

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE BOTUCATU- SP

***“Produção de vetores recombinantes para expressão de
diferentes formas da proteína K1 do herpesvírus
associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV)”***

RENATA NACASAKI SILVESTRE

Acadêmica

PROF. DR. DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA

Orientador

Monografia desenvolvida em nível de Iniciação Científica no Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de bacharel em Ciências Biomédicas.

Botucatu, SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE BOTUCATU- SP

“Produção de vetores recombinantes para expressão de
diferentes formas da proteína K1 do herpesvírus
associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV)”

RENATA NACASAKI SILVESTRE

Acadêmica

PROF. DR. DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA

Orientador

Monografia desenvolvida em nível de Iniciação Científica no Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de bacharel em Ciências Biomédicas.

Botucatu, SP

dezembro de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Silvestre, Renata Nacasaki.

Produção de vetores recombinantes para expressão de diferentes formas da proteína K1 do herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV) / Renata Nacasaki Silvestre. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Deilson Elgui de Oliveira

Capes: 40105008

1. Vírus da herpes. 2. Kaposi, Sarcoma de. 3. Genética – Expressão. 4. DNA recombinante. 5. Clonagem.

Palavras-chave: Carcinogênese viral; Clonagem; Estudo in vitro; Genótipos virais; Herpes vírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV); Proteína K1 viral.

Dedicatória

Dedico esse trabalho a Deus, que me abençoa a cada minuto e a Nossa Senhora Aparecida, uma Mãe que sempre me levou a Jesus e abriu os meus caminhos.

À minha família:

Minha mãe, Cacilda, que é a melhor pessoa que eu conheço e que me inspira a ser melhor a cada dia;

Meu pai, que me apoiou nas minhas decisões sempre;

Meu avô, cujo amor e cuidado foram fundamentais para a formação do ser humano que sou,

Meu tio Flávio e minha tia Ivanilda, os quais sempre estiveram ao meu lado e me incentivaram a trilhar o meu caminho.

Aos meus amigos sem os quais nada seria possível.

Ao Grupo de Estudos em Carcinogênese Viral e Biologia dos Cânceres da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP. Pessoas extraordinárias com as quais tive a honra de conviver e que fizeram a realização desse estudo possível: ao meu orientador, Profº Dr. Deilson Elgui de Oliveira, à Doutoranda Ana Paula Ferraz da Silva, à Mestranda Annie Cristhine Moraes Sousa, à Mestranda Nathália Suiti Laszkiewicz e à acadêmica Natacha Azussa Migita e ao Doutorando Rafael Dezen Gaiolla.

Agradecimentos

Foram em torno de 500 dias. De alguma forma cada um desses dias foi essencial para ver concluído esse trabalho, essa conquista que trás no meu peito sentimentos indescritíveis, mas um deles eu acredito poder expressar, não com a maestria dos poetas, mas com a simplicidade que a minha formação me permite: agradecimento.

Obrigada, **amado Deus**, por mais esse sonho que o Senhor me permitiu realizar, obrigada por ter guiado meus passos, sonhado comigo, ouvido as minhas angústias e medos. Obrigada por me encher de coragem e fortalecer minha fé. Obrigada por me dar à mão quando eu achava que não ia conseguir e por sorrir comigo quando a vitória era alcançada. Também preciso agradecer a **Maria, Nossa Senhora**, que intercedeu por mim e se fez tão presente que às vezes, foi possível sentir as flores.

“Nenhum atleta será coroado, se não tiver lutado segundo as regras. É preciso que o lavrador trabalhe antes com afinco, se quer boa colheita. Entende bem o que eu quero dizer. O Senhor há de dar-te inteligência em tudo. (...) Eis uma verdade absolutamente certa: Se morrermos com ele, com ele viveremos. Se soubermos perseverar, com ele reinaremos. Se, porém, o renegarmos, ele nos renegará. Se formos infiéis... ele continua fiel, e não pode desdizer-se.”

II Timóteo 2, 5-13.

A todos os grandes e incomparáveis professores. Cada um de vocês me ajudou a crescer como aluna de graduação, como profissional e como pessoa. Obrigada a todos os meus professores, verdadeiros mestres que iluminaram os caminhos do conhecimento. Com os senhores aprendi que a cada passo dado, ainda temos muito a caminhar, e é isso que nos motiva, saber que a Ciência possui múltiplos caminhos a serem descobertos e redescobertos.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Patologia Molecular. Profissionais excelentes que me ensinaram tudo que sabiam com todo o coração e amor e sem os quais a realização desse trabalho não seria possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira, por ter guiado meus passos, me apoiado e confiado em mim. O senhor é um exemplo de profissional e pesquisador para mim. Um verdadeiro mestre que me ensinou que o conhecimento deve ser construído com muita dedicação e persistência, e que o verdadeiro sentido da Ciência está nas perguntas e não nas respostas. Uma vez o senhor me disse

uma frase que muito me motivou: “Muitos sonham, mas poucos se atrevem a efetivamente lutar pelo que desejam. Quando visão, coragem e determinação se somam numa mesma pessoa de boa índole, coisas maravilhosas acontecem.” Obrigada por ter me ajudado a realizar uma das coisas maravilhosas da minha vida.

A doutoranda e amiga Ana Paula Ferraz da Silva (Buzuza), eu agradeço todo carinho, consideração e empenho. Sua importância para minha formação pessoal e acadêmica foi absoluta. Obrigada por toda paciência e por todo conhecimento compartilhado.

A mestrandia e amiga Annie Cristhine Moraes Sousa, muito obrigada por todo apoio e dedicação. A sua participação foi fundamental e indispensável para o desenvolvimento desse trabalho em particular, mas também para meu desenvolvimento como cientista e como pessoa. Agradeço imensamente toda sua compreensão e companheirismo.

A acadêmica e amiga Natacha Azussa Migita (Mitiko Kudo), colega de estágio, camarada mesmo! Há quem diga que de tão ligadas, somos irmãs siamesas. Sem o seu apoio, carinho, companheirismo, amizade, dedicação e alegria não teria sido possível concretizar meus projetos. Você, para mim é um grande exemplo de profissional e de amiga. Obrigada por acreditar em mim, quando nem mesmo eu acreditava. Foi isso que me manteve de pé.

A mestrandia Nathália Suiti Laszkiewicz (Laskera), ao **doutorando Rafael Gaiolla** e a **Dra. Suzane Ramos** pelo apoio e conhecimento compartilhado.

“Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica esta informação.”

Carl Sagan

A família. Não posso me esquecer de agradecer àqueles que sempre me apoiaram e me ajudaram a sonhar, mais que isso, sonharam comigo e nunca me deixaram desistir. Foram vocês que me mantiveram de pé, firme, principalmente quando eu não podia mais me levantar sozinha. Em especial, gostaria de agradecer a duas pessoas fundamentais na minha vida: **Vovô João**, obrigada! O seu carinho foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Você que sempre esteve comigo desde os primeiros anos da minha vida, sempre me ensinando o melhor da vida, com seu jeito simples de vê-la. O senhor é um exemplo para mim, e eu te amo muito. **Mamãe, dona Cacilda**, o meu mais profundo e sincero agradecimento. Primeiro porque sem você, absolutamente nada na minha vida seria possível, eu não teria nem nascido. Você me trouxe ao mundo em condições adversas, quando tudo era contrário a isso. Você não se importou, escolheu a mim desde o princípio e continua escolhendo até hoje. Eu vejo você e penso na bênção

que é te ter como mãe e amiga. Você que me apoiou e me guiou o tempo todo. Você que me ouvia mesmo sem entender absolutamente nada sobre o meu trabalho, e torcia comigo para que minhas bactérias crescessem (rs...). Você que é a minha salvação e o elo mais forte que tenho com Deus. Mãe, eu quero que você tenha clareza de que eu não estaria aqui se não fosse o seu sacrifício, a sua força de vontade. Obrigada por tudo, por sonhar os meus sonhos comigo, por rezar todos os dias pela minha vitória e por me dar forças na hora que a derrota chega. Com você eu aprendi quem eu quero ser quando crescer, que valores devem ser respeitados, que jamais podemos desistir e que Deus sempre cuida de nós o tempo todo. Obrigada por ser um exemplo para mim, obrigada por ser a melhor mãe do mundo.

Aos amigos. Pessoas tão queridas que me ajudaram a acreditar em mim mesma e que não deixaram que eu desistisse dos meus sonhos e objetivos. Bom, vamos começar...

Aos amigos de Botucatu... Família que fiz nesses quatro anos e que sempre estará comigo. Quando você encontra alguém, você nunca mais é o mesmo. Esses encontros nos tornam diferentes, transformam nossa alma. Você leva algo do outro consigo e deixa algo de si com o outro. Eu tive a honra de levar um pouquinho de cada um que encontrei inclusive vocês, família botocuda.

Obrigada ***Patrícia (Karinha)*** minha amiga e colega de casa! Não montamos uma República enorme, mas moramos num apartamento simples e fizemos dele nosso amado lar. Obrigada por ter me acolhido sem nem me conhecer e ter dividido comigo esses quatro anos da minha vida. Um obrigado também ao veterano ***Carlos Eduardo (Godiness)*** por todo apoio e preocupação em ajudar.

Obrigada à República Subagudas, ***Juliana (Balsinha, Juju), Carlinha (Caldo), Bia Missio (Bibi)***. Cada uma de vocês foi marcante na minha história, obrigada pelos filminhos, pela diversão, pelas risadas e por me apoiarem nos momentos difíceis da vida.

Obrigada ***Amanda (Forall-Paratodos) e família!*** Sinto que você foi a botocuda da minha salvação, senão estaria perdida nessa cidade até hoje! Obrigada pelas conversas e conselhos e também quero agradecer a sua família, que me acolheu como se eu fosse da casa! Obrigada pelos momentos lindos que você me proporcionou junto deles. Obrigada ***Cecília Pessoa (Dups)*** por ser essa amiga maravilhosa, essa companheira de todas as horas, em especial de shows! Obrigada por sempre me encorajar e estar sempre ao meu lado me apoiando. Valeu ***Bárbara (Carçola)***, minha afilhada! Obrigada por todo apoio, mas principalmente, obrigada pelas risadas! Guardarei você para sempre no meu coração, a amiga mais sem noção que já tive (rs..), mas também uma amiga com um coração enorme e cheio de bondade. Obrigada ***Niele (Lady-Murf)*** Oh menina arretada! Mas uma florzinha de menina, sempre me ajudando, ouvindo meus desabafos no facebook... Quem sabe o destino não dá uma ajuda e a gente ainda se encontre muito por aí? Assim espero, obrigada de coração.

Obrigada **Rebeca (Band!), Bruninha (Soka), Alana (Dig) e Meirinha!** GOU Adorai! Obrigada por orarem por mim e intercederem sempre pela minha vitória, saber que vocês me apoiavam aliviou o peso que às vezes a vida colocava nos meus ombros e me ajudou a seguir em frente de cabeça erguida. Obrigada **Aninha** por me levar para mais perto de Deus a cada dia por meio dos nossos terços, novenas e orações.

Obrigada **Ploc (Elaine) e Gospel (Flávia)**, veterana incrível e bixete adorável, respectivamente. O degradê da Biomed que cativou meu coração e estará para sempre marcado na minha história. Sei que o amor e apoio de vocês foram essenciais para minha formação pessoal e também como biomédica!

Muito, muito obrigada meninas do meu carro e da minha vida (rs.. Zezinho's girls). Não será fácil expressar em palavras o tamanho, a profundidade do meu agradecimento a vocês. Obrigada **Natacha Azussa (Kuku – de novo você!)**. Conviver é pouco. Acho que já somos uma parte da outra. Eu acho que a amizade que temos é coisa de irmã (siamesa? Haha), é eterno. Olho para você e consigo até enxergar um pouco de mim... Foi esse reflexo que me fez caminhar, seguir, persistir. Foi a sua palavra amiga que me fez sonhar de novo quando tudo estava partido e foi seu tom desafiador que me fez repensar atitudes e crescer como ser humano. Muito obrigada **Bia Missio (Bibi, Missio)**, aquela que ouviu todos os meus problemas, e sempre me mostrou que eu era maior do que eles. Uma vez eu ouvi o Padre Fábio de Melo dizer que quando estamos enfrentando a nossa miséria, não procuramos qualquer um para desabafar, procuramos aqueles em quem mais confiamos, porque eles olharão para nossa miséria do jeito que ela merece ser olhada. Isso resume você, amiga sincera, verdadeira e carinhosa! Obrigada por me olhar diferente e nos olhos quando ninguém mais olhava. Obrigada **Lígia (Gasparzinho)** pelo seu sorriso. Sim, seu sorriso. Foi uma luz pelo meu caminho, obrigada pelas gargalhadas que me deixavam feliz mesmo quando o mundo me queria triste. Obrigada por se preocupar, por cuidar, por tudo. Ah e muito obrigada por não reconhecer as pessoas às vezes, foi muito engraçado (rs..). Desculpe explicitar isso, mas é bem divertido. Obrigada pela amizade e por apoiar meus sonhos e suportar minhas crises, sempre me acalmando e me fazendo ver além. Muito obrigada **Rebeca (Bandida)**. É, Band, eu tenho que agradecer imensamente por tudo que vivemos. Lembra quando te vi pela primeira vez na missa e a gente nunca mais se desgrudou? Pois é... Amigas na vida e na fé desde sempre, sem o seu suporte não teria conseguido passar pelas dificuldades da vida. Obrigada por tudo, sempre.

Obrigada **participantes e coordenadores do projeto "Médicos da Alegria"**, luzes e verdadeiros amigos que a cada sorriso mostravam-me o significado do amor ao próximo. Em especial, gostaria de agradecer àqueles mais próximos a mim, coordenadores que sempre deram suporte e me incentivaram a continuar a sorrir, verdadeiros exemplos de seres humanos dispostos a dedicar suas vidas aos outros: **Elaine (Ploc), Flávia (Gospel), Natanael (Napalm), Victor (Peitinho), Cesar (Kup), Valéria (Isqueci)**,

Natacha (Testinha), Priscila (Cumi), Bárbara (Carçola), Lucas (Tanguinha), Larissa (Notre-Dame), Meyre (Alba), Taty (Meléka), Giulia (Kuxs), Micael (Trava), Yasmin (Miss) e Ricardo (Tobó).

Também preciso agradecer ao nosso professor de clown, **Antonio Correia Neto**, o qual me ensinou muito sobre a vida, construção pessoal, arte, que nada nessa vida vem sem sacrifício e, principalmente, como é importante cuidar do ser humano.

Além de vocês, queria agradecer a cada paciente do hospital, os quais foram muitas vezes minha motivação para continuar no MDA e também para lutar por um mundo melhor. O sorriso de vocês é alimento para minha alma, vocês me ajudaram a ver o mundo diferente. A coragem de cada olhar, o ânimo e energia de cada criança foram essenciais para que eu chegasse aonde cheguei. Por isso, a vocês, **pacientes do Hospital das Clínicas de Botucatu**, o meu sincero e profundo agradecimento.

Obrigada amigos do **Ministério Universidades Renovadas (MUR)** e de cada **grupo de oração Universitário (GOU)** da Unesp. Amigos, irmãos de fé! Vocês foram a ponte direta que me levou até Deus por tantas vezes e aqueles que me ergueram do chão quando eu não via mais o caminho. Obrigada por toda dedicação e amizade! Muito obrigada **Rebeca (Bandida), Alana (Dig), Bruna (Soka), Rosemary (Meirinha), Aninha, Paulo (Jaula), Scarlet (Alcólita), Amanda (Barrada), Lucivane, Tiago, Paula, Maíla, Jaqueline, Letícia!**

Amigos da **Biomed XLV!!!** Minha turma de coração, obrigada por terem compartilhado comigo esses quatro anos de desafios, alegria, quedas e conquistas. Foi indescritível cada segundo que passamos juntos: o medo das provas (principalmente a primeira prova de anatomia... Quase desmaiei!), o receio do primeiro seminário, a alegria de escapar dos provões, as lágrimas, as risadas, às vezes a raiva, mas também o amor. Desejo a cada um de vocês um futuro brilhante, tanto profissionalmente quanto pessoalmente! Tenham uma vida plena, sonhem, não desistam, persistam até que não tenham mais forças. E quando caírem olhem para esses quatro anos de suas vidas: tanta história, tanta superação, tanta conquista. E de sua própria história retirem a coragem para continuar. Obrigada de coração a todos vocês.

Agradeço **aos amigos da minha cidade natal**, Jacarezinho. Vocês, mesmo distantes, fizeram parte da minha vida nesses quatro anos. Muito obrigada por todo apoio e pela amizade, em especial, Bruna, Najara, Paloma e Isabella.

Aos funcionários do departamento de Patologia. Obrigada por toda a dedicação e atenção, em especial aos técnicos do laboratório de Imunohistoquímica: Marquinhos, Celene, Fernando e Cristina, com os quais eu tive a honra de conviver durante todo andamento do projeto.

À FAPESP (Proc. IC. 2011/23234-1). Obrigada pelo apoio à realização desse estudo.

Muito obrigada **a todos** que de alguma forma me contribuíram tanto na realização desse estudo em particular, quanto em minha formação acadêmica e pessoal.

E por último, mas não menos importante, obrigada a você que está lendo esse trabalho. Seja você quem for: um cientista renomado, um professor de uma universidade, um pesquisador que acabou de ser aceito em um grupo de pesquisa, um aluno de graduação, um curioso. É graças ao seu interesse e a sua busca pelo conhecimento que a Ciência pode evoluir e que o conhecimento pode ser cada vez mais difundido. Para mim, a Ciência é mais que um conjunto de informações e dados que devem ser analisados. É uma arte, na qual é preciso ter a sensibilidade de perceber o que muitas vezes não pode ser visto.

Epígrafe

Nunca Pare de Sonhar

Gonzaguinha

Ontem um menino que brincava me falou
Hoje é a semente do amanhã
Para não ter medo que este tempo vai passar
Não se desespera, nem pare de sonhar
Nunca se entregue, nasça sempre com as manhãs
Deixe a luz do sol brilhar no céu do seu olhar
Fé na vida, fé no homem, fé no que virá
Nós podemos tudo, nós podemos mais
Vamos lá fazer o que será.

“Produção de vetores recombinantes para expressão de diferentes formas da proteína K1 do herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV)”

Índice

1	ABSTRACT	17
2	RESUMO	18
3	INTRODUÇÃO.....	20
3.1	Sarcoma de Kaposi.....	20
3.2	Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV).....	21
3.3	Proteína K1 do KSHV.....	24
4	OBJETIVOS.....	27
4.1	Objetivo geral	27
4.2	Objetivos específicos	27
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5.1	Clonagem da ORF-K1 de genótipos A, B e C do KSHV	28
5.2	Validação dos vetores recombinantes para ORF-K1 do KSHV.....	31
6	RESULTADOS	33
7	DISCUSSÃO.....	51
8	CONCLUSÃO.....	55
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

Índice de Quadros

QUADRO 1 - Linhagens celulares de linfoma de efusão primária (PEL) empregadas para obtenção das diferentes formas da ORF-K1 do KSHV..... 28

QUADRO 2 - Caracterização de algumas linhagens de PEL constitutivamente infectadas com o KSHV descritas na literatura (adaptado de Hayward e Zong, 2007)..... 28

QUADRO 3 - Iniciadores, componentes e condições de termociclagem dos experimentos de PCR para preparação dos vetores recombinantes contendo a ORF-K1 do KSHV..... 29

QUADRO 4 - Condições experimentais enzimáticas para a preparação do vetor p3xFLAG-CMV-10 e dos insertos de ORF-K1 para os procedimentos de clonagem. 30

QUADRO 5 - Listagem dos códigos de acesso* das sequências-protótipo utilizadas na análise filogenética e as respectivas linhagens celulares da qual foram provenientes. 32

Índice de figuras

- FIGURA 1** - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. (A) Amplificação do DNA das linhagens celulares KSHV-positivas identificadas como BC-2 e BCP-1, utilizando os iniciadores KSHVOK1.HindIII.S e KSHVOK1.BamHI.A. A seta indica a banda de tamanho aproximado do amplicon de ORF-K1 (~900pb); No DNA - controle negativo de amplificação (sem DNA). Marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). (B) Resultado de digestão enzimática do vetor p3xFLAG-CMV-10 e insertos de ORF-K1 de BC-2 (KSHVOK1-2) e de BCP-1 (KSHVOK1-1) com as enzimas *BamHI* e *HindIII*. Após a digestão, o vetor passa a apresentar 6249pb. Insertos se mantêm com aproximadamente 900 pb. Marcador de peso molecular de 1 Kb (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*)..... 34
- FIGURA 2** - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Marcador de peso molecular de 100pb (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). O resultado apresenta produto de PCR amplificado com iniciadores CMV-30.S e CMV-24.A. Amplicon de 1167 pb evidencia que houve ligação adequada entre inserto e vetor; já a banda de 317 pb representa amplificação de resíduo de vetores vazios não digeridos. No DNA – controle negativo de amplificação (sem DNA). Para ambos os insertos KSHVOK1-1 (A) e KSHVOK1-2 (B) foram utilizadas diferentes proporções em massa de ligação entre vetor e inserto, sendo essas 1:0 (sem inserto), 1:1, 1:2 e 1:3, com quantidade de inserto proporcionalmente crescente em relação à quantidade de vetor. 35
- FIGURA 3** - Representação esquemática do vetor recombinante geral pKSHVOK1, contendo a ORF-K1 do KSHV. Os sítios de ligação para *HindIII* e *BamHI* (cabeças-de-seta) foram utilizados para clonagem. São também indicados os sítios de ligação dos iniciadores CMV-30.S e CMV-24.A (*), empregados para validação dos vetores recombinantes gerados. 36
- FIGURA 4** - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Marcador de peso molecular de 100pb (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Na figura o resultado da *colony* PCR com os iniciadores CMV-30.S e CMV-24.A para os clones dos vetores pKSHVOK1-1 (A e B) e pKSHVOK1-2 (C e D), após transformação de bactérias competentes *E. coli DH5α*. O número correspondente à colônia selecionada na placa de LB-Ágar está indicado no topo, bem como a proporção correspondente a massa de vetor e inserto: 1:0 (sem inserto) e 1:2. O amplicon de 1167 pb representa a região do cassete de clonagem do vetor com inserto inserido; o de 317 pb corresponde à região da sequência intercalar entre os iniciadores no vetor original, não ligado. Em pKSHVOK1-2 (C e D) a proporção 1:0 não está representada pois não houve crescimento de colônias na placa. 37
- FIGURA 5** - Alinhamento das sequências consenso da ORF-K1 do KSHV dos diferentes clones dos vetores recombinantes pKSHVOK1-1 e pKSHVOK1-2..... 39
- FIGURA 6** - Alinhamento das sequências consenso de ORF-K1 do KSHV obtidas de clones do vetor recombinante pKSHVOK1-1 com sequências-protótipo depositadas no *NCBI*, encontradas através da ferramenta BLAST. Para cada clone foram selecionadas as dez primeiras sequências encontradas no banco de dados que apresentam maior cobertura em relação à sequência consultada (destaque em verde) e maior identidade máxima (destaque em vermelho). 40
-

FIGURA 7 - Alinhamento das sequências consenso de ORF-K1 do KSHV obtidas de clones do vetor recombinante pKSHVOK1-2 com sequências-protótipo depositadas no *NCBI*, encontradas através da ferramenta BLAST. Para cada clone foram selecionadas as dez primeiras sequências encontradas no banco de dados que apresentam maior cobertura em relação à sequência consultada (destaque em verde) e maior identidade máxima (destaque em vermelho). 41

FIGURA 8 - Detecção da expressão de KSHV K1 acoplada ao epítipo FLAG em membranas de fluoreto de polivinilideno (*polyvinylidene fluoride* – PVDF) (*Millipore, Billerica, MA, USA*) com 50 µg de proteínas totais. As proteínas foram extraídas de células HEK293 cultivadas *in vitro* e transientemente transfectadas com os vetores pKSHVOK1-1.11, pKSHVOK1-2.06, p3xFLAG-CMV-10 e p3xFLAG-BAP. A proteína K1 acoplada a FLAG tem tamanho aproximado de 49,3kDa. Proteína BAP ligada a FLAG é controle positivo para FLAG, com tamanho variável entre 45-55kDa. Ambos tem expressão comprovada por banda de aproximadamente 50kDa. 42

FIGURA 9 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. **(A)** Amplificação do DNA das linhagens celulares KSHV-positivas identificadas como BC-3, VG-1, BC-5 e JSC-1. A seta indica a banda de tamanho aproximado do amplicon de ORF-K1 (~900pb); No DNA - controle negativo de amplificação (sem DNA). Marcador de peso molecular de 100 pb (*Amersham, Buckinghamshire, UK*). **(B)** Resultado de digestão enzimática do vetor p3xFLAG-CMV-10 e insertos de ORF-K1 de BC-3 (KSHVOK1-3), JSC-1 (KSHVOK1-4), VG-1 (KSHVOK1-6) e BC-5 (KSHVOK1-5) com enzimas *Bam*HI e *Hind*III. Após a digestão, o vetor passa a apresentar 6249pb e insertos aproximadamente 900 pb. Marcador de peso molecular 1 Kb (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). 43

FIGURA 10 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Marcador de peso molecular de 100 pb (*Amersham, Buckinghamshire, UK*). É notada ligação adequada entre inserto e vetor (banda de 1167pb); a banda de 317pb representa amplificação de resíduo de vetor vazio, não digerido. Foram realizadas ligações com diferentes proporções de massa entre vetor e inserto para KSHVOK1-3 **(A)**, KSHVOK1-4 **(B)**, KSHVOK1-5 **(C)** e KSHVOK1-6 **(D)**: 1:0 (sem inserto), 1:1, 1:2 e 1:3. 44

FIGURA 11- Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Uso de marcador de peso molecular 100 pb (*Amersham, Buckinghamshire, UK*). Amplicon de 1167 pb mostra que houve ligação adequado entre inserto e vetor. Para o inserto KSHVOK1-5 foi utilizada proporção molar de ligação 1:3 entre vetor e inserto. 45

FIGURA 12 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Marcador de peso molecular 100pb (*Amersham, Buckinghamshire, UK*). Na figura, o resultado da *colony*-PCR para os clones dos vetores pKSHVOK1-3 e pKSHVOK1-6 **(A)**, pKSHVOK1-4 **(B)** e pKSHVOK1-5 **(C)** após transformação de bactérias competentes *E. coli DH5α*. O número correspondente à colônia selecionada na placa de LB-Ágar está indicado no topo, bem como a proporção correspondente a massa de vetor e inserto, sendo 1:2 para vetores pKSHVOK1-3, pKSHVOK1-4 e pKSHVOK1-6 **(A e B)** e para pKSHVOK1-5, 1:3 em proporções em massa (colônias 1 e 2) e molar (colônias 3 a 6) **(C)**. 45

FIGURA 13 - Alinhamento das sequências consenso de ORF-K1 do KSHV obtidas de clones dos vetores recombinantes pKSHVOK1-3, pKSHVOK1-4, pKSHVOK1-5 e pKSHVOK1-6 com sequências-protótipo depositadas no *NCBI*, encontradas através da ferramenta BLAST. Para cada clone, foram selecionadas as dez primeiras

sequências encontradas no banco de dados que apresentam maior cobertura em relação à sequência consultada (destaque em verde) e maior identidade máxima (destaque em vermelho). 46

FIGURA 14 - Análise filogenética das sequências da ORF-K1 do KSHV obtidas dos vetores recombinantes pKSHVOK1-3, pKSHVOK1-4, pKSHVOK1-5 e pKSHVOK1-6 (destacadas com *). Tais amostras foram comparadas com sequências-protótipo da ORF-K1 viral depositadas no banco de dados *NCBI*. Entre parênteses o código de acesso (*Accession #*) do *Genbank* de cada sequência e a frente do código, o genótipo a que pertencem cada uma das linhagens celulares. A filogenia mostra que ORF-K1 dos vetores recombinantes pKSHVOK1-3 e pKSHVOK1-4 pertencem ao genótipo C do KSHV, já pKSHVOK1-5 e pKSHVOK1-6, ao genótipo B. 50

FIGURA 15 - Detecção da expressão de KSHV K1 acoplada ao epítipo FLAG em membranas de fluoreto de polivinilideno (*polyvinylidene fluoride – PVDF*) (*Millipore, Billerica, MA, USA*) com 50 µg de proteínas totais. As proteínas foram extraídas de células HEK 293 *in vitro* e transientemente transfectadas com vetores pKSHVOK1-2.06, pKSHVOK1-3.06, pKSHVOK1-5.03, p3xFLAG-CMV-10 e p3xFLAG-BAP. A proteína K1 acoplada a FLAG tem tamanho aproximado de 49,3kDa. Proteína BAP ligada a FLAG é controle positivo para FLAG, com tamanho variável entre 45-55kDa. Ambos tem expressão comprovada por banda de aproximadamente 50kDa. Presença de bandas inespecíficas nos vetores recombinantes, e também no vetor vazio. 51

1 Abstract

Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) or human herpesvirus 8 (HHV-8) is a gammaherpesvirus essential for the development of all forms of Kaposi's sarcoma (KS). The KSHV's life cycle is basically divided into latent and lytic phases, which have distinct viral gene expression profiles. Some important oncogenic products of KSHV are expressed during the lytic phase, including the viral K1 protein. As an effect of interference with intracellular signaling, K1 expression increases proliferation and survival of KSHV-infected cells. Due to its high level of genetic variability compared to other regions of the viral genome, the K1-encoding ORF (ORF-K1) is commonly evaluated for KSHV genotyping. It remains unclear whether different viral genotypes have particular biological effects that might modify the KSHV oncogenicity. The present study aimed to contribute to the establishment of an experimental *in vitro* model for evaluation of the K1 protein from common KSHV genotypes. Recombinant expression vectors with the ORF-K1 from KSHV genotypes A, B and C were prepared by genetic cloning. The recombinant vectors pKSHVOK1 obtained by cloning were sequenced for structural validation. After that, HEK293 cell line was transfected with the recombinant vectors, and proteins were extracted for expression analysis by Western blot technique, for K1 functional validation. Results showed that ORF-K1 vectors containing KSHV ORF-K1 from the A, B and C genotypes were produced and structurally validated by DNA sequencing. The K1 expression at the protein level was also confirmed by immunoblots using an antibody for FLAG detection, an epitope from the vector that binds to K1. Based on presented results, it's possible to conclude that the recombinant vectors will be able to be used in future studies of K1 protein biological properties from distinct KSHV genotypes.

2 Resumo

O herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (*Kaposi's sarcoma associated Herpesvirus* - KSHV), ou herpesvírus humano tipo 8 (*Human herpesvirus 8* - HHV-8), é um gamaherpesvírus associado ao desenvolvimento de todas as formas de sarcoma de Kaposi (SK). O ciclo biológico do KSHV é tradicionalmente dividido em duas fases de expressão gênica, denominadas latência e ciclo lítico. Dentre os produtos virais expressos predominantemente durante ciclo lítico destaca-se a proteína K1, a qual aumenta sobrevivência e proliferação da célula infectada em virtude de interferência em vias de transdução de sinais intracelulares. Por apresentar elevada variabilidade em relação aos outros segmentos do genoma viral, a ORF-K1 é comumente analisada em estudos de genotipagem do KSHV. Até o momento não se sabe se diferentes genótipos do vírus apresentam características biológicas peculiares, que possam modificar o potencial cancerígeno desse vírus. Com o intuito de contribuir no estabelecimento de modelo experimental para análise dos efeitos biológicos da expressão de diferentes formas de proteína K1 do KSHV, no presente estudo efetuou-se a preparação de vetores de DNA recombinantes contendo a ORF-K1 do KSHV de genótipos A, B e C empregando métodos de clonagem. Os vetores recombinantes pKSHVOK1 foram então submetidos a sequenciamento, para validação de sequências de K1 de genótipo A, B e C do KSHV. Em seguida, células HEK293 foram transfectadas e, para validar os vetores produzidos quanto à expressão da ORF-K1 em nível proteico, lisados das células transfectadas foram analisadas por técnica de *Western blot* (WB). Os resultados mostraram que vetores recombinantes contendo a ORF-K1 do KSHV dos principais genótipos virais (A, B e C) foram produzidos e validados estruturalmente por sequenciamento automatizado de DNA. Já a expressão proteica de K1 foi constatada por *immunoblots* realizados com anticorpo dirigido ao epítopo FLAG ligado a K1. Dessa forma concluiu-

se que os vetores recombinantes produzidos e validados poderão ser utilizados em estudos funcionais posteriores das propriedades biológicas de K1 dos diferentes genótipos do KSHV.

3 Introdução

3.1 Sarcoma de Kaposi

Em 1872, Moritz K. Kaposi descreveu pela primeira vez o sarcoma de Kaposi (SK) como um sarcoma idiopático e multipigmentado ocorrendo em pele¹. Atualmente o diagnóstico morfológico do SK é essencialmente baseado na identificação de lesões formadas por células fusiformes neoplásicas, células endoteliais e abundância de vasos sanguíneos neoformados, permeados por infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear². Aspectos clínicos, epidemiológicos e patogênicos permitem atualmente classificar o SK em quatro formas principais: o SK clássico, o SK endêmico africano, o SK iatrogênico e SK associado à AIDS³.

O SK clássico ocorre principalmente em homens mais velhos, judeus de origem Asquenazi, residentes em regiões do Mediterrâneo ou do leste europeu. Nessa forma a doença se manifesta usualmente como lesões cutâneas isoladas em membros inferiores, raramente atingindo mucosas. O SK endêmico, por sua vez, é mais frequentemente observado em crianças de países equatoriais africanos, que apresentam doença mais agressiva, comprometendo vísceras e o sistema linfático. O SK iatrogênico se desenvolve em indivíduos sob tratamento imunossupressor para manutenção de enxerto após transplante de órgãos. É relativamente agressivo, manifestando-se em mucosas, vísceras e linfonodos, mas também podendo ocasionar lesões em pele⁴.

O SK associado à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome - AIDS*) é a forma mais grave da doença. É o câncer mais comumente encontrado em homossexuais e bissexuais portadores do vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus – HIV*). Pacientes com SK associado à AIDS (SK-AIDS) frequentemente apresentam lesões disseminadas acometendo pele e vísceras, notadamente trato gastrointestinal e pulmões⁴.

No início da década de 1990 suspeitava-se que agentes infecciosos tivessem participação na etiologia do SK. Alguns herpesvírus descritos até então foram cogitados, tais como o citomegalovírus (CMV) e o herpesvírus humano tipo 6 (*Human Herpesvirus type 6* - HHV-6). Em 1994, analisando amostras de SK de pacientes portadores do HIV, Chang e colaboradores identificaram sequência de DNA de um novo herpesvírus humano, originalmente denominado herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (*Kaposi's sarcoma associated herpesvirus* - KSHV)⁵.

3.2 Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV)

O KSHV, ou herpesvírus humano tipo 8 (*Human Herpesvirus-8* - HHV-8), é um herpesvírusgama⁶, tal qual o vírus Epstein-Barr (*Epstein barr virus* – EBV), que é associado ao desenvolvimento de parcela dos casos de linfomas Hodgkin, linfomas não-Hodgkin e alguns cânceres epiteliais ocorrendo em humanos⁷. O KSHV pertence ao gênero *Radnovirus*⁶, sendo o primeiro vírus descrito desse gênero a infectar naturalmente seres humanos. Atualmente está bem definida sua participação no desenvolvimento do SK e de algumas doenças linfoproliferativas, notadamente a doença multicêntrica de Castleman (*Multicentric Castleman's Disease* – MCD) e o linfoma de efusão primária (*Primary Effusion Lymphoma* - PEL)^{8,9}.

O KSHV infecta vários tipos celulares, notadamente células endoteliais, células B e monócitos, mas também fibroblastos, queratinócitos e células epiteliais^{10,11}. O genoma viral é constituído de fita dupla de DNA com tamanho estimado entre 165kb e 170kb; apresenta cerca de 87 sequências abertas de leitura (*Open Reading Frame* – ORF), além de aproximadamente 17 micro-RNAs. No genoma do KSHV são encontradas 14 ORFs que codificam proteínas com elevada semelhança com proteínas celulares².

O ciclo biológico do KSHV é dividido nas fases latente e lítica. Na fase latente a célula se torna menos suscetível à morte celular e é estabelecida infecção viral persistente. No ciclo lítico, por sua vez, ocorre replicação viral e morte celular decorrente de efeitos citopáticos virais. Produtos virais expressos em ambas as fases afetam o crescimento e a proliferação celular, além de induzirem inflamação e eventualmente transformação celular².

O padrão de expressão de genes do KSHV varia de acordo com a fase do ciclo biológico viral. Na fase de latência o genoma viral se mantém circular, em virtude da junção de segmentos terminais ricos em repetições CG, formando um epissoma viral. Nessa fase a expressão dos genes virais é restrita e não há produção de novas partículas virais^{12, 13}. Na fase lítica o material genético do KSHV torna-se linear e um repertório maior de genes virais é expresso, a começar por genes de expressão precoce, que preparam a célula hospedeira para a replicação¹².

Os genes da fase de latência são expressos na maioria das células fusiformes do SK e, de um modo geral, contribuem para sua sobrevivência. Merecem destaque a ORF-73, ORF-K13 e ORF-72^{13,14}. A ORF-73 codifica o antígeno nuclear associado à latência (*Latency-associated Nuclear Antigen* – LANA), cuja função principal é ligar o epissoma viral ao cromossomo da célula hospedeira¹⁵. LANA também contribui na manutenção da latência e no bloqueio da apoptose (e.g., por inibição de p53)¹⁶. A ORF-K13 codifica a proteína viral inibitória de FLICE (*FADD-like interferon converting enzyme or caspase 8 (FLICE) inhibitory protein* – vFLIP), que ativa a via de sinalização celular NF-κB, responsável por modular a expressão de genes relacionados à resposta imunitária e inflamação, regulando negativamente a apoptose e modificando a expressão de alguns genes supressores tumorais¹⁷. A ORF-72 codifica uma proteína viral

semelhante à ciclina D humana (*viral cyclin D – vCyc*), estimulando o ciclo celular e, conseqüentemente, a replicação do DNA viral associado ao genoma celular¹⁸.

A reativação do KSHV acontece pela expressão do ativador de replicação e transcrição (*Replication and Transcription Activator – rta*), proteína codificada pela ORF-50 viral. Rta causa a transativação de promotores de genes líticos virais pela ligação a elementos rta-responsivos (*Rta Response Elements - RRE*) nesses promotores¹⁹. A proteína pode também ativar os promotores de maneira indireta, associando-se a fatores celulares e alterando sua atividade²⁰.

Além de contribuir na replicação viral, genes do KSHV expressos durante o ciclo lítico também contribuem na patogênese do SK. Assim, além de serem responsáveis pela dispersão do vírus, os produtos codificados nesses genes tem papel relevante no desenvolvimento das lesões características da doença. Dentre as ORFs expressas no ciclo lítico estão a ORF-K2, a ORF-16, a ORF-74, a ORF-K15 e a ORF-K1^{14,20}.

A ORF-K2 codifica a interleucina-6 viral (vIL-6), muito similar a interleucina 6 (IL-6) humana, a qual também tem seus níveis aumentados na infecção do KSHV. A vIL-6 estimula o crescimento celular, a angiogênese e a produção de IL-6¹⁴. A ORF-16 expressa a bcl-2 viral, similar à proteína bcl-2 humana em suas propriedades anti-apoptóticas e anti-autofágicas. Por outro lado, a vbcl-2 difere da homóloga celular por não poder ser inativada via fosforilação por ciclina-cdK6^{21, 22}. A ORF-74 codifica uma proteína viral equivalente a receptores de superfície acoplados à proteína G (*viral G protein-coupled receptor – v-GPCR*). vGPCR tem funções documentadas na transformação celular, progressão e manutenção do SK, inclusive por suas propriedades pró-angiogênicas²³. A ORF-K15 codifica a proteína transmembrana K15, a qual provoca sinais celulares que favorecem inflamação e angiogênese²⁴. A ORF-K1 codifica a proteína K1, que possui importantes atividades imunomodulatórias e transformantes^{25, 26}.

Percebe-se que tanto na fase lítica quanto na latente o KSHV expressa genes que codificam produtos virais que interferem em fenômenos celulares críticos, tais como proliferação celular, apoptose, imunomodulação e angiogênese². Por outro lado, convém destacar que a inibição do ciclo lítico (e.g., por reconstituição da resposta imunitária) pode inibir ou mesmo prevenir o desenvolvimento do SK²⁷. A fase lítica também contribui para infecção latente de novas células do hospedeiro, de modo que se torna importante para a manutenção da neoplasia. Por essa razão, o estudo das propriedades de produtos do KSHV expressos durante o ciclo lítico viral contribui para a elucidação da patogênese do SK. Nesse sentido, especial atenção merece ser dedicada à proteína K1 do KSHV.

3.3 Proteína K1 do KSHV

A ORF-K1 é a primeira sequência aberta de leitura do KSHV. Codifica a proteína K1 e tem localização proximal na porção 5' do genoma viral. K1 é uma glicoproteína de 46 kDa estruturalmente similar ao receptor de células B (*B Cell Receptor* - BCR). Apresenta três domínios principais: o transmembrana, o extracelular e o intracelular, além de uma cauda citoplasmática na região C-terminal. A região citoplasmática contém um imunoreceptor semelhante a um domínio de ativação tirosino-quinase (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif* – ITAM), composto basicamente por dois domínios de ligação homólogos a Src conhecidos como SH2. Esses domínios são importantes para a interação da proteína K1 com receptores e proteínas celulares de vias intracelulares de transdução de sinal²⁸. Em linfócitos B, células endoteliais e epiteliais, a rta do KSHV ativa o promotor da ORF-K1 ligando-se aos seus três sítios RRE nele presentes, dois dos quais são significativamente funcionais²⁹.

Diversas alterações celulares decorrem da expressão de K1. Em células híbridas C57/BL/6J de ratos machos e fêmeas, a expressão de K1 se associa a aumento do

volume citoplasmático e deslocamento do núcleo celular, que se torna excêntrico²⁶. Em linfócitos B K1 ativa vias de sinalização intracelular graças à interação de seu domínio SH2 com a proteína quinase Syk, ocasionando fosforilação desta e deflagrando eventos intracelulares que incluem a fosforilação de fosfolipase C e mobilização de cálcio para o citoplasma. Em última análise, isso proporciona ativação do fator nuclear de células T ativadas (*Nuclear Factor of Activated T cells* – NFAT), importante fator de transcrição para resposta imunitária³⁰.

K1 também interfere na apoptose ao se ligar ao receptor Fas, impedindo sua ligação com o ligante FasL³¹.

A expressão de K1 pode também ocasionar elevação da produção de fatores com atividade parácrina, notadamente o fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF). O VEGF secretado por células endoteliais e epiteliais induz angiogênese e aumento da permeabilidade vascular. Outra proteína cuja produção é aumentada pela K1 é a metaloproteinase-9 (*Matrix Metalloproteinase 9* - MMP-9), que degrada componentes de matriz extracelular. Sugere-se que a atividade de VEGF e MMP-9 induzidas por K1 do KSHV tem importante papel no desenvolvimento e progressão tumorais relacionados à infecção viral³².

Sugere-se que o potencial oncogênico de K1 baseia-se principalmente na interferência em vias de sinalização intracelular. Seu domínio ITAM promove transdução de sinal constante, culminando com a ativação de fatores de transcrição e expressão de diferentes genes, incluindo os codificadores de citocinas. A quinase de proteínas Lyn, o fator nuclear kB (*Nuclear Factor kB* - NF-kB) e o fator de crescimento de fibroblasto (*Fibroblast Growth Factor* – FGF), por exemplo, têm sua produção aumentada na presença de K1. Lyn interage com BCR para ativar a PI-3K, enzima envolvida na prolifera-

ção e diferenciação celular; NF-kB é um importante indutor de genes da resposta imunitária, e FGF estimula o crescimento da célula, proliferação e angiogênese²⁶.

Embora seja predominantemente expressa no ciclo lítico do KSHV, K1 também é detectada em baixos níveis durante o ciclo latente³³. Guilluy e colaboradores demonstraram que K1 atua nessa fase ativando a proteína Rac1, de modo a contribuir para desestabilização de junções celulares e aumento de permeabilidade celular³⁴.

Além dessas propriedades de K1 e seu potencial na carcinogênese, convém ainda destacar que a análise de regiões hipervariáveis (VR1 e VR2) da ORF-K1 do KSHV possibilita classificar os isolados virais em sete grupos genotípicos distintos: A, B e C – mais comuns – e D, E, F e Z – mais raros. A distribuição desses diferentes grupos é influenciada por fatores geográficos e étnicos. Genótipos dos grupos A e C são frequentemente isolados na Europa, Estados Unidos e Ásia, enquanto genótipo B é tipicamente encontrado na África e Guiana Francesa^{35, 36}. Em relação aos genótipos virais mais raros, D é típico das Ilhas do Pacífico³⁶, o genótipo E é caracteristicamente encontrado em ameríndios Sul-americanos³⁷; Z foi encontrado em crianças da Zâmbia³⁸ e F, descrito mais recentemente, foi encontrado em indivíduos infectados pelo KSHV em Uganda³⁹.

Elevada variação na sequência de nucleotídeos da ORF-K1 é notada comparando-se as sequências de DNA da ORF-K1 de isolados virais dos genótipos predominantes A, B e C. A variação de nucleotídeos entre os três grupos é estimada em torno de 1,5%. Variações na cadeia polipeptídica entre os genótipos A e C resultam em 39 aminoácidos diferentes entre as proteínas, cerca de 15% do total de aminoácidos da proteína. Por outro lado, há uma diferença de 85 aminoácidos entre A e B (20%)³⁶.

Tendo em vista a diversidade genética da ORF-K1 do KSHV, é possível que diferentes formas de seu produto apresentem propriedades biológicas peculiares na célu-

la infectada pelo vírus. Entender as diferenças nas alterações celulares propiciadas pelas proteínas K1 dos diferentes genótipos virais pode auxiliar na elucidação do potencial carcinogénico do KSHV, de modo a promover melhor compreensão da patogênese de doenças associadas ao vírus. Esses dados podem, inclusive, auxiliar na elaboração de terapias direcionadas a determinados genótipos virais.

Assim sendo, o presente estudo visou contribuir para o estabelecimento de modelo experimental baseado em vetores de expressão contendo a ORF-K1 dos principais genótipos do KSHV (A, B e C), os quais serão oportunamente empregados na avaliação das propriedades biológicas das diferentes formas da proteína K1 viral.

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

O presente estudo visa contribuir na avaliação da hipótese de que diferentes formas da proteína K1 codificadas pela ORF-K1 dos genótipos A, B e C do KSHV causam efeitos biológicos diferentes na célula em que é expressa.

4.2 Objetivos específicos

1. Produzir vetores de expressão recombinantes contendo a ORF-K1 de genótipos A, B e C do KSHV.
2. Validar os vetores recombinantes produzidos, de modo a se garantir a expressão da proteína K1 do KSHV em células transfectadas.

5 Material e Métodos

5.1 Clonagem da ORF-K1 de genótipos A, B e C do KSHV

Para a produção de vetores recombinantes para expressão de diferentes formas da proteína K1 do KSHV, utilizaram-se sequências da ORF-K1 viral proveniente de linhagens celulares de PEL constitutivamente infectadas pelo vírus (Quadro 1). Essas linhagens foram gentilmente doadas pelo grupo de pesquisa liderado pela Profa. Dra. Ethel Cesarman (*Weill Medical School, Cornell University, NY, USA*).

QUADRO 1- Linhagens celulares de linfoma de efusão primária (PEL) empregadas para obtenção das diferentes formas da ORF-K1 do KSHV.

- **Genótipo A do KSHV:** BCBL-1, BC-1
- **Genótipo B do KSHV:** BC-5, VG-1
- **Genótipo C do KSHV:** BC-3, JSC-1

O Quadro 2 apresenta propriedades de diferentes linhagens de PEL constitutivamente infectadas pelo KSHV descritas na literatura, incluindo linhagens usadas no presente trabalho.

QUADRO 2 - Caracterização de algumas linhagens de PEL constitutivamente infectadas com o KSHV descritas na literatura (adaptado de Hayward e Zong, 2007⁴⁰).

Linhagem	K1	Gb	vIL6	K3	18/19	26E	T0.7	LNA	75E	UPS75	K15	GenbankAcc#
BC-1	A2	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A2	A2	M	M	MX	NC003409 U75698
BC-2	C3	A/C	A/C	A/C	-	J	A/C	A/C	A/C	A/C	P	AF133042
BC-3	C3	A/C	J	K	J/K	J	A/C	-	A/C	-	P	EU327770
BCBL-1	A3	J/K	J	J	A/C	A3	A3	A3	A3	A/C	P	U86667
BCBL-B	A4	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	-	A/C	A/C	P	AF133039
BCBL-R	A1	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	P [A/C]	AF133038
BCP-1	A1	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	-	A/C	A/C	P	AY787132
VG-1	B1	-	B3	B3	-	B2	B3'	B2	A[B]	B3/M	M[B]	n.d.

K1: ORF-K1 ou gene VIP (proteína K1); Gb: ORF-8, codificadora da glicoproteína B; vIL-6: ORF-K2, codificadora de proteína homóloga à interleucina 6 humana (Interleucina 6 viral – vIL-6), K3: ORF-K3; 18/19: ORFs 18/19; 26E: ORF-26E, codificadora de proteína do capsídeo viral; T0.7: região codificadora de transcrito viral de 0.7-kb, LNA: ORF-73, codificadora de LANA-1; 75E: ORF-75E, codificadora de proteína do tegumento; UPS75= ORF-75; K15: ORF-K15 ou gene TMP. P, M e MX: alelo pre-

dominante, alelo minor e alelo exótico da ORF-K15, respectivamente. J e K: subtipos tendo em vista loci da região constante. A/C = genótipos A e C (VIP), que não possuem diferenças em suas seqüências tendo em vista a região genômica indicada. B: genótipo B (VIP).

As variantes da ORF-K1 do KSHV foram obtidas por meio de amplificação empregando reação em cadeia polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) com enzima Taq polimerase de alta fidelidade (*Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Para tanto, foram utilizados iniciadores de PCR desenhados de modo a flanquear todo o gene e incorporar sítios para as enzimas *HindIII* e *BamHI* em suas extremidades 3' e 5', respectivamente. Esses sítios foram utilizados para clonagem de K1 no vetor de expressão comercial p3xFLAG-CMV-10 (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA*). As condições dos experimentos de PCR com esses iniciadores estão indicadas no Quadro 3.

QUADRO 3 - Iniciadores, componentes e condições de termociclagem dos experimentos de PCR para preparação dos vetores recombinantes contendo a ORF-K1 do KSHV.

Alvos e Iniciadores	Componentes da reação	Perfil de termociclagem
ORF-K1 do KSHV	Tampão de PCR 1x (Tris-SO ₄ 60mM pH 8,9/sulfato de amônio 18mM), 2,5mM MgSO ₄ , 0,20mM dNTP, 0,30mM de cada iniciador, 1U DNA polimerase (Taq DNA Polimerase de alta fidelidade ¹).	96°C- 3min (1x); 96°C- 30s, 62°C - 30s, 72°C- 30s (40x); 96°C- 30s; 56°C- 1min; 72°C- 2min (4x)/ 72°C – 5min; 4°C - ∞
<ul style="list-style-type: none"> ▪ KSHVOK1-HindIII.S GCGCGC A↓AGCTT TCTTTCAGACCTGTGGAC ▪ KSHVOK1-BamHI.A GCGCGC G↓GATCC GAATGTCAGTACCAATCCAC 		
MCS² do vetor p3xFLAG-CMV-10	Tampão de PCR 1x (Tris-HCl 100mM pH 8,5/ 500mM KCl), 2,5mM MgCl ₂ , 0,20mM dNTP, 0,30mM de cada iniciador, 1U DNA Polimerase convencional ³ .	95°C – 10min (1x); 94°C – 30s, 57°C - 30s, 72°C – 1min (35x); 72°C – 5min; 4°C - ∞
<ul style="list-style-type: none"> ▪ CMV-30.S AAT GTC GTA ATA ACC CCG CCC CGT TAG CGC ▪ CMV-24.A TAT TAG GAC AAG GCT GGT GGG CAC 		

¹PlatinumTaq High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, IL, USA) ² Cassete de clonagem (*Multiple Cloning Site*) ³EasyTaq DNA polymerase (LGC Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil). As seqüências AAGCTT e GGATCC em caixa são sítios de restrição das enzimas *HindIII* e *BamHI*, respectivamente, utilizadas para clonagem direcional de ORF-K1. Em negrito, destacam-se segmentos de seqüências dos iniciadores complementares a segmentos conservados de ORF-K1 viral.

Os amplicons gerados foram purificados utilizando o sistema comercial *GFXTM PCR DNA and gel band Purification (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)*, segundo instruções do fabricante. Uma vez efetuada a purificação dos produtos de PCR, tanto os

amplicons de K1 (insertos) quanto o vetor p3xFLAG-CMV-10 foram digeridos pelas enzimas de restrição *HindIII* (*Promega, Madison, WI, USA*) e *BamHI* (*New England Biolabs, Ipswich, MA, USA*) de modo a formar sítios de ligação complementares entre inserto e vetor. Para prevenir a recircularização do vetor, foi realizada desfosforilação com a enzima fosfatase antártica (*New England Biolabs, Ipswich, MA, USA*). As condições dos experimentos de digestão enzimática estão descritas no Quadro 4.

Em seguida realizou-se ligação entre vetor e inserto empregando a enzima T4 DNA ligase (*New England Biolabs, Ipswich, MA, USA*), conforme condições no Quadro 4. A fim de confirmar a formação dos vetores recombinantes pela ligação do vetor e inserto, realizou-se PCR com os iniciadores CMV-30.S e CMV-24.A, que se ligam aos sítios que flanqueiam a região do cassete de clonagem (*Multiple Cloning Site – MCS*) do vetor. As condições dos experimentos de PCR, bem como as sequências dos iniciadores foram indicadas no Quadro 3.

QUADRO 4 - Condições experimentais enzimáticas para a preparação do vetor p3xFLAG-CMV-10 e dos insertos de ORF-K1 para os procedimentos de clonagem.

Propósito do experimento	Componentes da reação	Condições da reação
Digestão com <i>HindIII</i>	Tampão NEB2 ¹ 1x (5mM de NaCl; 1mM de Tris; 1mM MgCl ₂ ; 0,1 mM ditioneitol pH 7,9), 3,5 µg BSA ² , 20U de enzima e 2,5 µg de DNA do vetor ou inserto.	Incubação 37°C-3h. Inativação 65°C-20min
Digestão com <i>BamHI</i>	Tampão NEB2 ¹ 1x (5mM de NaCl; 1mM de Tris; 1mM MgCl ₂ ; 0,1 mM ditioneitol pH 7,9), 3,5 µg BSA ² , 20U de enzima e 2,5 µg de DNA do vetor ou inserto.	Incubação 37°C-3h
Desfosforilação do vetor com enzima fosfatase antártica.	Tampão da enzima 1x (50 mM Bis-Tris-propano-HCl; 1mM MgCl ₂ ; 0,1 mM ZnCl ₂ ; pH 6,0), 5U da enzima e 1,20µg de DNA do vetor.	Incubação 37°C - 15min; inativação 65°C - 5 min
Ligação entre vetor e inserto com enzima T4 DNA ligase	Tampão 1x (50mM de Tris-HCl; 10mM MgCl ₂ ; 1mM de ATP, 10 mM ditioneitol pH 7,5), 1000U da enzima, vetor com concentração fixa de 50ng e inserto em proporções crescentes em relação ao vetor (razões vetor: inserto 1:0, 1:1, 1:2 e 1:3).	Incubação 16°C - 2h

¹New England Biolabs (*Ipswich, MA, USA*), ² BSA - albumina sérica bovina (*Bovine seric albumine*).

Os vetores recombinantes pKSHVOK1 (produzidos a partir da inserção da ORF-K1 do KSHV em p3xFLAG-CMV-10) foram empregados na transformação de cepas de

bactérias *E. Coli* DH5 α Max Efficiency® Competent Cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As bactérias foram cultivadas em placas contendo LB (Lúria-Bertani)-Ágar com ampicilina como antibiótico seletivo (100 μ g/mL), mantidas em estufa microbiológica a 37°C, por 24h. Após esse período, algumas colônias bacterianas isoladas que cresceram foram selecionadas para crescimento em meio líquido LB, contendo ampicilina (100 μ g/mL) por cerca de 16h a 37°C e sob agitação (300 rpm). Os vetores recombinantes pKSHVOK1 gerados foram então submetidos à validação, conforme detalhado à seguir.

5.2 Validação dos vetores recombinantes para ORF-K1 do KSHV

O DNA plasmidial correspondente aos vetores recombinantes foi extraído empregando o sistema comercial *Pure Link™ Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A fim de validar as sequências da ORF-K1 nos vetores, diferentes clones foram arbitrariamente selecionados e submetidos a sequenciamento automatizado de DNA em equipamento *ABI 3730 DNA Analyzer* empregando insumos *Big Dye® terminator v3.1 Cycle sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em serviço terceirizado (Centro de Estudos do Genoma Humano, São Paulo, SP, Brasil). As sequências obtidas foram comparadas com sequências-protótipo da ORF-K1 depositadas no banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*) (Quadro 5).

QUADRO 5 - Listagem dos códigos de acesso* das sequências-protótipo utilizadas na análise filogenética e as respectivas linhagens celulares da qual foram provenientes.

Linagem	Cód. Acesso *	Descrição original da sequência
BCBL-R	AF133038.1	<i>KSHV strain BCBL-R transforming membrane receptor-like protein (K1-A1) gene, complete cds.</i>
US3/ts55	AF151688.1	<i>KSHV strain US3/ts55 K1 glycoprotein (K1-IA) gene, partial cds.</i>
BCBL-B	AF133039.1	<i>KSHV strain BCBL-B transforming membrane receptor-like protein (K1-A4) gene, complete cds.</i>
BCP-1	AY787132.1	<i>HHV-8 K1 glycoprotein gene, partial cds</i>
BC-1	NC_003409.1	<i>HHV-8 type M, complete genome</i>
BCBL-1	U86667.1	<i>KSHV ORF K1 gene, complete cds and unique region left end sequence.</i>
Ug3/ug13	AF151690.1	<i>KSHV strain Ug3/ug13 K1 glycoprotein (K1-IF) gene, partial cds.</i>
Ug374	AF130289.1	<i>KSHV isolate Ug374 K1 glycoprotein (K1) gene, partial cds</i>
ASM72	AF133041.1	<i>KSHV strain ASM72 transforming membrane receptor-like protein (K1-C1) gene, complete cds.</i>
BBG-1	AF042370.1	<i>KSHV K1 gene, complete cds</i>
BC-2	AF133042.1	<i>KSHV strain BC-2 transforming membrane receptor-like protein (K1-C3) gene, complete cds.</i>
GK18	NC_009333	<i>HHV-8, complete genome.</i>
US6/CK27	AF151686.1	<i>KSHV strain US6/CK27 K1 glycoprotein (K1-II) gene, partial cds.</i>
BC-3	EU327770.1	<i>HHV-8 isolate BC3 K1 glycoprotein gene, partial cds</i>
431KAP	AF133040.1	<i>KSHV strain 431KAP transforming membrane receptor-like protein (K1-B) gene, complete cds.</i>
Ug1/ug8	AF151689.1	<i>KSHV strain Ug1/ug8 K1 glycoprotein (K1-IV) gene, partial cds.</i>
Tupi-1	AF220292.1	<i>KSHV isolate Tupi-1 K1 protein (K1) gene, partial cds</i>
Tupi-2	AF220293.1	<i>KSHV isolate Tupi-2 K1 protein (K1) gene, partial cds.</i>
Au1/407p	AF151687.1	<i>KSHV strain Au1/407p K1 glycoprotein (K1-III) gene, partial cds.</i>
TKS10	AF133043.1	<i>KSHV strain TKS10 transforming membrane receptor-like protein (K1-D1) gene, complete cds.</i>
ZKS3	AF133044.1	<i>KSHV strain ZKS3 transforming membrane receptor-like protein (K1-D2) gene, complete cds</i>
JSC-1	GQ994935.1	<i>HHV-8 strain JSC-1 clone BAC16, complete genome</i>
BC-3	AF170531.1	<i>KSHV K1 glycoprotein gene, complete cds</i>

*Código de identificação único da sequência na base do GenBank, NCBI – USA.

Clones estruturalmente validados de vetores recombinantes pKSHVOK1 foram então transfectados em células HEK293 para análise de expressão de K1. As células foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle medium* - DEMEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum* - FBS) e 0,4% de gentamicina e incubadas à 37°C em ambiente com 5% de CO₂. Inicialmente a transfecção foi realizada empregando-se o carreador lipídico *Effectene® Transfection Reagent* (Qiagen, Valencia, CA, USA). Em um segundo momento realizou-se também transfecção por eletroporação com equipamento *Neon Transfection System* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

As células transientemente transfectadas foram submetidas à extração de proteínas totais para análise de expressão de K1 por *Western blot* (WB), utilizando anticorpo primário anti-FLAG produzido em camundongo (*ANTI-FLAG® M2 Monoclonal Antibody*;

Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e anticorpo secundário antifrimento Fab2 de IgG de camundongo conjugada a peroxidase e produzida em carneiro (*ECL anti-mouse IgG, peroxidase-linked species specific F (ab') 2 fragment (from sheep), GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK*). A incubação do anticorpo primário anti-FLAG foi feita na diluição 1:5000, *overnight*. Já o secundário anti-mouse foi incubado subsequentemente, na diluição 1:4000, por 4 horas.

6 Resultados

Primeiramente, realizou-se amplificação por PCR convencional da ORF-K1 do KHSV de duas linhagens celulares de PEL pertencentes a diferentes genótipos virais. Os iniciadores e as condições utilizados nesse procedimento foram os descritos no Quadro 3.

A fim de padronizar os experimentos seguintes e se obter DNA suficiente para as próximas etapas, apenas amostras de DNA identificadas como provenientes de linhagens celulares BCP-1 e BC-2 (genótipos A e C do KSHV, respectivamente) foram selecionadas para amplificação. Foi efetuada uma PCR para amplificar a ORF-K1 dessas linhagens, de modo a produzir quantidade de amplicons de K1 suficiente para serem preparados como insertos para ligação ao vetor p3xFLAG-CMV-10. A Figura 1A mostra sucesso na amplificação de ORF-K1, a qual gera um amplicon de tamanho aproximado de 900 pb.

Em seguida foi realizada a digestão enzimática do vetor p3xFLAG-CMV-10 e da ORF-K1 obtida das linhagens BCP-1 e BC-2 com as enzimas *HindIII* e *BamHI*, cujas condições foram explicitadas no Quadro 4. Na Figura 1B, o sucesso na digestão enzimática pode ser notado pela discreta diminuição do número de pares de base do vetor (cerca de 50 pb), correspondentes a distância entre os sítios de ligação de *HindIII* e *BamHI*. Nesse experimento não é possível notar diminuição no número de pares de

base do inserto, que permanece com aproximadamente 900 pb. Os insertos produzidos pela digestão foram denominados KSHVOK1-1 e KSHVOK1-2 (para ORF-K1 de BCP-1 e BC-2, respectivamente), sendo seus respectivos vetores recombinantes nomeados pKSHVOK1-1 e pKSHVOK1-2.

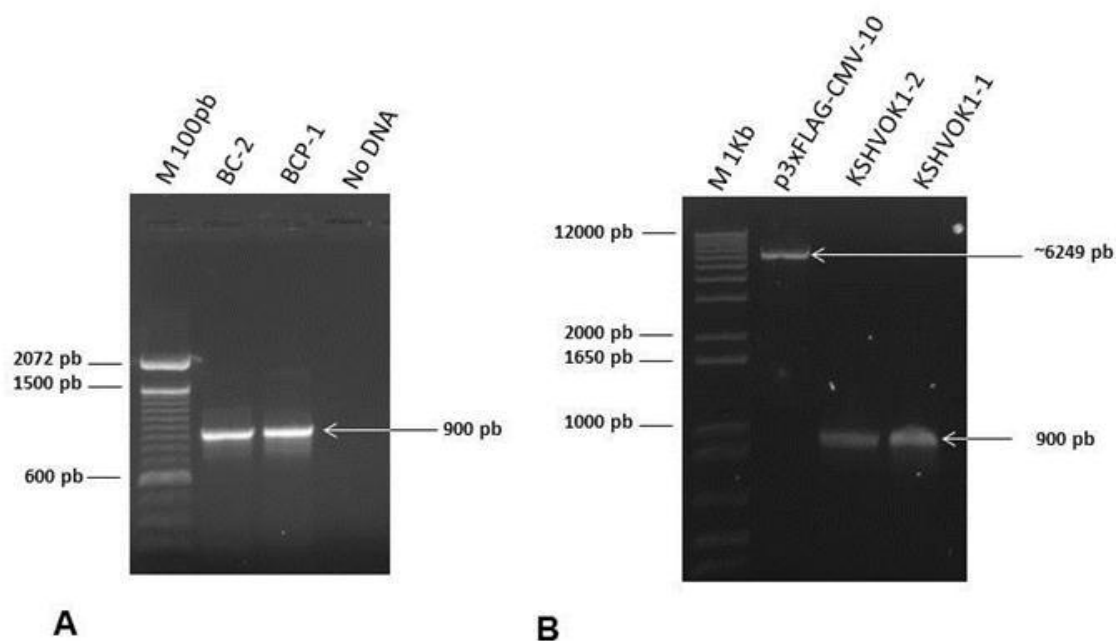


FIGURA 1 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. (A) Amplificação do DNA das linhagens celulares KSHV-positivas identificadas como BC-2 e BCP-1, utilizando os iniciadores KSHVOK1.HindIII.S e KSHVOK1.BamHI.A. A seta indica a banda de tamanho aproximado do amplicon de ORF-K1 (~900pb); No DNA - controle negativo de amplificação (sem DNA). Marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). (B) Resultado de digestão enzimática do vetor p3xFLAG-CMV-10 e insertos de ORF-K1 de BC-2 (KSHVOK1-2) e de BCP-1 (KSHVOK1-1) com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III. Após a digestão, o vetor passa a apresentar 6249pb. Insertos se mantêm com aproximadamente 900 pb. Marcador de peso molecular de 1 Kb (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*).

Para se evitar a recircularização do vetor p3xFLAG-CMV-10 digerido, foi efetuada sua desfosforilação empregando a enzima fosfatase antártica (*New England Biolabs, Ipswich, MA, USA*). As condições de desfosforilação e de ligação entre vetor e inserto foram descritas no Quadro 4 (vide “Material e Métodos”).

O sucesso da reação de ligação foi verificado por PCR convencional com os iniciadores CMV-30.S e CMV-24.A, que flanqueiam a região do MCS do vetor p3xFLAG-

CMV-10. Essa reação gera amplicon com 317 pb e aproximadamente 1167 pb nos vetores original e recombinantes, respectivamente. A digestão com *Bam*HI e *Hind*III retira 50 pb do vetor, correspondente ao segmento no MCS entre os sítios de ligação das enzimas. A ligação do inserto acrescenta ao vetor original cerca de 900 pb, correspondentes ao tamanho da ORF-K1 (varia de acordo com o genótipo do KSHV). Assim, o tamanho esperado do amplicon em caso de sucesso de ligação é de aproximadamente 1167 pb (ie., $317-50+900 = 1167$).

A Figura 2 demonstra o sucesso no experimento de ligação, de modo que foram obtidos os vetores recombinantes pKSHVOK1-1 e pKSHVOK1-2. Na Figura 3 está apresentado um mapa esquemático do vetor recombinante gerado.

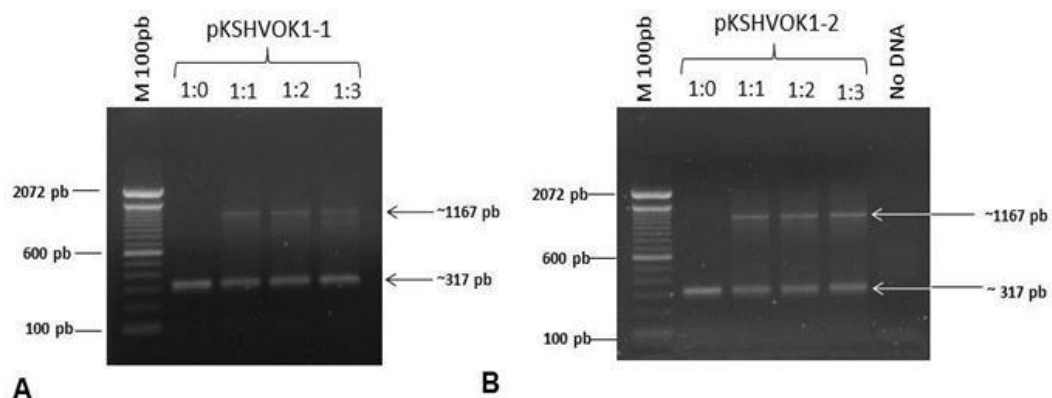


FIGURA 2 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Marcador de peso molecular de 100pb (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). O resultado apresenta produto de PCR amplificado com iniciadores CMV-30.S e CMV-24.A. Amplicon de 1167 pb evidencia que houve ligação adequada entre inserto e vetor; já a banda de 317 pb representa amplificação de resíduo de vetores vazios não digeridos. No DNA – controle negativo de amplificação (sem DNA). Para ambos os insertos KSHVOK1-1 (**A**) e KSHVOK1-2 (**B**) foram utilizadas diferentes proporções em massa de ligação entre vetor e inserto, sendo essas 1:0 (sem inserto), 1:1, 1:2 e 1:3, com quantidade de inserto proporcionalmente crescente em relação à quantidade de vetor.

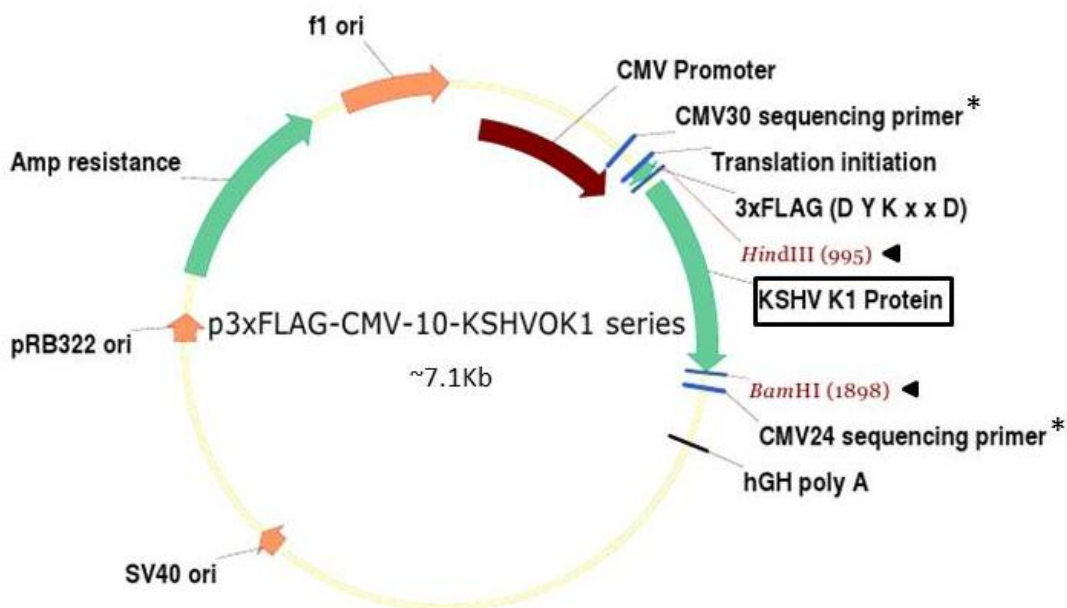


FIGURA 3 - Representação esquemática do vetor recombinante geral pKSHVOK1, contendo a ORF-K1 do KSHV. Os sítios de ligação para *HindIII* e *BamHI* (cabeças-de-seta) foram utilizados para clonagem. São também indicados os sítios de ligação dos iniciadores CMV-30.S e CMV-24.A (*), empregados para validação dos vetores recombinantes gerados.

Os vetores recombinantes pKSHVOK1-1 e pKSHVOK1-2 foram então usados para transformação de bactérias *E. Coli* cepa DH5 α Max Efficiency[®] Competent Cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As bactérias transformadas foram cultivadas em placas LB-ágar por 24 h a 37°C. As reações de ligação usadas na transformação foram as de proporção 1:0 (controle negativo, sem inserto) e 1:2 (50ng de vetor para 100 ng de inserto). Após crescimento, algumas colônias isoladas foram selecionadas e amostras dessas foram aplicadas diretamente em uma PCR de colônia (*Colony PCR*) empregando-se novamente os iniciadores CMV-30.S e CMV-24.A (condições descritas no Quadro 3).

O resultado na Figura 4 evidencia sucesso na reação de ligação, bem como na transformação bacteriana em colônias, onde apareceram bandas de 1167 pb, correspondentes a região intercalar dos sítios dos iniciadores onde foi ligado o inserto KSHVOK1.

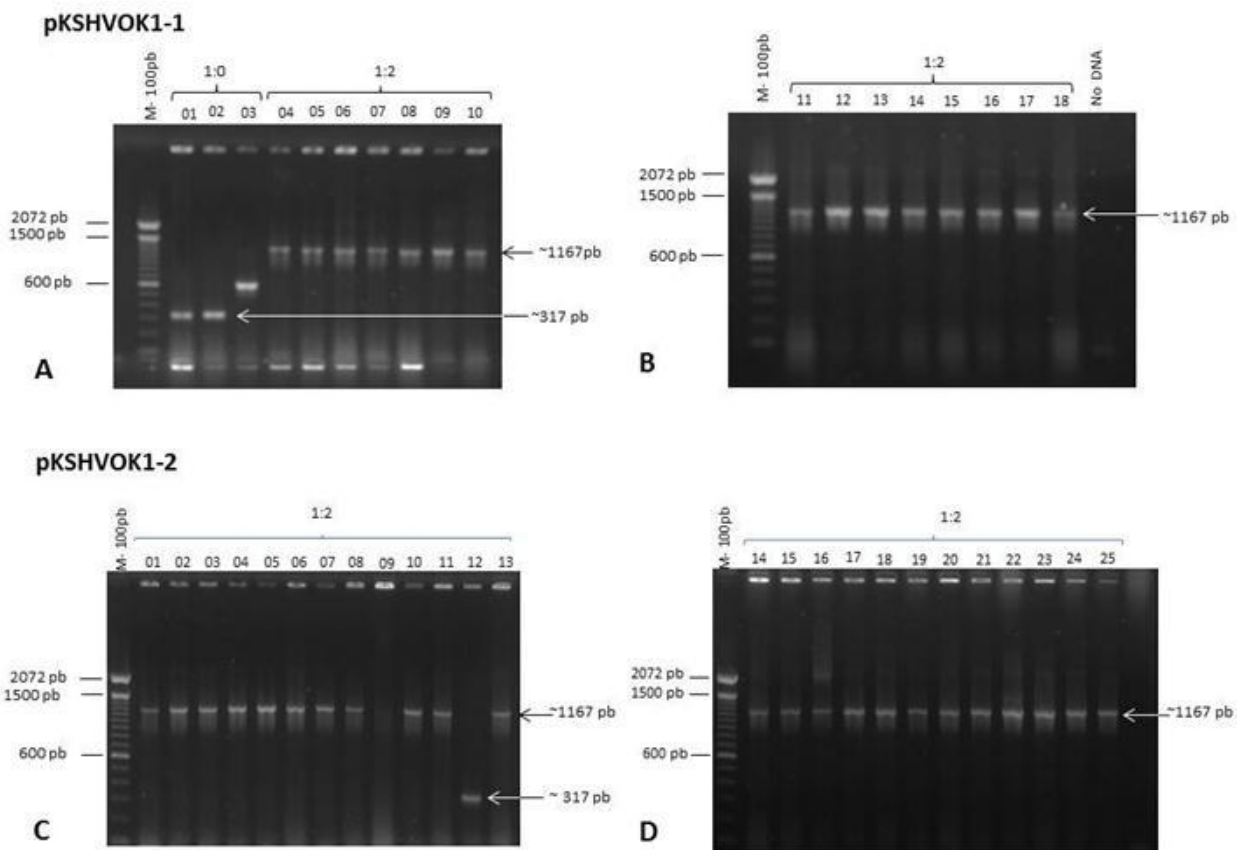


FIGURA 4 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Marcador de peso molecular de 100pb (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Na figura o resultado da *colony* PCR com os iniciadores CMV-30.S e CMV-24.A para os clones dos vetores pKSHVOK1-1 (**A** e **B**) e pKSHVOK1-2 (**C** e **D**), após transformação de bactérias competentes *E. coli DH5 α* . O número correspondente à colônia selecionada na placa de LB-Ágar está indicado no topo, bem como a proporção correspondente a massa de vetor e inserto: 1:0 (sem inserto) e 1:2. O amplicon de 1167 pb representa a região do cassete de clonagem do vetor com inserto inserido; o de 317 pb corresponde à região da sequência intercalar entre os iniciadores no vetor original, não ligado. Em pKSHVOK1-2 (**C** e **D**) a proporção 1:0 não está representada pois não houve crescimento de colônias na placa.

Depois de se confirmar a transformação bacteriana com os vetores recombinantes, optou-se por crescer seis colônias arbitrariamente selecionadas de cada vetor em meio líquido LB contendo ampicilina (100 μ g/mL). Foram selecionadas as colônias 04, 05, 11, 12, 16 e 17 de pKSHVOK1-1, e 01, 02, 06, 07, 15 e 16 de pKSHVOK1-2. Após crescimento e purificação do DNA plasmidial, três clones do vetor pKSHVOK1-1 (04, 05 e 11) e três do pKSHVOK1-2 (01, 02 e 06) foram submetidos a sequenciamento auto-

matizado de DNA para se validar a fidedignidade de suas sequências. Com as sequências obtidas, foram geradas sequências consenso para ORF-K1 dos vetores recombinantes pKSHVOK1-1.04, pKSHVOK1-1.05 e pKSHVOK1-1.11; e pKSHVOK1-2.01, pKSHVOK1-2.02 e pKSHVOK1-2.06 utilizando o programa *AlignX* do *Vector NTI Advance 11* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Figura 5).

As sequências consenso foram avaliadas com a Ferramenta de Pesquisa Básica de Alinhamento Local (*Basic Local Alignment Search Tool – BLAST*) do Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*), disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Constatou-se que as sequências consenso dos vetores recombinantes pKSHVOK1-1 e pKSHVOK1-2 produzidos foram equivalentes à ORF-K1 do KSHV de sequências-protótipo depositadas no *NCBI* (Figuras 6 e 7). Contudo, a análise revelou divergência de genótipos da ORF-K1 entre os vetores pKSHVOK1-1 e pKSHVOK1-2 em relação às linhagens das quais supostamente foram provenientes (BCP-1 e BC-2, respectivamente).

A sequência de ORF-K1 viral de pKSHVOK1-1, supostamente originada de DNA da linhagem celular BCP-1, apresentou alto grau de similaridade com a ORF-K1 de BCBL-1 (*GenBank Acession# U86667.1 – “Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus ORF-K1 gene, complete CDs and unique region left end sequence”*). Já ORF-K1 do vetor pKSHVOK1-2 de BC-2 foi similar a ORF-K1 da linhagem celular BC-1 (*GenBank Acession# U75698.1 – “Human herpesvirus 8 type M, partial genome.”*). Assim sendo, embora se esperasse inicialmente que os clones produzidos fossem de genótipos A (BCP-1) e C (BC-2), em verdade foram obtidos dois vetores recombinantes pKSHVOK1 com ORF-K1 de genótipo A (equivalentes à ORF-K1 do KSHV de BCBL-1 e BC-1).

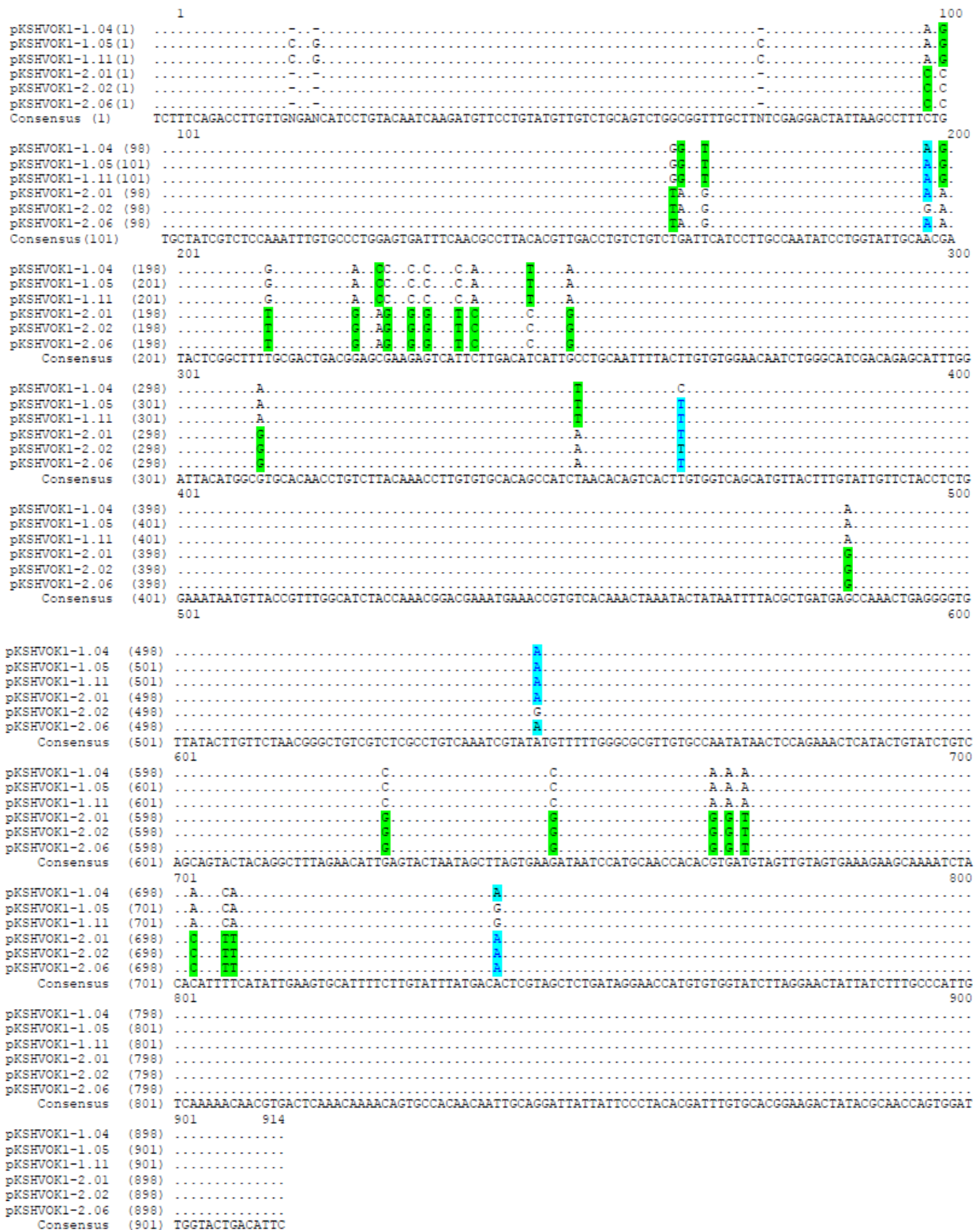


FIGURA 5 - Alinhamento das sequências consenso da ORF-K1 do KSHV dos diferentes clones dos vetores recombinantes pKSHVOK1-1 e pKSHVOK1-2.

pKSHVOK1-1.04

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ404500.1	Human herpesvirus 8 strain KSHV-BAC36 long unique region, g	1677	1677	100%	0.0	99%
U86667.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF K1 gene, comple	1670	1670	100%	0.0	99%
AF178799.1	Human herpesvirus 8 clone K1-32/Bcb K1 protein (K1) gene, c	1602	1602	95%	0.0	99%
AY204658.1	Human herpesvirus 8 isolate K1/E43 K1 glycoprotein gene, con	1596	1596	95%	0.0	99%
AY204662.1	Human herpesvirus 8 isolate K1/E36 K1 glycoprotein gene, par	1594	1594	95%	0.0	99%
FJ884623.1	Human herpesvirus 8 isolate UG-124 K1 glycoprotein gene, cor	1548	1548	99%	0.0	97%
FJ884613.1	Human herpesvirus 8 isolate IT-176 K1 glycoprotein gene, con	1543	1543	99%	0.0	97%
FJ884608.1	Human herpesvirus 8 isolate GR-77 K1 glycoprotein gene, com	1543	1543	99%	0.0	97%
FJ884624.1	Human herpesvirus 8 isolate UG-208 K1 glycoprotein gene, cor	1537	1537	99%	0.0	97%
FJ884607.1	Human herpesvirus 8 isolate CM-90 K1 glycoprotein gene, com	1537	1537	99%	0.0	97%

pKSHVOK1-1.05

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ404500.1	Human herpesvirus 8 strain KSHV-BAC36 long unique region, g	1663	1663	100%	0.0	99%
U86667.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF K1 gene, comple	1657	1657	100%	0.0	99%
AF178799.1	Human herpesvirus 8 clone K1-32/Bcb K1 protein (K1) gene, c	1596	1596	95%	0.0	99%
AY204662.1	Human herpesvirus 8 isolate K1/E36 K1 glycoprotein gene, par	1591	1591	95%	0.0	99%
AY204658.1	Human herpesvirus 8 isolate K1/E43 K1 glycoprotein gene, con	1591	1591	95%	0.0	99%
FJ884623.1	Human herpesvirus 8 isolate UG-124 K1 glycoprotein gene, cor	1533	1533	99%	0.0	97%
FJ884613.1	Human herpesvirus 8 isolate IT-176 K1 glycoprotein gene, con	1528	1528	99%	0.0	97%
FJ884608.1	Human herpesvirus 8 isolate GR-77 K1 glycoprotein gene, com	1528	1528	99%	0.0	97%
FJ884624.1	Human herpesvirus 8 isolate UG-208 K1 glycoprotein gene, cor	1522	1522	99%	0.0	97%
FJ884607.1	Human herpesvirus 8 isolate CM-90 K1 glycoprotein gene, com	1522	1522	99%	0.0	97%

pKSHVOK1-1.11

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ404500.1	Human herpesvirus 8 strain KSHV-BAC36 long unique region, g	1663	1663	100%	0.0	99%
U86667.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF K1 gene, comple	1657	1657	100%	0.0	99%
AF178799.1	Human herpesvirus 8 clone K1-32/Bcb K1 protein (K1) gene, c	1596	1596	95%	0.0	99%
AY204662.1	Human herpesvirus 8 isolate K1/E36 K1 glycoprotein gene, par	1591	1591	95%	0.0	99%
AY204658.1	Human herpesvirus 8 isolate K1/E43 K1 glycoprotein gene, con	1591	1591	95%	0.0	99%
FJ884623.1	Human herpesvirus 8 isolate UG-124 K1 glycoprotein gene, cor	1533	1533	99%	0.0	97%
FJ884613.1	Human herpesvirus 8 isolate IT-176 K1 glycoprotein gene, con	1528	1528	99%	0.0	97%
FJ884608.1	Human herpesvirus 8 isolate GR-77 K1 glycoprotein gene, com	1528	1528	99%	0.0	97%
FJ884624.1	Human herpesvirus 8 isolate UG-208 K1 glycoprotein gene, cor	1522	1522	99%	0.0	97%
FJ884607.1	Human herpesvirus 8 isolate CM-90 K1 glycoprotein gene, com	1522	1522	99%	0.0	97%

FIGURA 6 - Alinhamento das sequências consenso de ORF-K1 do KSHV obtidas de clones do vetor recombinante pKSHVOK1-1 com sequências-protótipo depositadas no *NCBI*, encontradas através da ferramenta BLAST. Para cada clone foram selecionadas as dez primeiras sequências encontradas no banco de dados que apresentam maior cobertura em relação à sequência consultada (destaque em verde) e maior identidade máxima (destaque em vermelho).

pKSHVOK1-2.01

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
U75698.1	Human herpesvirus 8 type M, partial genome	<u>1683</u>	1683	100%	0.0	100%
FJ884626.1	Human herpesvirus 8 isolate US-216 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1609</u>	1609	99%	0.0	99%
FJ884612.1	Human herpesvirus 8 isolate IT-170 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1604</u>	1604	99%	0.0	99%
FJ884615.1	Human herpesvirus 8 isolate IT-E40 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1598</u>	1598	99%	0.0	98%
AF133038.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain BCBL-R transfectant	<u>1594</u>	1594	100%	0.0	98%
AF178807.1	Human herpesvirus 8 clone K1-40/Bc1 K1 protein (K1) gene, complete cds	<u>1591</u>	1591	95%	0.0	99%
AY204645.1	Human herpesvirus 8 isolate K1/E5 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1568</u>	1568	95%	0.0	99%
FJ884608.1	Human herpesvirus 8 isolate GR-77 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1565</u>	1565	99%	0.0	98%
AY204660.1	Human herpesvirus 8 isolate K1/E17 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1563</u>	1563	95%	0.0	99%
AF130305.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate Ema7 K1 glycoprotein	<u>1546</u>	1546	95%	0.0	99%

pKSHVOK1-2.02

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
U75698.1	Human herpesvirus 8 type M, partial genome	<u>1672</u>	1672	100%	0.0	99%
FJ884626.1	Human herpesvirus 8 isolate US-216 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1598</u>	1598	99%	0.0	98%
FJ884612.1	Human herpesvirus 8 isolate IT-170 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1592</u>	1592	99%	0.0	98%
FJ884615.1	Human herpesvirus 8 isolate IT-E40 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1587</u>	1587	99%	0.0	98%
AF133038.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain BCBL-R transfectant	<u>1583</u>	1583	100%	0.0	98%
AF178807.1	Human herpesvirus 8 clone K1-40/Bc1 K1 protein (K1) gene, complete cds	<u>1580</u>	1580	95%	0.0	99%
AY204645.1	Human herpesvirus 8 isolate K1/E5 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1557</u>	1557	95%	0.0	99%
FJ884608.1	Human herpesvirus 8 isolate GR-77 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1554</u>	1554	99%	0.0	98%
AY204660.1	Human herpesvirus 8 isolate K1/E17 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1552</u>	1552	95%	0.0	99%
AF130305.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate Ema7 K1 glycoprotein	<u>1535</u>	1535	95%	0.0	99%

pKSHVOK1-2.06

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
U75698.1	Human herpesvirus 8 type M, partial genome	<u>1683</u>	1683	100%	0.0	100%
FJ884626.1	Human herpesvirus 8 isolate US-216 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1609</u>	1609	99%	0.0	99%
FJ884612.1	Human herpesvirus 8 isolate IT-170 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1604</u>	1604	99%	0.0	99%
FJ884615.1	Human herpesvirus 8 isolate IT-E40 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1598</u>	1598	99%	0.0	98%
AF133038.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain BCBL-R transfectant	<u>1594</u>	1594	100%	0.0	98%
AF178807.1	Human herpesvirus 8 clone K1-40/Bc1 K1 protein (K1) gene, complete cds	<u>1591</u>	1591	95%	0.0	99%
AY204645.1	Human herpesvirus 8 isolate K1/E5 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1568</u>	1568	95%	0.0	99%
FJ884608.1	Human herpesvirus 8 isolate GR-77 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1565</u>	1565	99%	0.0	98%
AY204660.1	Human herpesvirus 8 isolate K1/E17 K1 glycoprotein gene, complete cds	<u>1563</u>	1563	95%	0.0	99%
AF130305.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate Ema7 K1 glycoprotein	<u>1546</u>	1546	95%	0.0	99%

FIGURA 7 - Alinhamento das sequências consenso de ORF-K1 do KSHV obtidas de clones do vetor recombinante pKSHVOK1-2 com sequências-protótipo depositadas no *NCBI*, encontradas através da ferramenta BLAST. Para cada clone foram selecionadas as dez primeiras sequências encontradas no banco de dados que apresentam maior cobertura em relação à sequência consultada (destaque em verde) e maior identidade máxima (destaque em vermelho).

Após a correta identificação dos vetores recombinantes pKSHVOK1-1 e pKSHVOK1-2, seguiu-se com a transfecção desses vetores em células HEK293. Os clones escolhidos para transfecção foram o pKSHVOK1-1.11 e pKSHVOK1-2.06, que apre-

sentavam a sequência mais fidedigna da ORF-K1 de acordo com os resultados de sequenciamento. Foram também transfectados o vetor p3xFLAG-CMV-10 (controle negativo; vetor original, sem proteína ligada ao FLAG) e p3xFLAG-BAP (controle positivo de FLAG, pois apresenta proteína fosfatase alcalina bacteriana (*bacterial alkaline fosfatase* – BAP) ligada a FLAG, com tamanho de 45-55 kDa).

A expressão proteica de K1 foi detectada por meio de técnica de WB com anti-corpo primário anti-FLAG diluído 1:5000, incubado *overnight*, e secundário anti-mouse 1:4000, incubado por 4h. Os resultados demonstram expressão de proteína K1 fusio-nada ao epítipo FLAG no tamanho esperado (50kDa)(Figura 8).

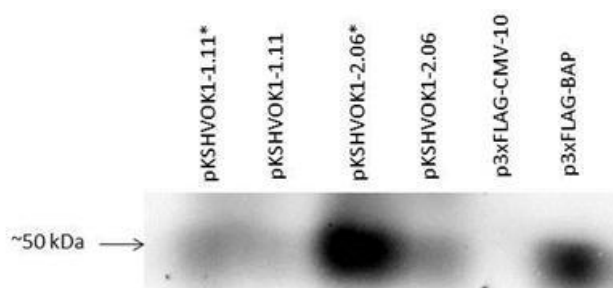


FIGURA 8 - Detecção da expressão de KSHV K1 acoplada ao epítipo FLAG em membranas de fluoreto de polivinilideno (*polyvinylidene fluoride* – PVDF) (Millipore, Billerica, MA, USA) com 50 µg de proteínas totais. As proteínas foram extraídas de células HEK293 cultivadas *in vitro* e transientemente transfectadas com os vetores pKSHVOK1-1.11, pKSHVOK1-2.06, p3xFLAG-CMV-10 e p3xFLAG-BAP. A proteína K1 acoplada a FLAG tem tamanho aproximado de 49,3kDa. Proteína BAP ligada a FLAG é controle positivo para FLAG, com tamanho variável entre 45-55kDa. Ambos tem expressão comprovada por banda de aproximadamente 50kDa.

Após validação de vetores recombinantes com ORF-K1 de genótipo A do KSHV, deu-se início a produção dos vetores de ORF-K1 de genótipos B e C. Para tanto, foram utilizadas as linhagens celulares BC-5 e VG-1 do genótipo B, e BC-3 e JSC-1 do genótipo C. A amplificação da região de ORF-K1 do KSHV no DNA proveniente dessas linhagens foi realizada conforme condições apresentadas no Quadro 3.

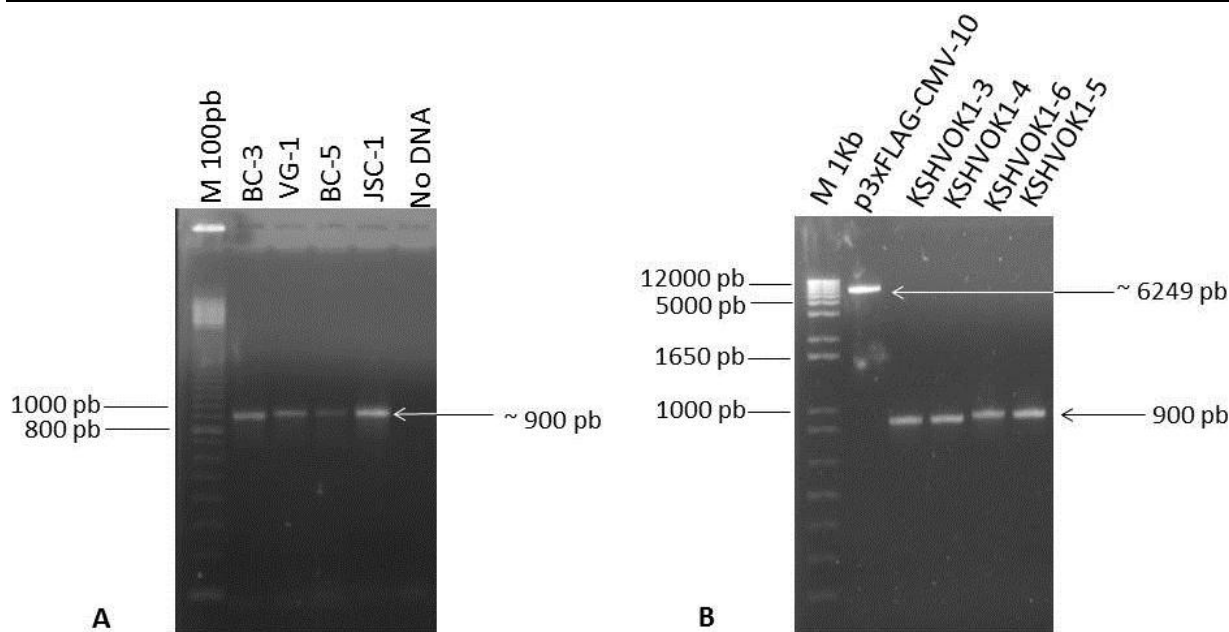


FIGURA 9 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. **(A)** Amplificação do DNA das linhagens celulares KSHV-positivas identificadas como BC-3, VG-1, BC-5 e JSC-1. A seta indica a banda de tamanho aproximado do amplicon de ORF-K1 (~900pb); No DNA - controle negativo de amplificação (sem DNA). Marcador de peso molecular de 100 pb (*Amersham, Buckinghamshire, UK*). **(B)** Resultado de digestão enzimática do vetor p3xFLAG-CMV-10 e insertos de ORF-K1 de BC-3 (KSHVOK1-3), JSC-1 (KSHVOK1-4), VG-1 (KSHVOK1-6) e BC-5 (KSHVOK1-5) com enzimas *Bam*HI e *Hind*III. Após a digestão, o vetor passa a apresentar 6249pb e insertos aproximadamente 900 pb. Marcador de peso molecular 1 Kb (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*).

O resultado na Figura 9A indica amplicons com o tamanho esperado, que foram purificados e digeridos com as enzimas *Hind*III e *Bam*HI, tal qual realizado para p3xFLAG-CMV-10 (Figura 9B). Após a digestão, obtiveram-se os insertos de ORF-K1 denominados KSHVOK1-3 (ORF-K1 de BC-3), KSHVOK1-4 (ORF-K1 de JSC-1), KSHVOK1-5 (ORF-K1 de BC-5) e KSHVOK1-6 (ORF-K1 de VG-1). Subsequentemente foi efetuada desfosforilação do vetor e reação de ligação, conforme previamente detalhado (Quadro 4). A Figura 10 revela o resultado da reação de ligação. A seguir, os vetores recombinantes foram utilizados para transformação de bactérias *E. Coli* cepa DH5 α , tendo sido utilizadas as ligações de proporção em massa 1:2 (50 ng de vetor para 100 ng de inserto).

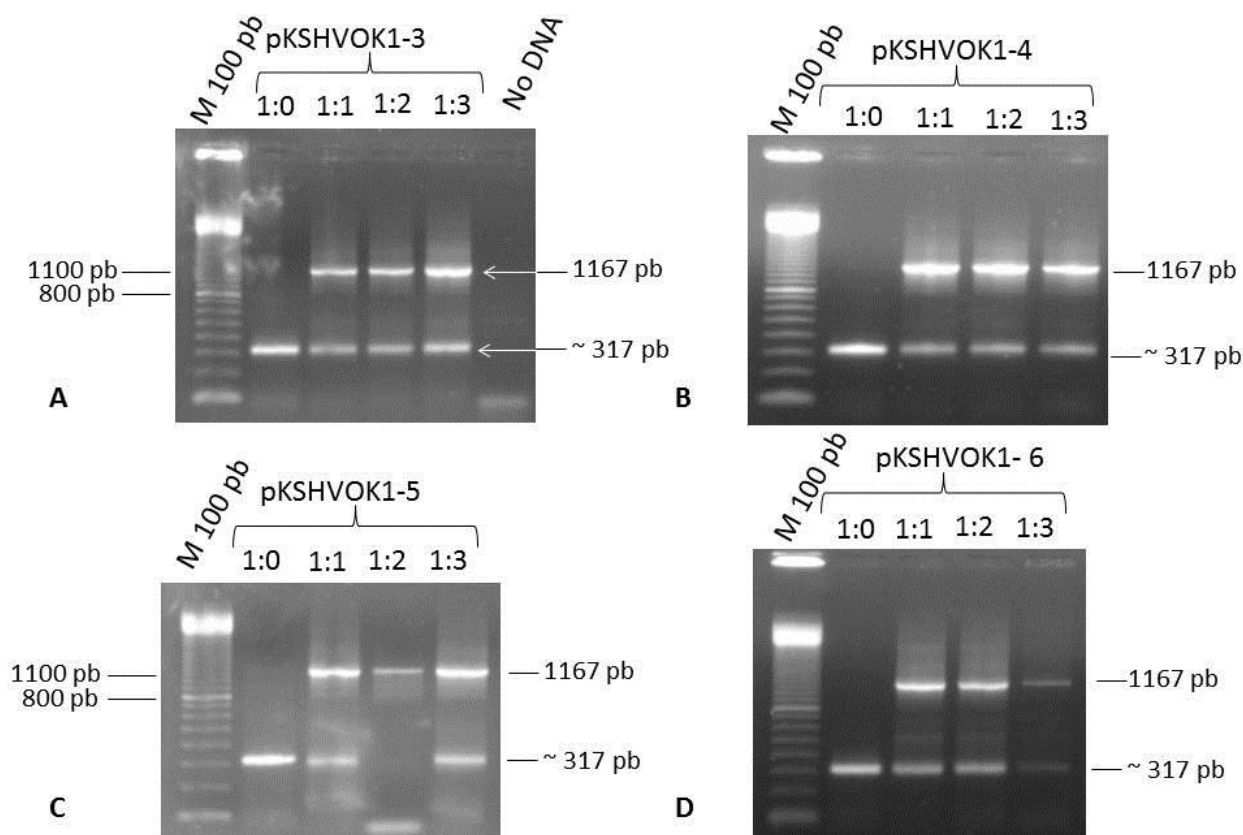


FIGURA 10 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Marcador de peso molecular de 100 pb (*Amersham, Buckinghamshire, UK*). É notada ligação adequada entre inserto e vetor (banda de 1167pb); a banda de 317pb representa amplificação de resíduo de vetor vazio, não digerido. Foram realizadas ligações com diferentes proporções de massa entre vetor e inserto para KSHVOK1-3 (A), KSHVOK1-4 (B), KSHVOK1-5 (C) e KSHVOK1-6 (D): 1:0 (sem inserto), 1:1, 1:2 e 1:3.

Foi possível isolar colônias transformadas com os vetores pKSHVOK1-3, pKSHVOK1-4 e pKSHVOK1-6. No entanto, não houve crescimento satisfatório de colônias transformadas com pKSHVOK1-5. Para sanar esse problema, buscou-se melhorar a eficiência da reação de ligação utilizando proporção molar 1:3 (1 mol de DNA de vetor para cada 3 moles de DNA do inserto) e demais condições descritas no Quadro 4. A Figura 11 demonstra a ligação entre vetor e inserto KSHVOK1-5 nas novas condições experimentadas.

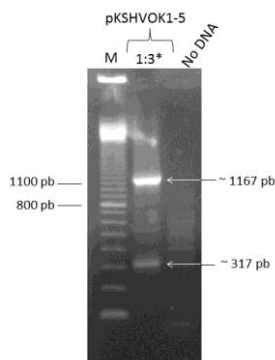


FIGURA 11- Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Uso de marcador de peso molecular 100 pb (*Amersham, Buckinghamshire, UK*). Amplicon de 1167 pb mostra que houve ligação adequado entre inserto e vetor. Para o inserto KSHVOK1-5 foi utilizada proporção molar de ligação 1:3 entre vetor e inserto.

A seguir, efetuou-se transformação bacteriana com vetor pKSHVOK1-5 na proporção 1:3 molar. Ao se obter número considerável de colônias, foi efetuada PCR de colônia para verificar a presença dos vetores recombinantes nas bactérias isoladas. O resultado desse experimento está apresentado na Figura 12.

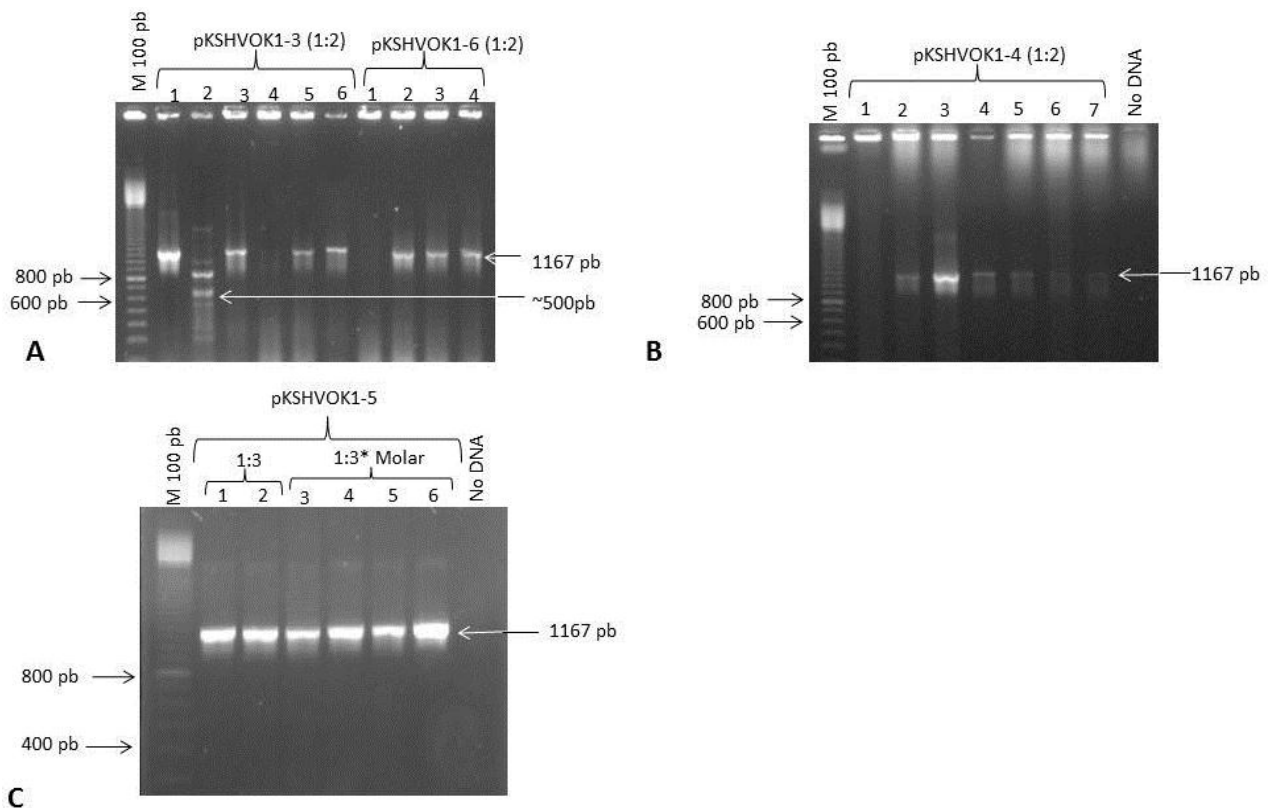


FIGURA 12 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Marcador de peso molecular 100pb (*Amersham, Buckinghamshire, UK*). Na figura, o resultado da *colony*-PCR para os clones dos vetores pKSHVOK1-3 e pKSHVOK1-6 (A), pKSHVOK1-4 (B) e pKSHVOK1-5 (C) após transformação de bactérias competentes *E. coli DH5α*. O número correspondente à colônia selecionada na placa de LB-Ágar está indicado no topo, bem como a proporção correspondente a massa de vetor e inserto, sendo 1:2 para vetores pKSHVOK1-3, pKSHVOK1-4 e pKSHVOK1-6 (A e B) e para pKSHVOK1-5, 1:3 em proporções em massa (colônias 1 e 2) e molar (colônias 3 a 6) (C).

Com base nos resultados obtidos, foram selecionadas para crescimento em meio líquido as colônias 01, 03 e 06 para pKSHVOK1-3; colônias 02, 03 e 05 para pKSHVOK1-4; 03, 04 e 05 para pKSHVOK1-5 e 02, 03 e 04 para pKSHVOK1-6. Os vetores recombinantes foram purificados, sequenciados e validados, conforme previamente indicado. Os resultados da validação das sequências estão apresentados na Figura 13.

pKSHVOK1-3.01

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF170531.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 glycoprotein gene	1570	1570	95%	0.0	99%
U93872.2	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus glycoprotein M, DNA	1528	1528	100%	0.0	97%
GQ994935.1	Human herpesvirus 8 strain JSC-1 clone BAC16, complete genome	1489	1489	100%	0.0	97%
AF133042.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain BC2 transformant	1489	1489	100%	0.0	97%
AF130300.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate UKma1 K1 glycoprotein	1471	1471	95%	0.0	98%
AF130274.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate Icam1 K1 glycoprotein	1454	1454	95%	0.0	97%
AF178774.1	Human herpesvirus 8 clone K1-2/691 K1 protein (K1) gene, complete	1448	1448	95%	0.0	97%
AF178816.1	Human herpesvirus 8 clone K1-50/Pbm K1 protein (K1) gene, complete	1443	1443	95%	0.0	97%
DQ394060.1	Human herpesvirus 8 isolate I7 K1 glycoprotein (K1) gene, complete	1439	1439	94%	0.0	97%
DQ394051.1	Human herpesvirus 8 isolate D15 K1 glycoprotein (K1) gene, complete	1439	1439	94%	0.0	97%

pKSHVOK1-3.03

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF170531.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 glycoprotein gene	1574	1574	95%	0.0	99%
U93872.2	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus glycoprotein M, DNA	1550	1550	100%	0.0	98%
GQ994935.1	Human herpesvirus 8 strain JSC-1 clone BAC16, complete genome	1511	1511	100%	0.0	97%
AF133042.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain BC2 transformant	1511	1511	100%	0.0	97%
AF130300.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate UKma1 K1 glycoprotein	1474	1474	95%	0.0	98%
AF130274.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate Icam1 K1 glycoprotein	1458	1458	95%	0.0	97%
AF178774.1	Human herpesvirus 8 clone K1-2/691 K1 protein (K1) gene, complete	1452	1452	95%	0.0	97%
AF278849.1	Human herpesvirus 8 strain J5 K1 glycoprotein (K1) mRNA, partial	1448	1448	93%	0.0	98%
AF178816.1	Human herpesvirus 8 clone K1-50/Pbm K1 protein (K1) gene, complete	1447	1447	95%	0.0	97%
DQ394060.1	Human herpesvirus 8 isolate I7 K1 glycoprotein (K1) gene, complete	1443	1443	95%	0.0	97%

pKSHVOK1-3.06

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF170531.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 glycoprotein gene	1580	1580	95%	0.0	100%
U93872.2	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus glycoprotein M, DNA	1555	1555	100%	0.0	98%
GQ994935.1	Human herpesvirus 8 strain JSC-1 clone BAC16, complete genome	1517	1517	100%	0.0	97%
AF133042.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain BC2 transformant	1517	1517	100%	0.0	97%
AF130300.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate UKma1 K1 glycoprotein	1480	1480	95%	0.0	98%
AF130274.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate Icam1 K1 glycoprotein	1463	1463	95%	0.0	98%
AF178774.1	Human herpesvirus 8 clone K1-2/691 K1 protein (K1) gene, complete	1458	1458	95%	0.0	97%
AF278849.1	Human herpesvirus 8 strain J5 K1 glycoprotein (K1) mRNA, partial	1454	1454	93%	0.0	98%
AF178816.1	Human herpesvirus 8 clone K1-50/Pbm K1 protein (K1) gene, complete	1452	1452	95%	0.0	97%
DQ394060.1	Human herpesvirus 8 isolate I7 K1 glycoprotein (K1) gene, complete	1448	1448	95%	0.0	97%

FIGURA 13 - Alinhamento das sequências consenso de ORF-K1 do KSHV obtidas de clones dos vetores recombinantes pKSHVOK1-3, pKSHVOK1-4, pKSHVOK1-5 e pKSHVOK1-6 com sequências-protótipo depositadas no *NCBI*, encontradas através da ferramenta BLAST. Para cada clone, foram selecionadas as dez primeiras sequências encontradas no banco de dados que apresentam maior cobertura em relação à sequência consultada (destaque em verde) e maior identidade máxima (destaque em vermelho).

pKSHVOK1-4.02

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
GO994935.1	Human herpesvirus 8 strain JSC-1 clone BAC16, complete genome	1633	1633	100%	0.0	99%
AF133042.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain BC2 transformant	1572	1572	100%	0.0	98%
AF130302.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate UKma3 K1 glycoprotein gene, complete sequence	1557	1557	95%	0.0	99%
AF178809.1	Human herpesvirus 8 clone K1-42/Tin K1 protein (K1) gene, complete sequence	1552	1552	95%	0.0	99%
AF178773.1	Human herpesvirus 8 clone K1-1/663 K1 protein (K1) gene, complete sequence	1552	1552	95%	0.0	99%
AF196317.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain K1-73/Naf K1 protein (K1) gene, complete sequence	1546	1546	95%	0.0	99%
AF178826.1	Human herpesvirus 8 clone K1-61/Fa2 K1 protein (K1) gene, complete sequence	1546	1546	95%	0.0	99%
AF178832.1	Human herpesvirus 8 clone K1-69/Fain3 K1 protein (K1) gene, complete sequence	1546	1546	95%	0.0	99%
U93872.2	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus glycoprotein M, DNA	1544	1544	100%	0.0	98%
DQ394049.1	Human herpesvirus 8 isolate D14-1 K1 glycoprotein (K1) gene, complete sequence	1543	1543	95%	0.0	99%

pKSHVOK1-4.03

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
GO994935.1	Human herpesvirus 8 strain JSC-1 clone BAC16, complete genome	1655	1655	100%	0.0	100%
AF133042.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain BC2 transformant	1594	1594	100%	0.0	99%
AF130302.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate UKma3 K1 glycoprotein gene, complete sequence	1580	1580	95%	0.0	100%
AF178809.1	Human herpesvirus 8 clone K1-42/Tin K1 protein (K1) gene, complete sequence	1574	1574	95%	0.0	99%
AF178773.1	Human herpesvirus 8 clone K1-1/663 K1 protein (K1) gene, complete sequence	1574	1574	95%	0.0	99%
AF196317.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain K1-73/Naf K1 protein (K1) gene, complete sequence	1568	1568	95%	0.0	99%
AF178826.1	Human herpesvirus 8 clone K1-61/Fa2 K1 protein (K1) gene, complete sequence	1568	1568	95%	0.0	99%
AF178832.1	Human herpesvirus 8 clone K1-69/Fain3 K1 protein (K1) gene, complete sequence	1568	1568	95%	0.0	99%
U93872.2	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus glycoprotein M, DNA	1567	1567	100%	0.0	98%
DQ394049.1	Human herpesvirus 8 isolate D14-1 K1 glycoprotein (K1) gene, complete sequence	1565	1565	95%	0.0	99%

pKSHVOK1-4.05

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
GO994935.1	Human herpesvirus 8 strain JSC-1 clone BAC16, complete genome	1655	1655	100%	0.0	100%
AF133042.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain BC2 transformant	1594	1594	100%	0.0	99%
AF130302.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate UKma3 K1 glycoprotein gene, complete sequence	1580	1580	95%	0.0	100%
AF178809.1	Human herpesvirus 8 clone K1-42/Tin K1 protein (K1) gene, complete sequence	1574	1574	95%	0.0	99%
AF178773.1	Human herpesvirus 8 clone K1-1/663 K1 protein (K1) gene, complete sequence	1574	1574	95%	0.0	99%
AF196317.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain K1-73/Naf K1 protein (K1) gene, complete sequence	1568	1568	95%	0.0	99%
AF178826.1	Human herpesvirus 8 clone K1-61/Fa2 K1 protein (K1) gene, complete sequence	1568	1568	95%	0.0	99%
AF178832.1	Human herpesvirus 8 clone K1-69/Fain3 K1 protein (K1) gene, complete sequence	1568	1568	95%	0.0	99%
U93872.2	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus glycoprotein M, DNA	1567	1567	100%	0.0	98%
DQ394049.1	Human herpesvirus 8 isolate D14-1 K1 glycoprotein (K1) gene, complete sequence	1565	1565	95%	0.0	99%

pKSHVOK1-5.03

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF133040.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain 431KAP transformant	1600	1600	100%	0.0	98%
AF130301.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate UKma24 K1 glycoprotein gene, complete sequence	1557	1557	95%	0.0	99%
AF178822.1	Human herpesvirus 8 clone K1-57/Eti K1 protein (K1) gene, complete sequence	1552	1552	95%	0.0	99%
FJ884618.1	Human herpesvirus 8 isolate UG-65 K1 glycoprotein gene, complete sequence	1550	1550	100%	0.0	97%
AF178801.1	Human herpesvirus 8 clone K1-34/E40 K1 protein (K1) gene, complete sequence	1541	1541	95%	0.0	99%
AF178783.1	Human herpesvirus 8 clone K1-12/Mou K1 gene, complete sequence	1528	1528	95%	0.0	98%
AF178788.1	Human herpesvirus 8 clone K1-19/Edm K1 protein (K1) gene, complete sequence	1513	1513	95%	0.0	98%
AY042948.1	Human herpesvirus 8 strain Ugd10 from Uganda K1 glycoprotein (K1) gene, complete sequence	1511	1511	93%	0.0	99%
AF178791.1	Human herpesvirus 8 clone K1-22/Yan K1 protein (K1) gene, complete sequence	1507	1507	95%	0.0	98%
AY042949.1	Human herpesvirus 8 strain Ugd29 from Uganda K1 glycoprotein (K1) gene, complete sequence	1489	1489	93%	0.0	98%

pKSHVOK1-5.04

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF133040.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain 431KAP transformant	1616	1616	100%	0.0	99%
AF130301.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate UKma24 K1 glycoprotein gene, complete sequence	1574	1574	95%	0.0	99%
AF178822.1	Human herpesvirus 8 clone K1-57/Eti K1 protein (K1) gene, complete sequence	1574	1574	95%	0.0	99%
FJ884618.1	Human herpesvirus 8 isolate UG-65 K1 glycoprotein gene, complete sequence	1567	1567	100%	0.0	98%
AF178801.1	Human herpesvirus 8 clone K1-34/E40 K1 protein (K1) gene, complete sequence	1557	1557	95%	0.0	99%
AF178793.1	Human herpesvirus 8 clone K1-12/Mou K1 gene, complete sequence	1544	1544	95%	0.0	99%
AF178788.1	Human herpesvirus 8 clone K1-19/Edm K1 protein (K1) gene, complete sequence	1530	1530	95%	0.0	98%
AY042948.1	Human herpesvirus 8 strain Ugd10 from Uganda K1 glycoprotein (K1) gene, complete sequence	1528	1528	93%	0.0	99%
AF178791.1	Human herpesvirus 8 clone K1-22/Yan K1 protein (K1) gene, complete sequence	1524	1524	95%	0.0	98%
AY042949.1	Human herpesvirus 8 strain Ugd29 from Uganda K1 glycoprotein (K1) gene, complete sequence	1506	1506	93%	0.0	98%

pKSHVOK1-5.05

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF133040.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain 431KAP transformant	1602	1602	100%	0.0	98%
AF130301.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate UKma24 K1 glycoprotein gene, complete sequence	1574	1574	95%	0.0	99%
AF178822.1	Human herpesvirus 8 clone K1-57/Eti K1 protein (K1) gene, complete sequence	1574	1574	95%	0.0	99%
AF178801.1	Human herpesvirus 8 clone K1-34/E40 K1 protein (K1) gene, complete sequence	1557	1557	95%	0.0	99%
FJ884618.1	Human herpesvirus 8 isolate UG-65 K1 glycoprotein gene, complete sequence	1552	1552	100%	0.0	97%
AF178783.1	Human herpesvirus 8 clone K1-12/Mou K1 gene, complete sequence	1544	1544	95%	0.0	99%
AF178788.1	Human herpesvirus 8 clone K1-19/Edm K1 protein (K1) gene, complete sequence	1530	1530	95%	0.0	98%
AY042948.1	Human herpesvirus 8 strain Ugd10 from Uganda K1 glycoprotein (K1) gene, complete sequence	1528	1528	93%	0.0	99%
AF178791.1	Human herpesvirus 8 clone K1-22/Yan K1 protein (K1) gene, complete sequence	1524	1524	95%	0.0	98%
AY042949.1	Human herpesvirus 8 strain Ugd29 from Uganda K1 glycoprotein (K1) gene, complete sequence	1506	1506	93%	0.0	98%

FIGURA 13 - Continuação

pKSHVOK1-6.02

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF178822.1	Human herpesvirus 8 clone K1-57/Eti K1 protein (K1) gene, co	1567	1567	94%	0.0	99%
AF133040.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain 431KAP transf	1567	1567	100%	0.0	98%
AF130301.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate UKma24 K1 gl	1555	1555	94%	0.0	99%
AF178801.1	Human herpesvirus 8 clone K1-34/E40 K1 protein (K1) gene, c	1539	1539	94%	0.0	99%
AF178783.1	Human herpesvirus 8 clone K1-12/Mou K1 gene, complete seq	1528	1528	94%	0.0	98%
FJ884618.1	Human herpesvirus 8 isolate UG-65 K1 glycoprotein gene, com	1517	1517	100%	0.0	97%
AY042948.1	Human herpesvirus 8 strain Ugd10 from Uganda K1 glycoprotei	1515	1515	93%	0.0	99%
AF178788.1	Human herpesvirus 8 clone K1-19/Edm K1 protein (K1) gene, c	1511	1511	94%	0.0	98%
AF178791.1	Human herpesvirus 8 clone K1-22/Yan K1 protein (K1) gene, c	1506	1506	94%	0.0	98%
AY042949.1	Human herpesvirus 8 strain Ugd29 from Uganda K1 glycoprotei	1493	1493	93%	0.0	98%

pKSHVOK1-6.03

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF133040.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain 431KAP transf	1596	1596	100%	0.0	99%
AF178822.1	Human herpesvirus 8 clone K1-57/Eti K1 protein (K1) gene, co	1565	1565	95%	0.0	99%
AF130301.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate UKma24 K1 gl	1554	1554	95%	0.0	99%
FJ884618.1	Human herpesvirus 8 isolate UG-65 K1 glycoprotein gene, com	1546	1546	100%	0.0	97%
AF178801.1	Human herpesvirus 8 clone K1-34/E40 K1 protein (K1) gene, c	1537	1537	95%	0.0	99%
AF178783.1	Human herpesvirus 8 clone K1-12/Mou K1 gene, complete seq	1524	1524	95%	0.0	98%
AY042948.1	Human herpesvirus 8 strain Ugd10 from Uganda K1 glycoprotei	1520	1520	93%	0.0	99%
AF178788.1	Human herpesvirus 8 clone K1-19/Edm K1 protein (K1) gene, c	1509	1509	93%	0.0	99%
AF178791.1	Human herpesvirus 8 clone K1-22/Yan K1 protein (K1) gene, c	1504	1504	95%	0.0	98%
AY042949.1	Human herpesvirus 8 strain Ugd29 from Uganda K1 glycoprotei	1498	1498	93%	0.0	98%

pKSHVOK1-6.04

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF133040.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain 431KAP transf	1611	1611	100%	0.0	99%
AF178822.1	Human herpesvirus 8 clone K1-57/Eti K1 protein (K1) gene, co	1580	1580	95%	0.0	99%
AF130301.1	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolate UKma24 K1 gl	1568	1568	95%	0.0	99%
FJ884618.1	Human herpesvirus 8 isolate UG-65 K1 glycoprotein gene, com	1561	1561	100%	0.0	98%
AF178801.1	Human herpesvirus 8 clone K1-34/E40 K1 protein (K1) gene, c	1552	1552	95%	0.0	99%
AF178783.1	Human herpesvirus 8 clone K1-12/Mou K1 gene, complete seq	1539	1539	95%	0.0	99%
AY042948.1	Human herpesvirus 8 strain Ugd10 from Uganda K1 glycoprotei	1528	1528	93%	0.0	99%
AF178788.1	Human herpesvirus 8 clone K1-19/Edm K1 protein (K1) gene, c	1524	1524	95%	0.0	98%
AF178791.1	Human herpesvirus 8 clone K1-22/Yan K1 protein (K1) gene, c	1519	1519	95%	0.0	98%
AY042949.1	Human herpesvirus 8 strain Ugd29 from Uganda K1 glycoprotei	1506	1506	93%	0.0	98%

FIGURA 13 - Continuação

Após análise das sequências consenso de ORF-K1 de cada um dos vetores recombinantes gerados, foi constatado que todas as sequências eram equivalentes à ORF-K1 do KSHV de sequências-protótipo depositadas no *NCBI*.

A sequência amplificada de pKSHVOK1-3 apresentou alto grau de similaridade com ORF-K1 de BC-3 (*GenBank Acession# AF170531.1 - "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 glycoprotein gene, complete cds."*), e a de pKSHVOK1-4 foi similar à ORF-K1 de JSC-1 (*GenBank Acession# GQ994935.1 - Human herpesvirus 8 strain JSC-1 clone BAC16, complete genome."*). Ambas as linhagens das quais provem o inserto apresentam KSHV de genótipo C, confirmado por sequenciamento. Já as sequências de pKSHVOK1-5 e pKSHVOK1-6 apresentaram alta similaridade com a ORF-K1 de linhagem celular 431KAP (*GenBank Acession# AF133040.1 "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strain 431KAP transforming membrane receptor-like protein*

(K1-B) gene, complete cds.”), que contem KSHV de genótipo B. Esse resultado condiz com o esperado, posto que pKSHVOK1-5 e pKSHVOK1-6 são provenientes de linhagens celulares BC-5 e VG-1, respectivamente, sendo que ambas apresentam KSHV de genótipo B. Essas duas linhagens celulares, no entanto, não possuem sequências protótipo depositadas no *Genbank*.

A Figura 14 apresenta resultado da análise filogenética realizada no software *Mega 5.1 Beta 3⁴¹*, na qual foram incluídas as sequências consenso de ORF-K1 dos vetores recombinantes produzidos e sequências-protótipo de diferentes genótipos do KSHV selecionados (Quadro 5). Optou-se pelo teste estatístico de Máxima probabilidade (*Maximum likelihood*) como algoritmo de construção da árvore filogenética e validação por teste de filogenia *Bootstrap* (500 réplicas). A árvore filogenética revela o genótipo viral a que pertencem cada uma das ORF-K1 dos vetores recombinantes produzidos, a saber: dois vetores com ORF-K1 de genótipo B (pKSHVOK1-5 e pKSHVOK1-6) e dois de genótipo C (pKSHVOK1-3 e pKSHVOK1-4).

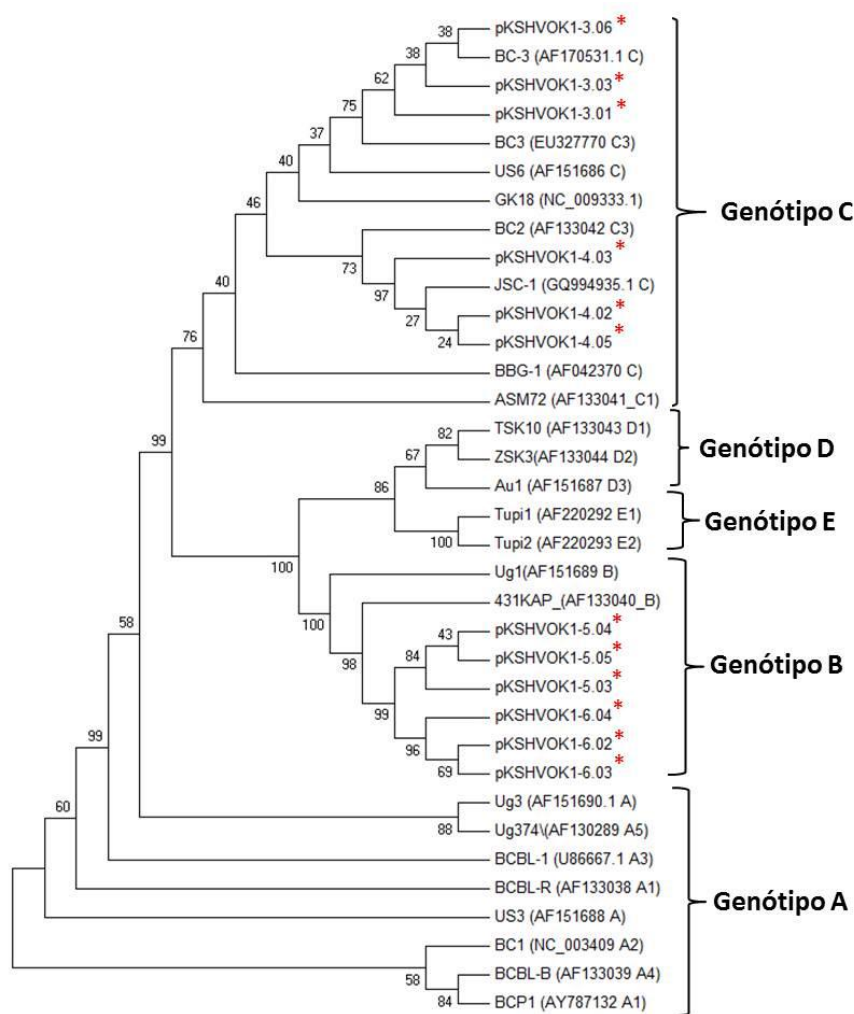


FIGURA 14 - Análise filogenética das sequências da ORF-K1 do KSHV obtidas dos vetores recombinantes pKSHVOK1-3, pKSHVOK1-4, pKSHVOK1-5 e pKSHVOK1-6 (destacadas com *). Tais amostras foram comparadas com sequências-protótipo da ORF-K1 viral depositadas no banco de dados *NCBI*. Entre parênteses o código de acesso (*Accession #*) do *Genbank* de cada sequência e a frente do código, o genótipo a que pertencem cada uma das linhagens celulares. A filogenia mostra que ORF-K1 dos vetores recombinantes pKSHVOK1-3 e pKSHVOK1-4 pertencem ao genótipo C do KSHV, já pKSHVOK1-5 e pKSHVOK1-6, ao genótipo B.

Após sequenciamento, foi realizada transfecção de células HEK293, nessa etapa por eletroporação com equipamento *Neon Transfection System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)*. Um clone de cada genótipo foi selecionado para a transfecção, sendo pKSHVOK1-5.03 do genótipo B e pKSHVOK1-3.06 do genótipo C. Além dos vetores mencionados, executou-se transfecção do vetor vazio p3xFLAG-CMV-10 e do vetor pKSHVOK1-2.06 (controle positivo de K1 acoplada a FLAG), cuja expressão de K1 já foi evidenciada em experimento anterior (Figura 8). Em 48h após a transfecção as pro-

teínas totais das células transfectadas foram extraídas e analisadas por WB com anticorpo primário anti-FLAG (Figura 15).



FIGURA 15 - Detecção da expressão de KSHV K1 acoplada ao epítipo FLAG em membranas de fluoreto de polivinilideno (*polyvinylidene fluoride* – PVDF) (*Millipore, Billerica, MA, USA*) com 50 µg de proteínas totais. As proteínas foram extraídas de células HEK 293 *in vitro* e transientemente transfectadas com vetores pKSHVOK1-2.06, pKSHVOK1-3.06, pKSHVOK1-5.03, p3xFLAG-CMV-10 e p3xFLAG-BAP. A proteína K1 acoplada a FLAG tem tamanho aproximado de 49,3kDa. Proteína BAP ligada a FLAG é controle positivo para FLAG, com tamanho variável entre 45-55kDa. Ambos tem expressão comprovada por banda de aproximadamente 50kDa. Presença de bandas inespecíficas nos vetores recombinantes, e também no vetor vazio.

A K1 acoplada a FLAG foi detectada. No entanto, foram notadas ligações inespecíficas na membrana. Assim, o método requer aprimoramento para detecção proteica de K1 nos vetores recombinantes pKSHVOK1-3.06 e pKSHVOK1-5.03. De qualquer modo, esses resultados demonstraram a expressão da proteína K1 fusionada ao epítipo FLAG, de maneira que os vetores recombinantes produzidos poderão ser usados nos estudos subsequentes sobre K1 em execução pelo *Grupo de Estudos em Carcinogênese Viral e Biologia dos Cânceres* da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP Botucatu, SP.

7 Discussão

Os primeiros resultados obtidos na produção dos vetores recombinantes (Figuras 6 e 7) revelaram divergência na identificação de DNA entre as linhagens celulares das quais foram provenientes ORF-K1 do KSHV dos vetores pKSHVOK1-1 e pKSHVOK1-2, e as de fato obtidas. Isso mostra a necessidade da realização do sequenciamento de DNA, que tem como objetivo validar a sequência nucleotídica dos insertos

inseridos nos vetores recombinantes. A identificação correta do genótipo de ORF-K1 inserida nos vetores recombinantes é fundamental para análise fidedigna dos efeitos biológicos possivelmente diferenciados da proteína K1 de genótipos A, B e C na célula.

O sequenciamento dos demais vetores mostrou coerência na identificação do DNA das linhagens celulares das quais foram amplificados os insertos de ORF-K1 do KSHV, bem como do seu genótipo viral (Figuras 13 e 14). O sequenciamento de vetores pKSHVOK1-3, com ORF-K1 proveniente de DNA de linhagem celular BC-3, e pKSHVOK1-4, com ORF-K1 proveniente de DNA de JSC-1, mostrou fidedignidade em relação as linhagens celulares à que pertencem. Os vetores pKSHVOK1-5 e pKSHVOK1-6 provenientes de DNA de linhagens celulares BC-5 e VG-1, respectivamente, apresentaram ambos similaridade com ORF-K1 de linhagem 431KAP. Isso é explicado pelo fato das linhagens BC-5 e VG-1 não terem sequências protótipo definidas depositadas no *Genbank*. Entretanto, o genótipo viral dos clones recombinantes foi fidedigno (genótipo B viral), validando estruturalmente os vetores recombinantes.

Os vetores recombinantes transfectados em células HEK293 revelaram expressão da proteína K1 avaliada por meio de *immunoblots* para detecção do epítipo FLAG ligado à proteína viral. A detecção de K1 poderia ter sido executada com anticorpo específico para K1 (anti-K1) de modo a detectar K1 diretamente. No entanto, a detecção executada apenas por meio de epítipo FLAG já é suficiente para confirmar expressão proteica de K1, pois esse epítipo é expresso em níveis detectáveis somente quando ligado à proteína.

A padronização de técnica de WB ainda não foi totalmente concluída, sendo necessários ajustes para sanar problemas de inespecificidade. Entretanto, a expressão de K1 foi verificada nos vetores recombinantes pKSHVOK1 contendo ORF-K1 de genó-

tipos A, B e C (Figuras 8 e 15), de modo que é possível concluir que os vetores foram adequadamente produzidos.

A proteína K1 do KSHV é uma proteína transmembrana e sua estrutura é similar a um receptor de superfície de linfócitos, subdividindo-se em região extracelular semelhante à imunoglobulina, região transmembrana e citoplasmática. A região citoplasmática possui um domínio ITAM, o qual apresenta aminoácidos carregados negativamente²⁸. O mecanismo de transdução de sinal de K1 ocorre por meio de internalização desse receptor de membrana, sendo esse processo de endocitose dependente de clatrina⁴².

O domínio ITAM íntegro causa mobilização de cálcio para o meio intracelular e também promove a fosforilação de proteínas-quinases celulares, como Syk, Cbl e subunidade p85 de PI-3K²⁸. A fosforilação de proteínas quinases celulares irá desencadear uma série de efeitos na célula, por essas proteínas estarem envolvidas em vias de sinalização celular. Por exemplo, a fosforilação de PI-3K levará a ativação de quinase Akt, a qual está envolvida na transdução de sinais relacionados à sobrevivência celular e inibição da apoptose⁴³.

Apesar da análise do efeito de K1 nas vias de sinalização celular não ter sido proposta no presente estudo, a realização dessa análise reforçaria a validação funcional de K1, avaliada no presente trabalho pela técnica de WB (Figura 8 e 15). O estudo da interação entre K1 e, por exemplo, a quinase PI-3K celular, além da análise de outras propriedades biológicas descritas na literatura²⁸, poderiam ratificar a atividade funcional de K1. Portanto, a limitação mais relevante do estudo foi que análises dos efeitos biológicos de K1 não foram realizadas, por não haver tempo hábil suficiente para a execução de análises adicionais.

Em relação à estrutura de K1, tanto a sequência de nucleotídeos quanto a sequência de aminoácidos variam dependendo da fonte de onde são obtidas (e.g., variação de K1 entre os diferentes genótipos do KSHV)³⁶. Essa variabilidade de K1 justifica a possível existência de propriedades biológicas peculiares na célula infectada por diferentes genótipos do vírus. Entretanto, um estudo de Lee e colaboradores demonstrou que o domínio ITAM da região citoplasmática foi completamente conservado em mais de vinte sequências analisadas de K1²⁸. Esse fato pode limitar as possíveis diferenças entre as propriedades biológicas analisadas para a proteína K1 considerando os diferentes genótipos virais, visto que é por meio desse domínio que essa proteína viral interfere na maioria das vias de sinalização celular. No entanto, essa questão não pode ser apropriadamente esclarecida, pois no estudo de Lee e colaboradores a origem das sequências de ITAM da proteína viral avaliadas não foi mencionada, o que não assegura que tais sequências provieram de diferentes genótipos do KSHV.

Ainda que o domínio ITAM seja similar em K1 de diferentes genótipos virais, as outras regiões da proteína também interagem com elementos celulares que exercem efeitos biológicos importantes na célula. Um exemplo é a interação do domínio N-terminal de K1 com proteínas chaperonas na apoptose. A expressão de K1 e sua atividade anti-apoptótica mediada por Fas em células 293-K1 e 293-Vec são dependentes de proteínas chaperonas de choque térmico (*Heat shock proteins* - Hsp) 90 e 40 associada a retículo endoplasmático (Erdj3/Hsp40). O domínio N-terminal de K1 associa-se fisicamente a ambas, e a inibição de Hsp90 e Erdh3/Hsp40 prejudica a expressão da proteína K1 viral⁴⁴.

Com base na propriedade de K1 de inibir apoptose por meio de Fas³¹, Daniluk e colaboradores propuseram um modelo de peptídeos artificialmente sintetizados derivados do domínio semelhante à imunoglobulina (*Ig-like*) da proteína K1 que teve influên-

cias no desencadeamento da apoptose por meio de receptor Fas, e da necrose por meio do receptor 1 do fator de necrose tumoral α (*tumoral necrosis fator alpha*– TNF- α). Um peptídeo derivado do domínio *Ig-like* de K1 denominado S20-3 atuou de maneira seletiva apenas em células cancerígenas hematopoiéticas causando apoptose, sem alterar as funções das células sanguíneas normais. Esse estudo ratifica a importância da interação entre K1 e receptores de superfície celular⁴⁵.

K1 também é capaz de induzir o fenômeno de imortalização em células HU-VECs, mas sem ocasionar transformação celular. Já em experimentos executados *in vivo*, K1 aumentou o tamanho, peso e vasculatura de tumores desenvolvidos em ratos inoculados com linhagem celular de carcinoma cervical expressando K1⁴⁶.

Ao analisar as informações sobre K1 e sua interação tanto com vias de sinalização intracelulares, quanto com receptores de superfície celular é notável que essa proteína viral desencadeia efeitos potencialmente oncogênicos na célula. A variabilidade da sequência nucleotídica de ORF-K1 e a variação da cadeia polipeptídica da proteína expressa nos diferentes genótipos do KSHV (A, B e C)³⁶ sustentam a hipótese de que as diferentes formas de K1 podem causar diferentes efeitos biológicos nas células. Assim, a produção e validação de vetores recombinantes que expressaram a proteína K1 dos diferentes genótipos virais do KSHV realizadas nesse estudo serão úteis para que oportunamente sejam efetuadas avaliações adicionais dos efeitos biológicos de KSHV K1.

8 Conclusão

Foram produzidos clones de vetores recombinantes de ORF-K1 de genótipos A, B e C. Esses clones recombinantes foram validados estruturalmente (fidedignidade de suas sequências nucleotídicas no que se refere à ORF-K1 viral) e a expressão proteica de K1 foi detectada em células transfectadas *in vitro*. Assim, conclui-se que os vetores

recombinantes produzidos poderão ser empregados para o estabelecimento de modelo experimental para análises subsequentes das propriedades biológicas da proteína K1 do KSHV.

9 Referências Bibliográficas

- ¹ Kaposi M. Idiopatisches multiples Pigmentsarcom der Haut, Arch DermatolSyph, 1872, 3:265–273.
 - ² Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. Nature reviews. 2010; 10(10):707-19.
 - ³ Fatahzadeh M. Kaposi sarcoma: review and medical management update. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics. 2011.
 - ⁴ Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. The New England journal of medicine. 2000; 342(14):1027-38.
 - ⁵ Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Science (New York, NY). 1994; 266(5192):1865-9.
 - ⁶ Wen KW, Damania B. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis. Cancer letters. 2009; 289(2):140-50.
 - ⁷ Thorley-Lawson DA. EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? The Journal of allergy and clinical immunology. 2005; 116(2):251-61.
 - ⁸ Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. The New England journal of medicine. 1995; 332(18):1186-91.
 - ⁹ Hengge UR, Ruzicka T, Tying SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, et al. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma. The Lancet infectious diseases. 2002; 2(6):344-52.
 - ¹⁰ Akula SM, Naranatt PP, Walia NS, Wang FZ, Fegley B, Chandran B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) infection of human fibroblast cells occurs through endocytosis. Journal of virology. 2003; 77(14):7978-90.
 - ¹¹ Bechtel JT, Liang Y, Hvidding J, Ganem D. Host range of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. Journal of virology. 2003; 77(11):6474-81.
 - ¹² Pantry SN, Medveczky PG. Epigenetic regulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication. Seminars in cancer biology. 2009; 19(3):153-7.
 - ¹³ Dittmer D, Lagunoff M, Renne R, Staskus K, Haase A, Ganem D. A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Journal of virology. 1998; 72(10):8309-15.
-

-
- 14 Dourmishev LA, Dourmishev AL, Palmeri D, Schwartz RA, Lukac DM. Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Rev. 2003; 67(2):175-212.
 - 15 Cotter MA, 2nd, Robertson ES. The latency-associated nuclear antigen tethers the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome to host chromosomes in body cavity-based lymphoma cells. *Virology*. 1999; 264(2):254-64.
 - 16 Friborg J, Jr., Kong W, Hottiger MO, Nabel GJ. p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature*. 1999; 402(6764):889-94.
 - 17 Liu L, Eby MT, Rathore N, Sinha SK, Kumar A, Chaudhary PM. The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the I κ B kinase complex. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277(16):13745-51.
 - 18 Li M, Lee H, Yoon DW, Albrecht JC, Fleckenstein B, Neipel F, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *Journal of virology*. 1997; 71(3):1984-91.
 - 19 Bowser BS, Morris S, Song MJ, Sun R, Damania B. Characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) K1 promoter activation by Rta. *Virology*. 2006; 348(2):309-27.
 - 20 Lukac DM, Garibyan L, Kirshner JR, Palmeri D, Ganem D. DNA binding by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein is necessary for transcriptional activation of two viral delayed early promoters. *Journal of virology*. 2001; 75(15):6786-99.
 - 21 Cheng EH, Nicholas J, Bellows DS, Hayward GS, Guo HG, Reitz MS, et al. A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94(2):690-4.
 - 22 Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005; 122(6):927-39.
 - 23 Jham BC, Ma T, Hu J, Chaisuparat R, Friedman ER, Pandolfi PP, et al. Amplification of the angiogenic signal through the activation of the TSC/mTOR/HIF axis by the KSHV vGPCR in Kaposi's sarcoma. *PloSone*. 2011; 6(4):e19103.
 - 24 Pietrek M, Brinkmann MM, Glowacka I, Enlund A, Havemeier A, Dittrich-Breiholz O, et al. Role of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 SH3 binding site in inflammatory signaling and B-cell activation. *Journal of virology*. 2010; 84(16):8231-40.
 - 25 Lee BS, Lee SH, Feng P, Chang H, Cho NH, Jung JU. Characterization of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 signalosome. *Journal of virology*. 2005; 79(19):12173-84.
 - 26 Prakash O, Tang ZY, Peng X, Coleman R, Gill J, Farr G, et al. Tumorigenesis and aberrant signaling in transgenic mice expressing the human herpesvirus-8 K1 gene. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002; 94(12):926-35.
 - 27 Bourbouliou D, Aldam D, Lagos D, Allen E, Williams I, Cornforth D, et al. Short- and long-term effects of highly active antiretroviral therapy on Kaposi sarcoma-associated herpesvirus immune responses and viraemia. *AIDS (London, England)*. 2004; 18(3):485-93.
-

-
- ²⁸ Lee H, Guo J, Li M, Choi JK, DeMaria M, Rosenzweig M, et al. Identification of an immunoreceptor tyrosine-based activation motif of K1 transforming protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Molecular and cellular biology*. 1998; 18(9):5219-28.
- ²⁹ Bowser BS, Morris S, Song MJ, Sun R, Damania B. Characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) K1 promoter activation by Rta. *Virology*. 2006; 348(2):309-27.
- ³⁰ Lagunoff M, Majeti R, Weiss A, Ganem D. Deregulated signal transduction by the K1 gene product of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; 96(10):5704-9.
- ³¹ Berkova Z, Wang S, Wise JF, Maeng H, Ji Y, Samaniego F. Mechanism of Fas signaling regulation by human herpesvirus 8 K1 oncoprotein. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009; 101(6):399-411.
- ³² Wang L, Wakisaka N, Tomlinson CC, DeWire SM, Krall S, Pagano JS, et al. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) K1 protein induces expression of angiogenic and invasion factors. *Cancer research*. 2004; 64(8):2774-81.
- ³³ Chandriani S, Ganem D. Array-based transcript profiling and limiting-dilution reverse transcription-PCR analysis identify additional latent genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology*. 2010, Jun; 84(11):5565-73.
- ³⁴ Guilluy C, Zhang Z, Bhende PM, Sharek L, Wang L, Burrige K, et al. Latent KSHV infection increases the vascular permeability of human endothelial cells. *Blood*. 2011 Nov 10; 118(19):5344-54.
- ³⁵ White T, Hagen M, Gudza I, White IE, Ndemera B, Gwanzura L, et al. Genetic diversity of the Kaposi's sarcoma herpesvirus K1 protein in AIDS-KS in Zimbabwe. *J Clin Virol*. 2008; 42(2):165-71.
- ³⁶ Zong JC, Ciufu DM, Alcendor DJ, Wan X, Nicholas J, Browning PJ, et al. High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *Journal of virology*. 1999; 73(5):4156-70.
- ³⁷ Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *The Journal of infectious diseases*. 2000; 181(5):1562-8.
- ³⁸ Kasolo FC, Monze M, Obel N, Anderson RA, French C, Gompels UA. Sequence analyses of human herpesvirus-8 strains from both African human immunodeficiency virus-negative and -positive childhood endemic Kaposi's sarcoma show a close relationship with strains identified in febrile children and high variation in the K1 glycoprotein. *The Journal of general virology*. 1998; 79 (Pt 12):3055-65.
- ³⁹ Kajumbula H, Wallace RG, Zong JC, Hokello J, Sussman N, Simms S, et al. Ugandan Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus phylogeny: evidence for cross-ethnic transmission of viral subtypes. *Intervirology*. 2006; 49(3):133-43.
- ⁴⁰ Hayward GS, Zong JC. Modern Evolutionary History of the Human KSHV genome. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2007; 312:1-42.
- ⁴¹ Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*. 2011; 28(10):2731-9.
-

- ⁴² Tomlinson CC, Damania B. Critical role for endocytosis in the regulation of signaling by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 protein. *Journal of virology*. 2008 Jul;82(13):6514-23.
- ⁴³ Tomlinson CC, Damania B. The K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activates the Akt signaling pathway. *Journal of virology*. 2004 Feb;78(4):1918-27.
- ⁴⁴ Wen KW, Damania B. Hsp90 and Hsp40/Erdj3 are required for the expression and anti-apoptotic function of KSHV K1. *Oncogene*. 2010, Jun 17; 29(24):3532-44.
- ⁴⁵ Daniluk U, Kerros C, Tao RH, Wise JF, Ao X, Berkova Z, et al. The peptide derived from the Ig-like domain of human herpesvirus 8 K1 protein induces death in hematopoietic cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012, 28;31(1):69.
- ⁴⁶ Wang L, Dittmer DP, Tomlinson CC, Fakhari FD, Damania B. immortalization of primary endothelial cells by the K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Cancer research*. 2006 Apr 1;66(7):3658-66.
-