastos embrionários *scid* de ratinho infectados com baixos títulos virais levam a uma integração do provírus ainda mais eficiente do que as células controlo (que expressam DNA-PKcs) e não induzem apoptose. Apenas a infecção com títulos virais altos induziu apoptose, sugerindo que a DNA-PK tem um papel de protecção contra a toxicidade celular induzida pela integração.

Mais recentemente, Ariyumi *et al* [73] verificaram que a infecção de células de glioma humano deficientes em DNA-PKcs com HIV-1-GFP (modificado de forma a expressar GFP) originava uma população de células positiva para GFP com apenas metade da eficiência do respectivo controlo (proficientes em DNA-PKcs), sugerindo um papel não essencial da DNA-PK na replicação do HIV-1.

1.10. Objectivo deste trabalho

A DNA-PKcs é uma proteína importante na reparação de danos no DNA, que interage com a proteína CIB1. A proteína CIB2, que é um potencial factor de ajuda para a replicação do HIV-1, tem um elevado grau de homologia com a CIB1, colocando a hipótese de a DNA-PKcs e o CIB2 estarem envolvidos na reparação do DNA proviral após a integração. A função que a DNA-PKcs desempenha no ciclo de vida do HIV-1 está ainda por ser compreendida. O presente trabalho tem como objectivo esclarecer melhor o papel da proteína DNA-PKcs na replicação do HIV-1, e definir qual a etapa onde a DNA-PKcs poderá ser importante. Este trabalho, englobado no projecto de identificação de cinases e fosfatases importantes para a replicação do HIV-1, pretende esclarecer melhor o mecanismo de interacção do HIV-1 com a célula, o que poderá, no futuro, levar à descoberta de novos alvos terapêuticos eficazes para o combate contra o HIV-1.

2. RESULTADOS

2.1. A DNA-PKcs é silenciada pela expressão estável de shRNAs

Para avaliar a importância da DNA-PKcs na replicação do HIV-1, inicialmente criaram-se diferentes clones de células Jurkat de forma a expressar shRNAs de forma estável. Os clones para cada shRNA obtiveram-se por transdução de partículas lentivirais que contêm o shRNA e posterior isolamento, recorrendo a uma matriz de metilcelulose. Foram utilizados cinco shRNAs diferentes (A1 ao A5) que emparelham com cinco locais distintos do mRNA de DNA-PKcs, levando a diferentes níveis de degradação do mRNA. O local de emparelhamento destes shRNAs com o mRNA de DNA-PKcs encontra-se esquematizado em anexo. Como controlo negativo, utilizou-se um clone que expressa de forma estável o shRNA Scramble (Scram). A expressão deste shRNA activa a via de interferência de RNA, mas não leva ao silenciamento de nenhum gene.

Os níveis de silenciamento de DNA-PKcs foram avaliados por *Western Blot* e quantificados com o programa ImageJ (NIH). As quantificações foram normalizadas a partir da expressão da proteína β -actina. Os níveis de DNA-PKcs no clone que expressa o shRNA Scram são semelhantes aos das células Jurkat (Figura 6), o que indica que o shRNA Scram é um bom controlo para o ensaio, já que não interfere com a expressão de DNA-PKcs.

Nos restantes clones verifica-se que os níveis de expressão de DNA-PKcs foram alterados (Figura 6). Os shRNAs A1 e A3 levam a um silenciamento praticamente total de DNA-PKcs (diminuições de 99% e 95%, respectivamente), enquanto que os shRNAs A2 e

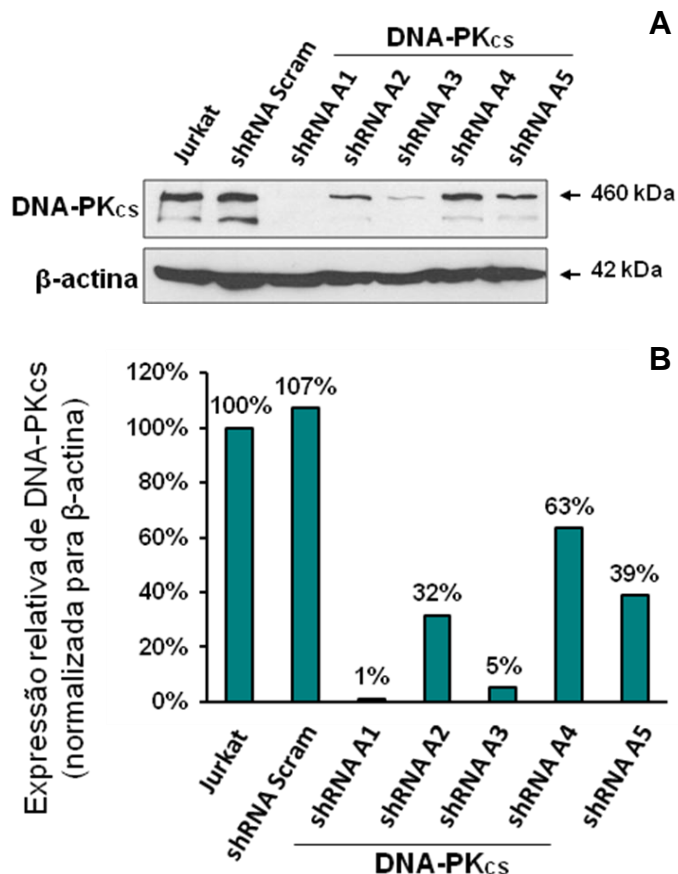


Figura 6. Silenciamento de DNA-PKcs por expressão estável de shRNAs em células Jurkat. (A) Western Blot de expressão de DNA-PKcs. O controlo de aplicação utilizado foi a β -actina. (B) Expressão de DNA-PKcs relativa ao controlo Jurkat. A quantificação foi feita com o programa ImageJ (NIH) e as quantificações foram normalizadas para a β -actina.

A5 têm um efeito moderado (diminuições de 68% e 61%). De todos os shRNAs, o shRNA A4 é o que leva a um silenciamento menos eficaz (37%). A DNA-PKcs, apesar de ter um tamanho previsto de 460 kDa, apresenta duas bandas com pesos moleculares diferentes. Uma possível justificação para este padrão é o facto de existirem diferentes isoformas de DNA-PKcs na célula, uma vez que já foram descritas três possíveis isoformas para a DNA-PKcs [74] e foram previstas treze adicionais pelo programa ExonMine (IMM).

2.2. A DNA-PKcs é importante para o ciclo de replicação do HIV-1

Os clones que expressavam diferentes shRNAs foram testados relativamente à sua resistência à infecção por HIV-1 NL4-3. Para tal, os clones foram infectados com HIV-1 NL4-3, com uma m.o.i. de 1 durante 7 dias, no final dos quais foram avaliadas as partículas virais produzidas e libertadas para o exterior das células. Pode verificar-se pela Figura 7A que o clone que expressa o shRNA Scramble produz elevados níveis de partículas virais, tal como o controlo de células Jurkat, o que demonstra que a activação da via de interferência do RNA só por si não leva a uma inibição da replicação do HIV-1. Os clones que expressam os shRNAs contra a DNA-PKcs apresentam uma produção viral muito baixa, indicando que a diminuição dos níveis de DNA-PKcs levam a uma inibição da replicação do HIV-1.

Para controlar se a diminuição da produção viral não foi provocada por uma eventual diminuição de viabilidade celular devido à infecção com HIV-1, avaliou-se a viabilidade no final do ensaio utilizando o sal de tetrazólio WST-1 (Roche). O WST-1 é catalizado por reductases mitocondriais, permitindo avaliar a viabilidade celular através de um ensaio

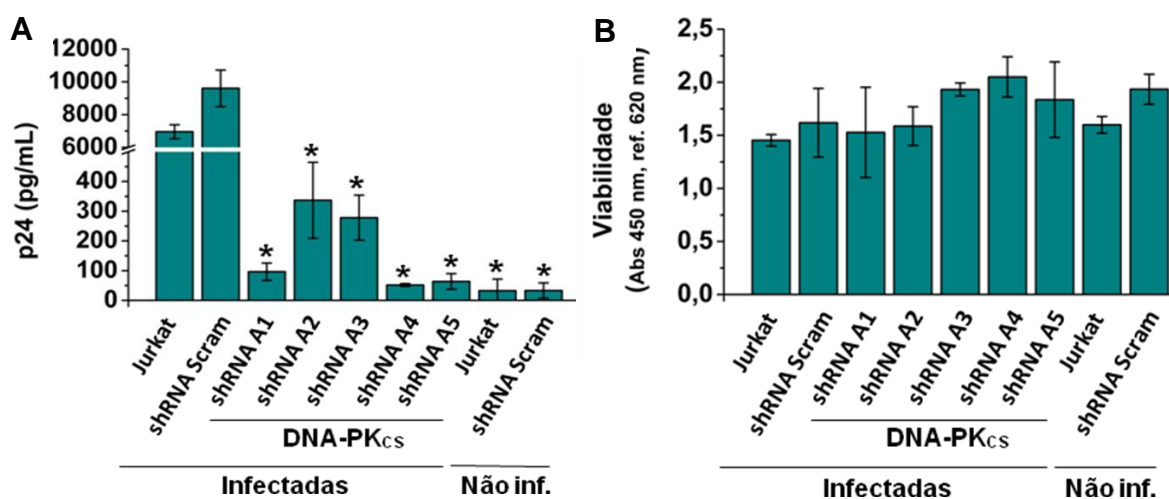


Figura 7. Efeito do silenciamento de DNA-PKcs na produção viral. (A) Produção viral no sétimo dia após infecção com uma m.o.i. de 1, quantificada por ELISA contra a proteína p24. Os clones assinalados com asterisco têm uma produção viral estatisticamente diferente do controlo Jurkat ($P < 0,05$) (B) Viabilidade celular no sétimo dia do ensaio de produção viral determinada com o reagente WST-1 ($P > 0,05$). Os valores apresentados correspondem à média calculada a partir de três ensaios independentes, com o respectivo desvio padrão.

colorimétrico. Verificou-se que, embora haja algumas diferenças entre os diversos grupos celulares, estas não são estatisticamente significativas relativamente ao controlo de células Jurkat não-infectadas (Figura 7B).

Pode concluir-se que a proteína DNA-PKcs tem uma grande importância para a replicação do HIV-1, uma vez que a diminuição dos seus níveis de mRNA leva a um bloqueio do ciclo de vida do HIV-1.

2.3. A DNA-PKcs não é importante ao nível da encapsidação

Após ter sido verificado que a diminuição dos níveis de DNA-PKcs leva a uma inibição da replicação do HIV-1, tentou-se perceber se essa inibição se devia a uma diminuição da tradução das proteínas virais.

Para tal, procedeu-se a um *Western Blot* para detectar a produção de p24 intracelular sete dias após infecção com HIV-1 com uma m.o.i de 1. As células Jurkat e o clone que expressa o shRNA Scramble apresentam, como seria de esperar, uma expressão elevada da proteína p24 e da sua forma não processada p55/Gag (Figura 8). Os clones com os shRNAs A1 a A5 tiveram uma diminuição praticamente total da expressão de p24 e p55, pelo que se pode concluir que a ausência de produção de partículas virais nestes clones

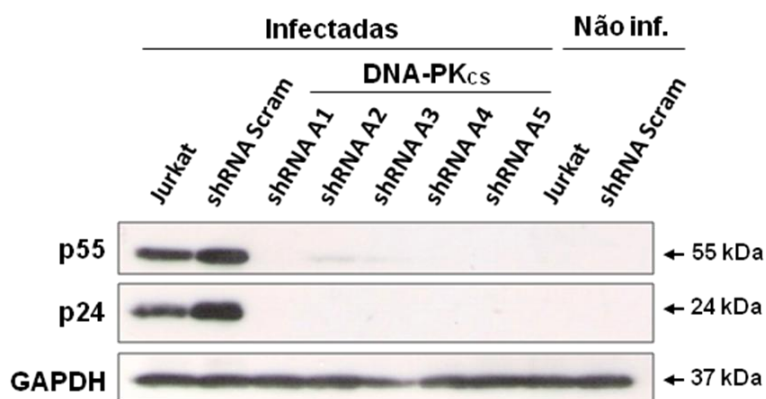


Figura 8. Avaliação da produção intracelular de p24. Os diferentes grupos celulares foram infectados com uma m.o.i. de 1 e os níveis intracelulares de p24 ao sétimo dia de infecção foram detectados por *Western Blot*.

se deve à diminuição da expressão de proteínas virais. Estes dados permitem concluir que o papel da DNA-PKcs na replicação do HIV-1 é importante numa fase anterior à tradução das proteínas virais ou no próprio processo de tradução.

2.4. A replicação do HIV-1 leva à formação de focos de lesão no DNA

Uma vez que a DNA-PK tem um papel importante na reparação de DSBs no DNA das células, avaliámos se a replicação do HIV-1 leva à formação de DSBs e qual o papel da DNA-PKcs neste processo. Para tal, procedeu-se à detecção das DSBs por marcação imunofluorescente da forma fosforilada da histona H2AX (γ -H2AX). A H2AX está presente na cromatina e é fosforilada em locais próximos de DSBs pela ATM e pela DNA-PK [75].

Verificou-se que existe um aumento do número de células com focos de γ -H2AX bem definidos nas células que expressam o shRNA A1 relativamente ao controlo de células Jurkat (Figs. 9). Uma possível justificação para esta observação é a acumulação de DSBs que possam ocorrer durante o ciclo celular, uma vez que a sua reparação pelo NHEJ é comprometida pela diminuição dos níveis de DNA-PKcs.

Verificou-se também que as células Jurkat, sete dias após infecção com HIV-1 NL4-3 com uma m.o.i. de 1, também apresentavam um maior número de células com focos de γ -H2AX bem definidos (Figura 9). Este aumento é mais evidente nas células Jurkat infectadas com uma m.o.i. de 10, comprovando que há formação de DSBs durante a replicação do HIV-1. Os clones A1 infectados com m.o.i. de 1 e de 10 (Figura 9) aparentam ter um número de células com focos de γ -H2AX semelhantes ao clone A1 não infectado, o que poderá sugerir que a DNA-PKcs poderá não ter um papel importante na reparação de DSBs durante a replicação do HIV-1. No entanto, estes dados são preliminares, uma vez que será necessário realizar réplicas deste ensaio e só então será possível fazer uma análise estatística conclusiva.

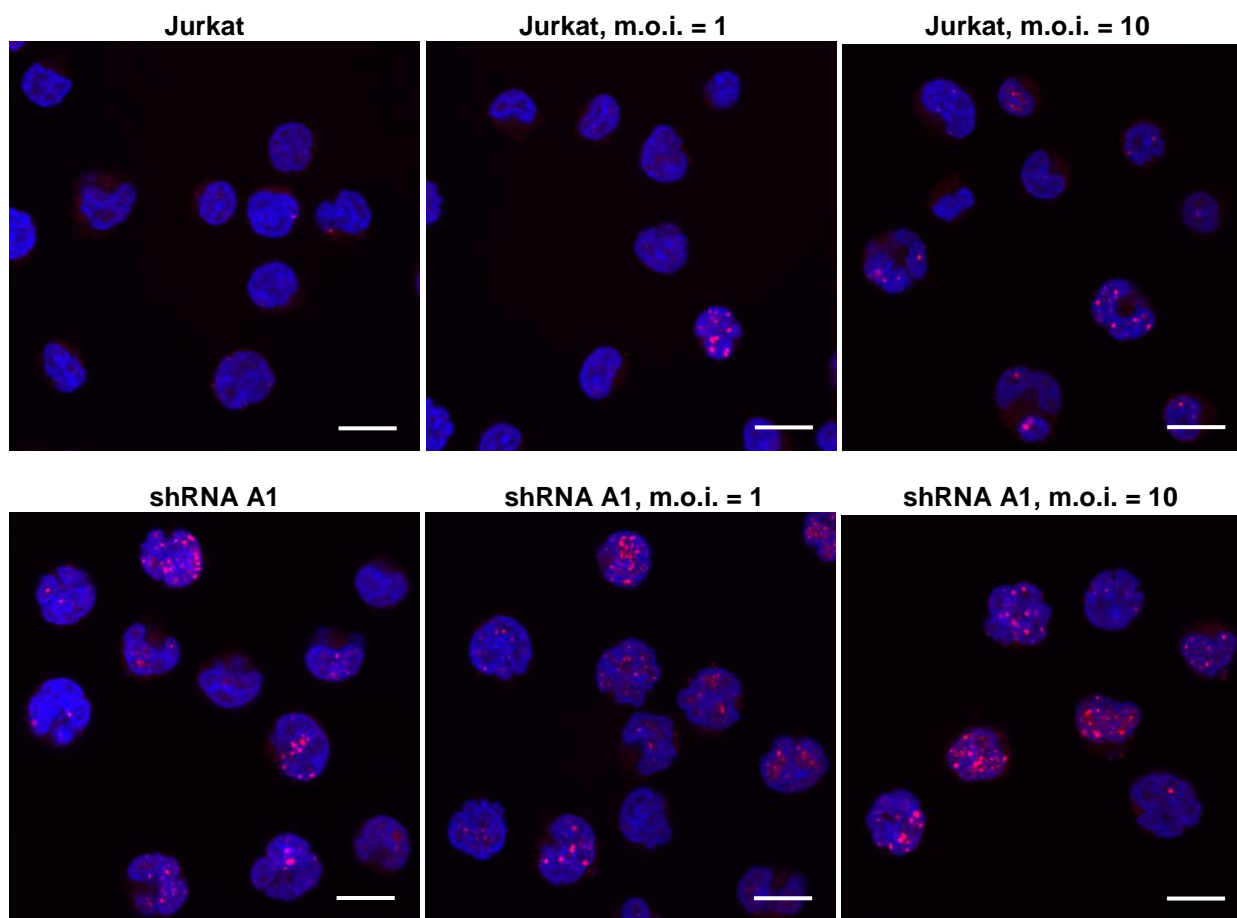


Figura 9. Focos de acumulação de γ -H2AX. Os diferentes grupos celulares foram infectados com m.o.i. de 1 e de 10 e ao sétimo dia de infecção as células foram fixadas. Os focos de γ -H2AX foram detectados por marcação com o anticorpo primário anti- γ -H2AX e um anticorpo secundário associado a CY3 (vermelho). Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). A análise foi feita por microscopia confocal e o sinal do CY3 e do DAPI foi sobreposto. A barra de escala corresponde a 10 μ m.

3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Embora se conheçam actualmente alguns factores de ajuda para a replicação do HIV-1, é importante abranger este conhecimento, de forma a esclarecer melhor o mecanismo de interacção entre o vírus e o hospedeiro.

Este trabalho permitiu avaliar a importância da DNA-PKcs para o HIV-1, baseando-se num modelo de silenciamento de genes por interferência de RNA mediada por expressão estável de shRNAs.

A expressão estável de diferentes shRNAs em células Jurkat permitiu obter clones com diferentes níveis de expressão de DNA-PKcs e avaliar a importância desta proteína na replicação do HIV-1. A maioria dos clones que expressam os diferentes shRNAs apresentam elevados níveis de inibição da libertação de partículas virais e diminuição dos níveis de p24 intracelular. Estes dados indicam que a proteína DNA-PKcs tem um papel importante para a replicação do HIV-1 numa fase anterior, durante ou antes da tradução das proteínas virais.

Estes resultados são apoiados por trabalhos anteriores que afirmam que a DNA-PKcs é importante para a replicação do HIV-1. Em 1999, Daniel *et al* descreveram um papel importante da DNA-PKcs ao nível da integração [11]. Trabalhos posteriores elaborados pelos mesmos autores também implicaram outras proteínas do NHEJ, a XRCC4 e a ligase IV, na integração do HIV-1 [68]. No entanto, diferentes estudos apontam para que o papel das proteínas do NHEJ seja importante numa fase anterior à integração do HIV-1 [76]. Por outro lado, Baekelandt *et al* [72] afirmaram que a DNA-PKcs não é necessária para a integração eficiente do vírus.

Os estudos feitos até à data que pretendiam determinar a importância da DNA-PKcs para a replicação do HIV-1 foram realizados em células *scid* de ratinho de diversos tecidos de origem [11, 68, 72] ou células de glioma humano deficientes para DNA-PKcs [73]. Neste trabalho usou-se como modelo celular a linha Jurkat, uma linhagem imortalizada de linfócitos T CD4⁺, o que permitiu estudar o efeito do silenciamento da DNA-PKcs na replicação do HIV-1 em células que são mais próximas do hospedeiro natural do HIV-1.

Neste trabalho, concluímos que a DNA-PKcs é importante para a replicação do HIV-1 e tentámos esclarecer qual o seu papel na replicação do vírus. Uma vez que a DNA-PKcs tem um papel fulcral na reparação de DSBs, tentámos perceber se a infecção com HIV-1 poderia levar à formação de DSBs e se a DNA-PKcs estaria envolvido na sua reparação. Os nossos resultados demonstraram que existe a formação de um maior número de focos de γ -H2AX em células infectadas com HIV-1 relativamente às células não infectadas, o que permite afirmar que há formação de DSBs durante a replicação do HIV-1. Estes dados são apoiados

por outros trabalhos realizados anteriormente, onde já tinha sido verificada uma formação de focos de γ -H2AX em resposta à infecção pelo HIV-1 [70, 77]. O contexto em que estas DSBs se formam no ciclo de replicação do HIV-1 ainda está por determinar.

Daniel *et al* descreveram que a DNA-PKcs é importante ao nível da integração do HIV-1 [11], no entanto, o papel que a DNA-PKcs poderá desempenhar neste processo de integração não é claro. O modelo actual de integração do provírus no DNA genómico do hospedeiro não inclui a formação de DSBs, apenas a formação de duas quebras de cadeia simples que ladeiam o provírus nas extremidades 5' [78]. Está descrito que a DNA-PK pode ser activada por danos de cadeia simples *in vitro*, o que coloca a hipótese de a DNA-PKcs poder desempenhar algum papel no processo de reparação após a integração que não esteja relacionado com a formação de DSBs.

A acumulação da histona H2AX sob a sua forma fosforilada (γ -H2AX) é habitualmente usada como o indicador da localização de DSBs, uma vez que foi descoberto que há uma acumulação de γ -H2AX na proximidade de DSBs [75]. No entanto, foi descrito em 2004 por Daniel *et al*, que o processo de integração do provírus, embora não inclua a formação de DSBs, leva à acumulação de γ -H2AX nos locais de integração [77]. O nosso trabalho demonstra uma formação de γ -H2AX em células infectadas com HIV-1. Esta observação coloca em questão se os focos de γ -H2AX que observámos em células Jurkat infectadas é uma indicação dos locais de integração do provírus, ou de DSBs que se poderão formar durante a replicação do HIV-1, ou de ambos.

Nakai-Murakami *et al* [70] descreveram que a proteína viral Vpr induz a formação de DSBs em células infectadas com HIV-1. A proteína Vpr é importante na paragem do ciclo celular em G2 em células infectadas. Nakai-Murakami *et al* descrevem que a Vpr tem um papel importante na indução da sinalização mediada pela proteína ATM e na estimulação da recombinação homóloga, o que sugere um papel das DSBs na paragem em G2.

Neste trabalho, demonstrámos que os clones que expressam o shRNA A1 de forma estável apresentam um elevado número de células com focos de γ -H2AX. Esta observação pode ser justificada pela acumulação de DSBs durante o crescimento celular que não são eficientemente reparadas pelo NHEJ, uma vez que este clone tem um elevado grau de silenciamento da expressão de DNA-PKcs.

Os nossos dados preliminares sugerem que há um número semelhante de células com focos de γ -H2AX nas células A1 infectadas relativamente às que não foram infectadas. No entanto, o número de células com focos de γ -H2AX não foi quantificado, nem o número de focos por célula, pelo que esta experiência terá de ser repetida de forma a proceder a esta quantificação. Será também necessário proceder à realização de ensaios triplicados de forma a obter resultados estatisticamente significativos. Estes dados preliminares poderão, por um lado, sugerir que o papel que a DNA-PKcs desempenha na replicação do HIV-1

poderá não estar envolvido na reparação de DSBs formadas devido à replicação viral, uma vez que a diferença entre o número de células com focos de γ -H2AX aparenta não ser muito diferente nos clones A1 infectados e não-infectados. Por outro lado, o clone que expressa o shRNA A1 apresenta um elevado número de células com focos de γ -H2AX, pelo que se pode colocar a questão se isto permitirá uma boa avaliação do eventual aumento de células com focos quando este clone é infectado. Pode também colocar-se a questão se este elevado número de DSBs no clone A1 permitirá que a infecção com HIV-1 provoque um aumento significativo de DSBs.

O papel da DNA-PK e dos restantes componentes do NHEJ na replicação do HIV-1 continua a ser controverso. Os dados existentes na bibliografia implicam diferentes papéis dos componentes do NHEJ na replicação do HIV-1. Li *et al* descreveram a associação do heterodímero Ku ao PIC [76]. Esta associação, por um lado, poderá indicar um eventual papel do NHEJ na replicação do HIV-1, mas, por outro lado, poderá ser apenas um marcador que regula a localização nuclear do PIC. Um outro papel descrito para o NHEJ é na formação das formas circulares de DNA viral com 2-LTR [76]. Estas formas surgem naturalmente no núcleo do hospedeiro durante a integração do HIV-1. Uma hipótese explicativa para esta circularização ser mediada pelo NHEJ é o possível reconhecimento das extremidades do DNA viral linear como um dano no DNA, o que poderá constituir um sinal pró-apoptótico para a célula. A sua circularização poderá impedir esta sinalização.

A DNA-PK tem um papel fulcral no NHEJ, mas também já foi demonstrado que desempenha papel de sinalização na reparação homóloga [46]. Para além da reparação de DNA, a DNA-PK tem um papel nas vias de sinalização do Akt, activando-o por fosforilação. As vias de sinalização do Akt são importantes na sobrevivência celular e na inibição de apoptose [66]. A presença da DNA-PKcs em diversas vias de sinalização celular caracteriza-a como uma proteína multifuncional. Esta multifuncionalidade pode também existir perante o HIV-1, podendo intervir em várias etapas do ciclo de vida do vírus.

O papel directo ou indirecto que a DNA-PK desempenha nos processos que são necessários para completar o ciclo de vida do HIV-1 ainda não foi verdadeiramente compreendido. A criação de linhas que expressam estavelmente shRNAs contra DNA-PKcs permite uma nova abordagem a este estudo, num modelo celular que é mais próximo do hospedeiro natural do HIV-1. Trabalhos futuros poderão esclarecer a importância da proteína DNA-PKcs na replicação do HIV-1 e levar a uma melhor compreensão da verdadeira dinâmica da interacção do vírus com o hospedeiro.

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho permitiu concluir que a proteína DNA-PKcs é importante na replicação do HIV-1 e que tem um papel importante numa fase anterior à tradução das proteínas virais. De forma a tentar perceber em que etapa do ciclo de vida do HIV-1 é que a DNA-PKcs é importante, pretende-se estudar diferentes etapas anteriores à tradução das proteínas virais.

Para avaliar o papel da DNA-PKcs ao nível da integração do provírus, pretende-se quantificar os níveis de integração proviral após infecção dos clones que expressam shRNAs, comparativamente às células Jurkat infectadas, por PCR quantitativo em tempo real.

Pretende-se também analisar o papel da DNA-PKcs na transcrição viral, usando como modelo células HeLa-P4. Estas células possuem um gene repórter de β -galactosidase sob o controlo do promotor viral LTR, permitindo avaliar a activação do promotor LTR pela actividade da proteína β -galactosidase. Para tal, irá co-transfectar-se o plasmídeo pNL4-3 com os vectores lentivirais que codificam os diferentes shRNAs contra DNA-PKcs e estudar tanto activação do promotor viral LTR, como a transcrição e produção das proteínas virais.

Para além disto, pretende-se avaliar se o papel que a DNA-PKcs desempenha no ciclo de vida do HIV-1 poderá estar relacionado com a reparação das DSBs que se formam durante a replicação do vírus. Para realizar este estudo, pretende-se testar se existe uma co-localização da DNA-PKcs com as DSBs formadas pela replicação do HIV-1.

Os próximos passos deste trabalho terão como objectivo tentar compreender a fase da replicação do HIV-1 onde a DNA-PKcs desempenha um papel importante, de forma a esclarecer melhor a interacção do vírus com a célula hospedeira. Este trabalho, juntamente com a descoberta de novas cinases e fosfatases importantes para o ciclo replicativo do HIV-1, poderão ajudar na descoberta de novos alvos terapêuticos que permitam o melhoramento das estratégias de combate ao HIV-1.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Bactérias e plasmídeos

A estirpe de *E. coli* JM109 (NEB) (genótipo: $F' traD36 proA^+B^+ lacI^q \Delta(lacZ)M15/ \Delta(lac-proAB) glnV44 e14 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17$) foi utilizada para propagar os plasmídeos.

O plasmídeo pNL4-3 foi utilizado para produzir partículas virais de HIV-1 (estirpe NL4-3) com capacidade de infecção e replicação [79].

O vector pLKO.1 foi usado para clonar as diferentes sequências de shRNA. Este vector foi utilizado para produzir as partículas lentivirais usadas para transduzir shRNAs em células Jurkat. O shRNA é correctamente encapsidado nas partículas lentivirais devido à presença das regiões LTR 5' e 3', e do sinal específico de encapsidação ψ . A região U3 do LTR da extremidade 3' foi eliminada, de forma a impedir a transcrição da região integrada sem, contudo, alterar a produção do genoma lentiviral. O plasmídeo pCMV Δ R8.9 foi utilizado para fornecer as proteínas GagPol necessárias ao empacotamento das partículas virais, e o plasmídeo pHCMV-VSV-G para fornecer a glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular (VSV-G), que é incorporado na partícula viral. Esta incorporação confere um carácter anfotrópico à partícula viral, permitindo o aumento do seu espectro de hospedeiros [80, 81].

Os mapas dos plasmídeos encontram-se em anexo.

5.2. Linhas celulares

A linha celular HEK 293T, originária de células embrionárias de rim, foi usada para a produção de partículas virais de HIV-1 NL4-3, por transfecção do plasmídeo pNL4-3. Esta linha também foi usada com o fim de produzir partículas lentivirais para transdução dos shRNAs, por co-transfecção do plasmídeo pLKO.1 (onde estão clonados os diferentes shRNAs) e dos plasmídeos pHCMV-VSV-G e pCMV Δ R8.9. As células foram mantidas em cultura em meio DMEM (Lonza) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Lonza), 1% de Penicilina-Estreptomicina-Fungizona (Pen/Strep; Lonza) e 2 mM de L-glutamina (Lonza). A linha celular Jurkat (Clone E6-1), uma linhagem imortalizada de linfócitos T CD4⁺, foi utilizada para expressar os shRNAs de forma estável, por transdução com lentivírus. A manutenção das células Jurkat foi feita em meio RPMI 1640 (Lonza) suplementado com 10% de SFB, 1% de Pen/Strep e 2 mM de L-glutamina. O meio de cultura das células Jurkat que expressam estávelmente shRNAs foi suplementado com 2 μ g/mL do antibiótico de selecção puromicina (Sigma). As linhas celulares foram mantidas a 37 °C e a 5% de CO₂. As características destas linhas celulares estão reunidas em anexo.

5.3. Produção de DNA plasmídico

Os plasmídeos foram transformados e propagados na estirpe de *E. coli* JM109. As bactérias cresceram em 250 mL de meio LB (1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracto de levedura, 1% (p/v) NaCl, pH = 7,0) suplementado com 0,1 mg/mL de ampicilina (USB), a 30 °C durante a noite, com agitação. A extracção plasmídica foi feita com o *kit* JETstar 2.0 Plasmid Purification MIDI Kit (Genomed), de acordo com as instruções do fabricante.

5.4. Produção de partículas lentivirais para transdução de shRNAs

As partículas lentivirais utilizadas para a transdução de shRNAs foram cedidas pelo laboratório do Prof. Dr. Luís Moita (Unidade de Biologia Celular do Sistema Imunológico, IMM), em colaboração com o qual este trabalho foi elaborado. A produção de partículas lentivirais foi feita por co-transfecção dos plasmídeos pLKO.1, pCMVΔR8.9 e pHCMV-VSV-G na proporção 1:1:2. Esta proporção foi otimizada para se obterem bons títulos de partículas lentivirais pseudotipadas com VSV-G que tenham boas eficiências de transdução. As células HEK 293T foram semeadas de véspera a uma densidade de 1×10^7 células por frasco de 75 cm² e co-transfectadas pelo método do fosfato de cálcio [82]. Inicialmente fez-se uma mistura de DNA/CaCl₂, adicionando primeiro o DNA plasmídico à solução 1/10 TE (1 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, pH = 7,60), e acrescentando depois um décimo do volume de CaCl₂ 2,5 M. De seguida adicionou-se a mistura de DNA/CaCl₂ gota-a-gota com um volume equivalente de HBS 2 x (50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH = 7,05), sob agitação. Esta mistura foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente (T.A.) e adicionada gota-a-gota às células HEK 293T. O meio com as partículas lentivirais produzidas foi recolhido no dia seguinte e substituído por meio novo. O meio recolhido foi filtrado com um filtro de poro de 0,45 μm para a remoção de restos celulares. De seguida, o meio foi concentrado por ultrafiltração e centrifugação. A coluna de ultracentrifugação foi invertida e centrifugada para recuperar o volume de lentivírus retido pelo filtro. Em seguida, as partículas lentivirais foram centrifugadas numa camada de solução de iodixanol a 60%. O precipitado contendo as partículas virais foi ressuscitado em PBS 1x (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH = 7,4) e armazenado a -80 °C. A quantificação dos vírus foi feita através de um ELISA contra o antígeno p24. Cada pg de p24 corresponde a 10⁴ partículas físicas de HIV-1. As partículas lentivirais têm um índice de infecciosidade de 1 unidade de transdução por cada 100 a 1000 partículas físicas de HIV-1.

5.5. Transdução de vectores lentivirais que codificam para shRNAs

Para produzir células que expressassem os diferentes shRNAs de forma estável, transduziram-se células Jurkat com lentivírus que contêm genes que codificam para os shRNAs pretendidos. As células Jurkat foram semeadas de véspera em placas de 24 poços

(1,02 mm de diâmetro por poço), a uma densidade de 500.000 células por mL de meio. Antes da transdução, a placa foi centrifugada a 200 x g durante 5 min e o meio foi renovado. As partículas lentivirais com os shRNAs foram adicionadas a cada poço para uma multiplicidade de infecção final de 1. A multiplicidade de infecção (m.o.i., do inglês *Multiplicity Of Infection*) corresponde ao número de unidades de transdução por célula. De seguida, a placa foi centrifugada a 7 x g e a 25 °C durante 1 h para facilitar a entrada das partículas lentivirais nas células. A este processo dá-se o nome de *spinoculation*. Cinco horas após a *spinoculation*, o meio foi mudado para remover as partículas lentivirais que não entraram nas células. Para eliminar as células que não foram transduzidas, nos dias seguintes a concentração de puromicina no meio foi gradualmente aumentada até 2 µg/mL.

Posteriormente, procedeu-se ao isolamento de clones para cada shRNA. Para este efeito, utilizou-se uma matriz de metilcelulose semi-sólida (ClonaCell TCS, da StemCell Technologies) onde as células não-aderentes crescem em agregados que podem ser posteriormente isolados. Para proceder a este isolamento, semearam-se 1000 células de cada população que expressa um diferente shRNA em 500 µL da matriz de metilcelulose, suplementada com 0,5 µg/mL de puromicina. Os agregados celulares cresceram durante uma semana, e foram isolados e postos em cultura em placas de 96 poços (0,31 mm de diâmetro por poço), em meio com 1 µg/mL de puromicina. As células foram mantidas em cultura em frascos de 25 cm² com uma concentração de puromicina de 2 µg/mL.

5.6. Avaliação do níveis intracelulares de DNA-PKcs

Para avaliar os níveis intracelulares de DNA-PKcs dos diferentes clones, utilizou-se o método de *Western Blot*.

5.6.1. Extractos proteicos para Western Blot

Para obter os lisados celulares necessários para a realização do *Western Blot*, aproximadamente 1×10^7 células foram inicialmente lavadas duas vezes com PBS 1x. As células foram então ressuspensas em 100 µL de RIPA (50 mM Tris pH = 7,2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100) suplementada com anti-proteases (1x Complete EDTA-free; Roche) e anti-fosfatases (10 mM NaF, 1 mM NaVO₄ e 1 mM PMSF) e colocadas imediatamente em gelo durante 30 min. Os lisados foram ressuspensos e centrifugados a 16.000 x g durante 30 min, a 4 °C. Seguidamente, o sobrenadante foi recolhido e conservado a -80°C.

5.6.2. Detecção de DNA-PKcs por Western Blot

A quantidade de proteína presente nos lisados foi normalizada pelo método de Bradford recorrendo a um conjunto de reagentes da Bio-Rad. Para cada amostra, desnaturou-se 50 mg de proteína total durante 5 min a 95 °C em tampão de aplicação (*stock* a 5x: 60 mM Tris-

CI pH = 6,8, 20% (v/v) glicerol, 10% (p/v) SDS, 5% (v/v) β -mercaptoetanol, azul de bromofenol). Seguidamente, as amostras foram aplicadas num gel de poliacrilamida a 7%. A electroforese de proteínas foi feita a 80 V durante 1 h, com o seguinte tampão de corrida: 12,5 mM Tris, 96 mM glicina, 0,1% (p/v) SDS, pH = 8,3.

Após a corrida, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Whatman) a 250 mA durante 2 h, com o seguinte tampão de transferência: 12,5 mM Tris; 96 mM glicina, 3,5% (v/v) metanol, pH = 8,3. A membrana foi bloqueada durante a noite a 4 °C, com 5% (p/v) de leite em pó magro em PBS 1x, com agitação. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-DNA-PKcs durante 2 h à T.A. e lavada durante 1 h com PBS 1x. Seguidamente, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-ratinho durante 2 h à T.A., de novo lavada com PBS 1x durante 1 h, e revelada com o reagente ECL (Pierce). Este método de revelação permite que a peroxidase conjugada com o anticorpo secundário catalise o substrato (ECL), emitindo um sinal quimioluminescente que é detectado por contacto com um filme apropriado (Hyperfilm ECL, da Amersham Biosciences).

Para detectar a β -actina, o controlo interno de aplicação das amostras, a membrana foi incubada com anticorpo primário anti- β -actina durante 2 h à T.A. e lavada durante 1 h com PBS 1x. De seguida, foi incubada com o anticorpo secundário anti-ratinho durante 2 h à T.A., lavada com PBS 1x durante 1 h e revelada com o reagente ECL e os filmes Hyperfilm ECL. As características dos anticorpos utilizados encontram-se reunidas em anexo.

5.7. Produção de partículas virais de HIV-1 NL4-3

Os vírus utilizados nos ensaios de produção viral foram produzidos por transfecção pelo método de fosfato de cálcio. Para este efeito, semearam-se 500.000 células HEK 293T de véspera em placas de 6 poços (2,22 mm de diâmetro por poço), de forma a estarem com uma confluência de 70-80% no dia de transfecção. Cada poço foi transfectado com 5 μ g do plasmídeo pNL4-3 pelo método do fosfato de cálcio. No dia seguinte, o meio das células foi mudado e, 48 h após a transfecção, o sobrenadante foi recolhido e armazenado durante a noite a 4 °C. As partículas virais de HIV-1 NL4-3 presentes no sobrenadante foram quantificadas utilizando o *kit* HIV-1 p24^{CA} Antigen Capture Assay Kit (NIH), segundo as instruções do fabricante.

5.8. Ensaio de produção viral

Para testar a resistência dos clones que expressam estavelmente shRNAs à infecção por HIV-1 NL4-3, semearam-se, no dia anterior à infecção, 500.000 células de cada clone por mL de meio, em placas de 24 poços. Antes da infecção, centrifugou-se a placa a 200 x g durante 5 min e renovou-se o meio. As células foram então infectadas com HIV-1 NL4-3

com uma m.o.i. de 1, seguido de *spinoculation*. Seis horas após a infecção, as placas foram centrifugadas a 200 x *g* durante 5 min, e o meio foi renovado.

As células foram mantidas em cultura durante sete dias. O meio foi mudado ao quarto dia de infecção, após centrifugar a placa durante 5 min a 200 x *g*. No sétimo dia de infecção, as células foram centrifugadas a 200 x *g* durante 5 min, e de seguida o meio foi recolhido e conservado a -20 °C para se proceder posteriormente à quantificação da produção viral. Após a remoção do meio, as células foram lavadas em meio sem SFB. Uma alíquota de células foi recolhida para realizar o ensaio de viabilidade celular e as restantes células foram utilizadas para proceder à extracção proteica. As células foram lavadas duas vezes com 1 mL de PBS 1x, com centrifugações de 5 min a 200 x *g*, e ressuspendidas em 80 µL no tampão de lise RIPA, suplementado com os inibidores de proteases e fosfatases descritos anteriormente. As células foram imediatamente colocadas em gelo durante 30 min, e foram seguidamente agitadas em vórtex e centrifugadas a 16.000 x *g* durante 30 min a 4 °C. Os sobrenadantes contendo proteínas celulares foram recolhidos e guardados a -80 °C, para serem utilizados em *Western Blot*, para avaliar os níveis intracelulares de p24.

5.9. Ensaio de viabilidade celular

No último dia do ensaio de produção viral, como foi descrito anteriormente, recolheu-se uma alíquota de células de cada clone para testar a viabilidade celular, ao qual se adicionou um décimo do volume do reagente de proliferação celular WST-1 (Roche). A reacção decorreu durante 1 h a 37 °C e a absorvância das amostras foi lida com um comprimento de onda de 450 nm, utilizando 620 nm como referência.

5.10. Avaliação dos níveis intracelulares de p24 por Western Blot

Para avaliar os níveis intracelulares de p24, procedeu-se à resolução de proteínas por electroforese em gel desnaturante e imunodeteccção da proteína p24. Os extractos proteicos do ensaio de produção viral foram quantificados utilizando o método de Bradford. Para cada amostra, desnaturou-se 50 µg de proteína durante 5 min a 95 °C, em tampão de amostra. A resolução de proteínas foi feita em condições desnaturantes, num gel de poliacilamida a 12%, utilizando o seguinte tampão de corrida: 25 mM Tris; 192 mM glicina, 0,1% (p/v) SDS, pH = 8,3. A electroforese foi feita a 200 V durante aproximadamente 1 h.

Seguidamente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences), durante 1 hora a 250 mA com o seguinte tampão de transferência: 25 mM Tris; 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol, pH = 8,3. A membrana foi bloqueada com 5% (p/v) de leite magro em pó em TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH = 7,5) à T.A. durante 1 h, para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos à membrana. A membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-p24 durante 1 h à T.A., seguida de

lavagens durante 20 min com TBS-T. De seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-humano à T.A. durante 1 h e lavada com TBS-T. A revelação foi feita com o reagente ECL Plus (Amersham Biosciences) e filmes Hyperfilm ECL.

A mesma membrana foi utilizada para visualizar o controlo interno de aplicação de amostras, a proteína GAPDH. Para este efeito, a membrana foi incubada com anticorpo anti-GAPDH durante 1 hora à T.A. De seguida, a membrana foi lavada com TBS-T durante 20 minutos, incubada com anticorpo anti-ratinho por 1 hora à T.A. e de novo lavada com TBS-T antes de ser revelada. A revelação foi feita com o reagente ECL Plus e os filmes Hyperfilm ECL. As características dos anticorpos utilizados no *Western Blot* estão reunidas em anexo.

5.11. Fixação de células e marcação imunofluorescente de focos de DSBs

Para avaliar a eventual formação de DSBs após infecção com HIV-1, procedeu-se à marcação imunofluorescente da histona γ -H2AX. Este procedimento foi feito em colaboração com o Prof. Dr. João Ferreira (Unidade de Biologia da Cromatina, IMM).

As células foram infectadas com HIV-1 NL4-3 com uma m.o.i. de 1 e de 10. No sétimo dia após infecção, as células foram recolhidas, lavando-as duas vezes com meio sem SFB e uma vez em PBS 1x, com centrifugações de 100 x g durante 5 min. As células foram ressuspendidas num volume adequado de PBS 1x, de forma a que as células tivessem uma densidade adequada para serem visualizadas por microscopia (150-200 μ L). As suspensões celulares foram aplicadas em cima de lamelas (1x1 cm) previamente revestidas com poli-L-lisina. As células aderiram às lamelas durante 2-3 minutos e de seguida foram incubadas durante 10 min com uma solução de fixação/extracção de 3,7% (p/v) de paraformaldeído e 0,5% (v/v) Triton X-100 no tampão HPEM 1x (30 mM HEPES, 65 mM Pipes, 10 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$, pH = 6,9). De seguida, as lamelas foram lavadas três vezes com PBS 1x e conservadas a 4°C em PBS 1x até se proceder à marcação com anticorpos.

As lamelas foram incubadas em câmara húmida com 6 μ L de anticorpo primário anti- γ -H2AX, durante 30 min a 37 °C, e de seguida lavadas com PBS 1x. Pelo menos três lavagens foram feitas ao longo de um período mínimo de 10 min. Em seguida, as lamelas foram incubadas com 6 μ L do anticorpo secundário anti-ratinho conjugado com o fluorocromo CY3, que emite fluorescência vermelha quando é excitado com um comprimento de onda adequado, e de novo lavadas com PBS 1x. A marcação com os anticorpos foi fixada com uma solução de 2% (v/v) formaldeído em PBS 1x durante um mínimo de 10 min à T.A. e as lamelas foram novamente lavadas com PBS 1x. A montagem foi feita em 1,7 μ L do meio de montagem Vectashield (Vector Labs) suplementado com 0,5 μ m/mL de DAPI (Sigma-Aldrich). As características dos anticorpos utilizados estão reunidas em anexo. As montagens foram visualizadas com o microscópio confocal Zeiss 510 (Carl Zeiss) e lasers para excitação com comprimento de onda de 405 nm (DAPI) e 561 nm (CY3).

6. BIBLIOGRAFIA

1. Siegal, F.P., et al., *Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1439-44.
2. Gottlieb, M.S., et al., *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1425-31.
3. Gallo, R.C., et al., *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 865-7.
4. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
5. Klimas, N., A.O. Koneru, and M.A. Fletcher, *Overview of HIV*. Psychosom Med, 2008. **70**(5): p. 523-30.
6. Hughes, A., T. Barber, and M. Nelson, *New treatment options for HIV salvage patients: an overview of second generation PIs, NNRTIs, integrase inhibitors and CCR5 antagonists*. J Infect, 2008. **57**(1): p. 1-10.
7. Turner, B.G. and M.F. Summers, *Structural biology of HIV*. J Mol Biol, 1999. **285**(1): p. 1-32.
8. Clapham, P.R. and R.A. Weiss, *Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors*. Nature, 1997. **388**(6639): p. 230-1.
9. 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.
10. Basu, V.P., et al., *Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription*. Virus Res, 2008. **134**(1-2): p. 19-38.
11. Daniel, R., R.A. Katz, and A.M. Skalka, *A role for DNA-PK in retroviral DNA integration*. Science, 1999. **284**(5414): p. 644-7.
12. Freed, E.O., *HIV-1 replication*. Somat Cell Mol Genet, 2001. **26**(1-6): p. 13-33.
13. Lin, C.W. and A. Engelman, *The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes*. J Virol, 2003. **77**(8): p. 5030-6.
14. Lee, M.S. and R. Craigie, *A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1528-33.
15. Kalpana, G.V., et al., *Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5*. Science, 1994. **266**(5193): p. 2002-6.
16. Maertens, G., et al., *LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 33528-39.
17. Llano, M., et al., *Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55570-7.
18. Kingston, R.E. and G.J. Narlikar, *ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity*. Genes Dev, 1999. **13**(18): p. 2339-52.
19. Yung, E., et al., *Inhibition of HIV-1 virion production by a transdominant mutant of integrase interactor 1*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 920-6.
20. Turelli, P., et al., *Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication*. Mol Cell, 2001. **7**(6): p. 1245-54.
21. Maroun, M., et al., *Inhibition of early steps of HIV-1 replication by SNF5/Ini1*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22736-43.
22. Ariumi, Y., et al., *The integrase interactor 1 (INI1) proteins facilitate Tat-mediated human immunodeficiency virus type 1 transcription*. Retrovirology, 2006. **3**: p. 47.
23. Mahmoudi, T., et al., *The SWI/SNF chromatin-remodeling complex is a cofactor for Tat transactivation of the HIV promoter*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 19960-8.
24. Luban, J., *HIV-1 Infection: Going Nuclear with TNPO3/Transportin-SR2 and Integrase*. Curr Biol, 2008. **18**(16): p. R710-3.
25. Sanchez-Velar, N., et al., *hRIP, a cellular cofactor for Rev function, promotes release of HIV RNAs from the perinuclear region*. Genes Dev, 2004. **18**(1): p. 23-34.
26. Arnold, M., et al., *Multiple importins function as nuclear transport receptors for the Rev protein of human immunodeficiency virus type 1*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 20883-90.
27. Neville, M., et al., *The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export*. Curr Biol, 1997. **7**(10): p. 767-75.
28. Askjaer, P., et al., *The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP*. J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33414-22.

29. Cohen, P.S., et al., *The critical role of p38 MAP kinase in T cell HIV-1 replication*. Mol Med, 1997. **3**(5): p. 339-46.
30. Herrmann, C.H. and A.P. Rice, *Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor*. J Virol, 1995. **69**(3): p. 1612-20.
31. Kamata, M., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr binds to the N lobe of the Wee1 kinase domain and enhances kinase activity for CDC2*. J Virol, 2008. **82**(12): p. 5672-82.
32. Strasner, A.B., et al., *The Src kinase Lck facilitates assembly of HIV-1 at the plasma membrane*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3706-13.
33. Kinet, S., et al., *gp120-mediated induction of the MAPK cascade is dependent on the activation state of CD4(+) lymphocytes*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2546-53.
34. Mischiati, C., et al., *Extracellular HIV-1 Tat protein differentially activates the JNK and ERK/MAPK pathways in CD4 T cells*. Aids, 1999. **13**(13): p. 1637-45.
35. Mutalik, V.K. and K.V. Venkatesh, *Effect of the MAPK cascade structure, nuclear translocation and regulation of transcription factors on gene expression*. Biosystems, 2006. **85**(2): p. 144-57.
36. Marshall, N.F. and D.H. Price, *Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12335-8.
37. Ammosova, T., et al., *Dephosphorylation of CDK9 by protein phosphatase 2A and protein phosphatase-1 in Tat-activated HIV-1 transcription*. Retrovirology, 2005. **2**: p. 47.
38. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
39. Hannon, G.J., *RNA interference*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 244-51.
40. Leung, R.K. and P.A. Whittaker, *RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics*. Pharmacol Ther, 2005. **107**(2): p. 222-39.
41. Wu, X. and M.R. Lieber, *Interaction between DNA-dependent protein kinase and a novel protein, KIP*. Mutat Res, 1997. **385**(1): p. 13-20.
42. Seki, N., et al., *Structure, expression profile and chromosomal location of an isolog of DNA-PKcs interacting protein (KIP) gene*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1444**(1): p. 143-7.
43. Weterings, E. and D.J. Chen, *The endless tale of non-homologous end-joining*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 114-24.
44. Cavazzana, I., et al., *Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in systemic autoimmune diseases*. Lupus, 2008. **17**(8): p. 727-32.
45. Mimori, T. and J.A. Hardin, *Mechanism of interaction between Ku protein and DNA*. J Biol Chem, 1986. **261**(22): p. 10375-9.
46. Takata, M., et al., *Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells*. Embo J, 1998. **17**(18): p. 5497-508.
47. Mari, P.O., et al., *Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(49): p. 18597-602.
48. Gottlieb, T.M. and S.P. Jackson, *The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen*. Cell, 1993. **72**(1): p. 131-42.
49. Dynan, W.S. and S. Yoo, *Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(7): p. 1551-9.
50. Grawunder, U., et al., *Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells*. Nature, 1997. **388**(6641): p. 492-5.
51. Ahnesorg, P., P. Smith, and S.P. Jackson, *XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining*. Cell, 2006. **124**(2): p. 301-13.
52. Mahajan, K.N., et al., *Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(14): p. 5194-202.
53. Lee, J.W., et al., *Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts*. J Biol Chem, 2004. **279**(1): p. 805-11.
54. Ma, Y., et al., *Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination*. Cell, 2002. **108**(6): p. 781-94.
55. Yu, Y., et al., *DNA-PK phosphorylation sites in XRCC4 are not required for survival after radiation or for V(D)J recombination*. DNA Repair (Amst), 2003. **2**(11): p. 1239-52.
56. Lees-Miller, S.P., et al., *Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(11): p. 5041-9.

57. Chan, D.W. and S.P. Lees-Miller, *The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit*. J Biol Chem, 1996. **271**(15): p. 8936-41.
58. Weterings, E., et al., *The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(24): p. 7238-46.
59. Block, W.D., et al., *Autophosphorylation-dependent remodeling of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit regulates ligation of DNA ends*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(14): p. 4351-7.
60. Ding, Q., et al., *Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(16): p. 5836-48.
61. Meek, K., et al., *trans Autophosphorylation at DNA-dependent protein kinase's two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(10): p. 3881-90.
62. d'Adda di Fagagna, F., et al., *Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells*. Curr Biol, 2001. **11**(15): p. 1192-6.
63. Espejel, S., et al., *Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres*. Embo J, 2002. **21**(9): p. 2207-19.
64. Espejel, S., et al., *Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance*. Embo J, 2002. **21**(22): p. 6275-87.
65. Rebuzzini, P., et al., *Chromosomal end-to-end fusions in immortalized mouse embryonic fibroblasts deficient in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*. Cancer Lett, 2004. **203**(1): p. 79-86.
66. Bozulic, L., et al., *PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival*. Mol Cell, 2008. **30**(2): p. 203-13.
67. Brazil, D.P., Z.Z. Yang, and B.A. Hemmings, *Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(5): p. 233-42.
68. Daniel, R., et al., *Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the nonhomologous end joining repair pathway*. J Virol, 2004. **78**(16): p. 8573-81.
69. Daniel, R., et al., *Wortmannin potentiates integrase-mediated killing of lymphocytes and reduces the efficiency of stable transduction by retroviruses*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(4): p. 1164-72.
70. Nakai-Murakami, C., et al., *HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination*. Oncogene, 2007. **26**(4): p. 477-86.
71. Daniel, R., et al., *Evidence that the retroviral DNA integration process triggers an ATR-dependent DNA damage response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4778-83.
72. Baekelandt, V., et al., *DNA-Dependent protein kinase is not required for efficient lentivirus integration*. J Virol, 2000. **74**(23): p. 11278-85.
73. Ariumi, Y., et al., *DNA damage sensors ATM, ATR, DNA-PKcs, and PARP-1 are dispensable for human immunodeficiency virus type 1 integration*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2973-8.
74. Convery, E., et al., *Inhibition of homologous recombination by variants of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1345-50.
75. Kinner, A., et al., *{gamma}-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin*. Nucleic Acids Res, 2008.
76. Li, L., et al., *Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection*. Embo J, 2001. **20**(12): p. 3272-81.
77. Daniel, R., et al., *Histone H2AX is phosphorylated at sites of retroviral DNA integration but is dispensable for postintegration repair*. J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45810-4.
78. Morozov, V.E., et al., *DNA-dependent protein kinase is activated by nicks and larger single-stranded gaps*. J Biol Chem, 1994. **269**(24): p. 16684-8.
79. Adachi, A., et al., *Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone*. J Virol, 1986. **59**(2): p. 284-91.
80. Zufferey, R., et al., *Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9873-80.
81. Zufferey, R., et al., *Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(9): p. 871-5.
82. Graham, F.L. and A.J. van der Eb, *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. Virology, 1973. **52**(2): p. 456-67.

7. Anexos

7.1. Linhas celulares

Linha celular	HEK 293T	Jurkat (Clone E6-1)
Organismo	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Fonte	Tipo celular: células embrionárias de rim	Tipo celular: linfócitos T CD4 ⁺ Doença: leucémia aguda de células T
Crescimento	Aderente	Suspensão
Morfologia	Epitelial	Linfoblástica
Meio	DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de Pen/Strep e 2 mM de L-glutamina. Mantidas a 37 °C com 5% CO ₂ .	RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 1% de Pen/Strep e 2 mM de L-glutamina. Mantidas a 37 °C com 5% CO ₂ .

Fonte: AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH

Tabela 1. Linhas celulares utilizadas neste trabalho.

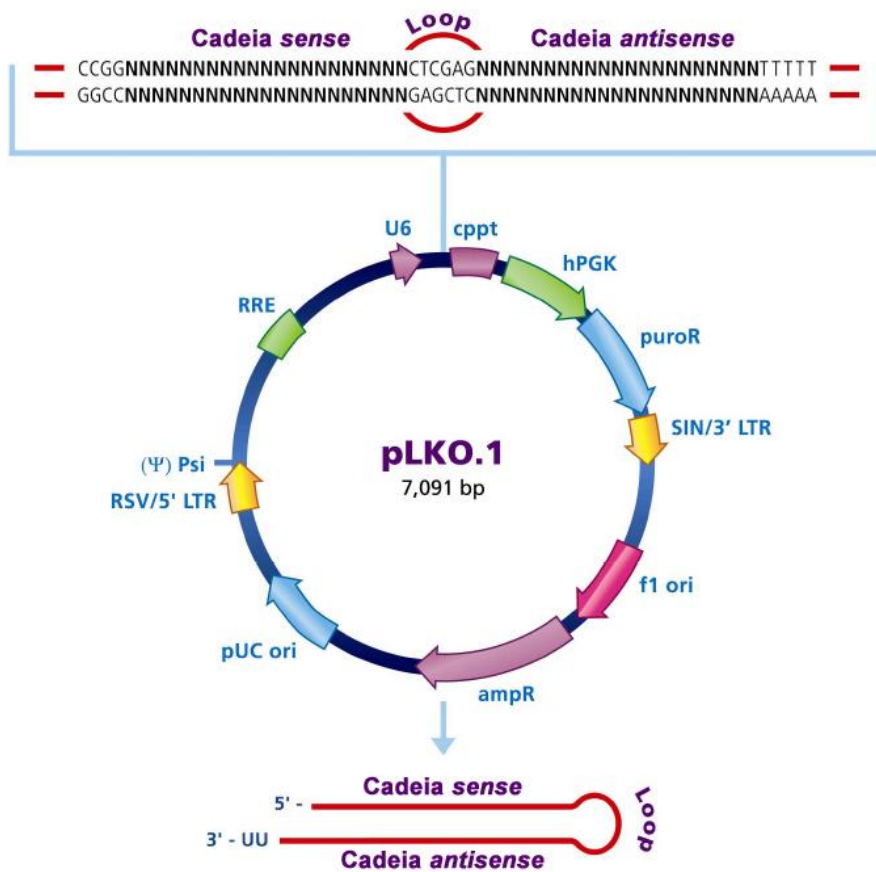
7.2. Anticorpos

Anticorpo	Origem	Fornecedor
anti-p24 #530	humano, monoclonal	AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH
anti-DNA-PKcs Ab-4	ratinho, monoclonal	Thermo Scientific
anti-β-actina AC-15	ratinho, monoclonal	Abcam
anti-GAPDH	ratinho, monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
anti-γ-H2AX	ratinho, monoclonal	Upstate Biotechnology, NY, USA
anti-humano HRP	cabra	Santa Cruz Biotechnology
anti-ratinho HRP	cabra	Bio-Rad
anti-ratinho CY3	cabra	Jackson ImmunoResearch Laboratories

Anticorpo	Condições de utilização
anti-p24	1:2000 em TBS-T
anti-DNA-PKcs	1:1000 em 2,5% (p/v) leite em pó magro e 0,1% (p/v) NaN ₃ em PBS 1x
anti-β-actina	1:1000, 2,5% (p/v) leite em pó magro em PBS 1x
anti-GAPDH	1:8000 em TBS-T
anti-γ-H2AX	1:100 em 0,2% (p/v) em gelatina de pele de peixe e 0,2% (p/v) NaN ₃ em PBS 1x
anti-humano HRP	1:5000, 1% (p/v) leite magro em pó em TBS-T
anti-ratinho HRP	1:1000 em 2,5% (p/v) leite em pó magro em PBS 1x (para o <i>Western Blot</i> de detecção de DNA-PKcs) 1:5000 em 5% (p/v) leite magro em pó em TBS-T (para o <i>Western Blot</i> de detecção do p24 intracelular)
anti-ratinho CY3	1:100 em 0,2% (p/v) em gelatina de pele de peixe e 0,2% (p/v) NaN ₃ em PBS 1x

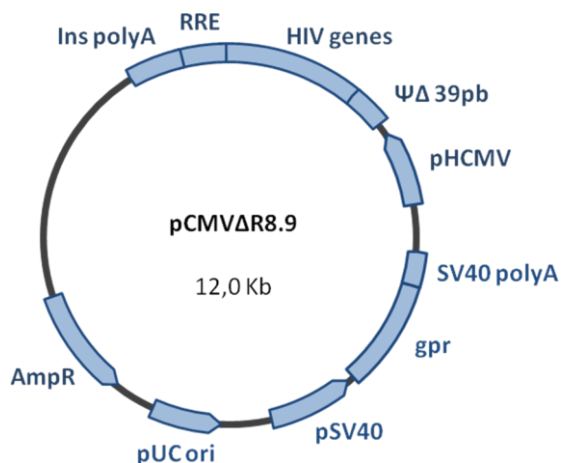
Tabela 2. Anticorpos utilizados neste trabalho e as suas condições de utilização.

7.3. Plasmídeos



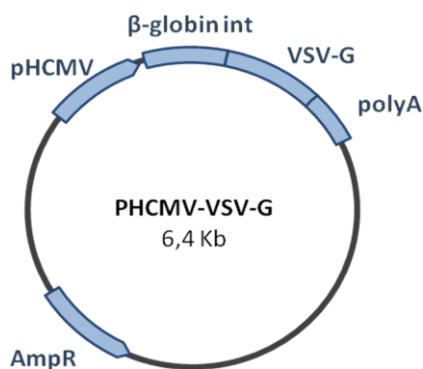
Característica	Descrição
cppt	Central polypurine tract
hPGK	Promotor da cinase de fosfoglicerato humana
puroR	Gene de resistência para puromicina em mamífero
SIN/LTR	3' long terminal repeat auto-inativável
f1 ori	Origem de relicação f1
ampR	Gene de resistência para ampicilina em bactéria
pUC ori	Origem de relicação pUC para bactérias
5' LTR	5' long terminal repeat
Psi	Sinal de empacotamento de RNA
RRE	Rev response element

Figura 10. Mapa e características do plasmídeo pLKO.1. Esquema adaptado de MISSION® shRNA (Sigma Aldrich).



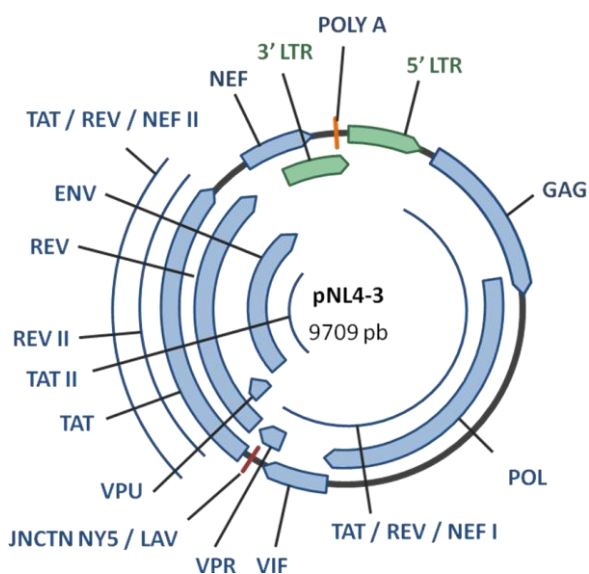
Característica	Descrição
pHCMV	Promotor do Citomegalovírus humano
Ψ (Psi) Δ39pb	Sinal de empacotamento de RNA inativo
HIV genes	Genes de HIV-1, tais como GagPol
RRE	<i>Rev response element</i>
Ins polyA	Sinal de poliadenilação
AmpR	Gene de resistência para ampicilina em bactéria
pUC ori	Origem de replicação pUC para bactérias
pSV40	Promotor do SV40
gpr	Gene de resistência para ácido micofenólico em células eucariotas
SV40 polyA	Sinal de poliadenilação

Figura 11. Mapa e características do plasmídeo pCMVΔR8.9.



Característica	Descrição
pHCMV	Promotor do Citomegalovírus humano
β-globin int	Intrão da β-globina de coelho
VSV-G	Glicoproteína G do Vírus da Estomatite Vesicular
Poly A	Sinal de poliadenilação
AmpR	Gene de resistência para ampicilina em bactérias

Figura 12. Mapa e características do plasmídeo pHCMV-VSV-G.



Característica	Descrição
5' LTR	<i>5' long terminal repeat</i>
Gag	Poliproteína Gag
Tat (I e II)	Trans-ativador de transcrição
Pol	Poliproteína Pol
Vif	Factor Viral de Infeciosidade
Vpr	Proteína viral R
JUNCTN NY5/ LAV	Junção entre as estirpes de HIV-1 LAV e NY5
Vpu	Proteína viral U
Rev (I e II)	Proteína Rev
Env	Poliproteína Env
Nef (I e II)	Proteína Nef
3' LTR	<i>3' long terminal repeat</i>
Poly A	Sinal de poliadenilação

Figura 13. Mapa e características do plasmídeo pNL4-3.

7.4. Esquema do processo de retrotranscrição do HIV-1

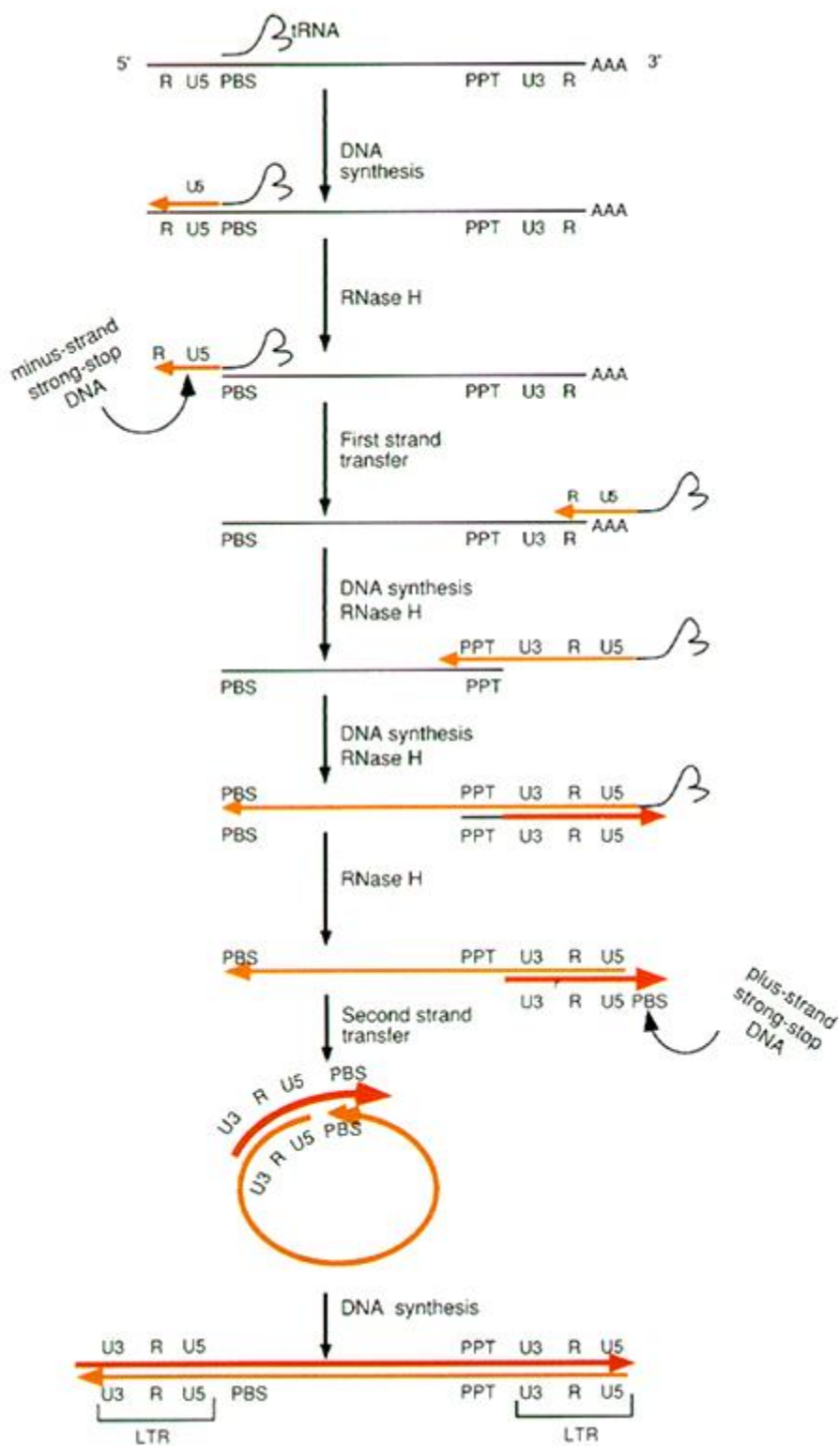
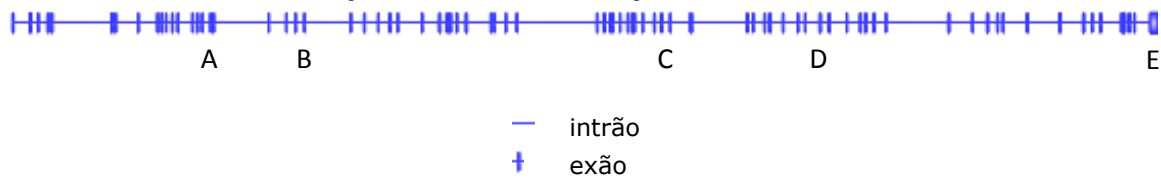


Figura 14. Processo de transcrição reversa do genoma retroviral.

A linha preta representa o RNA viral, e as linhas a laranja representam cadeias simples de DNA. Esquema adaptado de Coffin, J.M. *et al. Retroviruses*. Cold Spring Harbor Press, 1997.

7.5. Locais de emparelhamento dos shRNAs contra DNA-PKcs

Pré-mRNA de DNA-PKcs (187.075 nucleótidos)



Legenda:

- A - shRNA A3 (exão 15)
 - B - shRNA A5 (exão 20)
 - C - shRNA A2 (exão 51)
 - D - shRNA A4 (exão 62)
 - E - shRNA A1 (região 3' não traduzida)
-

Figura 15. Locais de emparelhamento dos shRNAs contra DNA-PKcs.