

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CAMPUS BOTUCATU**

“Genotipagem de HLA classe I e II para seleção de células precursoras dendríticas para estudo da imunobiologia do vírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV)”

Nathália Suiti Laszkiewicz

Acadêmica

Dra. Aline do Nascimento Bolpetti

Orientador

Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira

Co-orientador

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

**Botucatu, SP**

**2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Laszkiewicz, Nathália Suiti.

Genotipagem de HLA de classe I e II para seleção de células precursoras dendríticas para estudo da imunobiologia do vírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV) / Nathália Suiti Laszkiewicz. – Botucatu : [s.n.], 2011

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

Orientador: Aline do Nascimento Bolpetti

Coorientador: Deilson Elgui de Oliveira

Capes: 40105008

1. Kaposi, Sarcoma de. 2. Antígenos de histocompatibilidade HLA.

Palavras-chave: Genotipagem; HLA; KSHV.

*Dedicatória*

---

*Dedico este trabalho a meus pais, Chafiha e Paulo e à minha irmã, Paula que sempre me deram amor, carinho e suporte para que me tornasse a pessoa que sou hoje. Apoiaram-me em todas as decisões de minha vida, tanto profissionais como pessoais, mostrando-me que com determinação podemos alcançar qualquer sonho. E que me incentivaram desde o início desse projeto dando-me força para que cada detalhe fosse feito com grande empenho, amor e dedicação.*

# *Agradecimentos*

---

*Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me dado saúde e determinação para realizar essa etapa de minha vida e não permitir que desistisse nos momentos de dificuldade e que exigiam maior dedicação.*

*Agradeço novamente aos meus pais e minha irmã por todo o amor que me fortaleceu e permitiu que nem mesmo as maiores dificuldades me fizessem repensar os meus sonhos.*

*Agradeço ao Professor Dr. Deilson Elgui de Oliveira por me aceitar em seu grupo e permitir a descoberta do mundo científico, com as dificuldades e êxitos e, assim, incentivar a continuidade no meio científico.*

*Agradeço também à Dra. Aline do Nascimento Bolpetti por ter tido paciência e dedicação em me ensinar a trabalhar em um laboratório e desempenhar todas as atividades da melhor maneira possível, buscando sempre a perfeição.*

*Agradeço às meninas do laboratório, Ana Paula, Annie, Natasha, Renata pelo auxílio e companheirismo durante essa jornada. Em especial a Mariana que, além de estar comigo durante toda a graduação, compartilhou as mesmas aflições durante toda a iniciação científica.*

*Agradeço especialmente às minhas amigas, Nathália Pereira, Mariana Fernandes, Roberta Andreassa e Grazielle Manin por completarem meus 4 anos de faculdade com momentos especiais, fazendo-me sorrir e aprender dia a dia ao lado delas. Além de me darem força e discernimento para lidar com as dificuldades surgidas durante esses anos. Obrigada pela amizade que levarei para sempre comigo.*

## Sumário

<b>1. Abstract</b> .....	11
<b>2. Resumo</b> .....	14
<b>3. Introdução</b> .....	17
<b>3.1. Vírus associado ao Sarcoma de Kaposi/ Herpesvirus Humano tipo 8</b> ....	17
<b>3.2. Biologia do KSHV e papel da proteína viral K1</b> .....	19
<b>3.3. Sistema HLA</b> .....	22
<b>4. Objetivos</b> .....	30
<b>5. Material e Métodos</b> .....	32
<b>5.1. Extração de DNA</b> .....	32
<b>5.2. Linhagens Celulares</b> .....	33
<b>5.3. Genotipagem de HLA classe I e II</b> .....	34
<b>5.4. Análise in silico dos haplótipos HLA classe I e II dos 20 voluntários</b> .....	35
<b>6. Resultados</b> .....	39
<b>6.1. Extração e checagem da qualidade do DNA das amostras de sangue periférico dos voluntários</b> .....	39
<b>6.2. Extração de DNA das linhagens celulares BC-1 e BC-3</b> .....	39
<b>6.3. Genotipagem HLA de classe I e II das células BC-1 e BC-3</b> .....	40
<b>6.4. Genotipagem HLA de classe I e II das amostras dos 20 voluntários recrutados</b> .....	44
<b>6.5. Determinação dos alelos HLA de classe I e II dos 20 voluntários</b> .....	46
<b>6.6. Análise in silico</b> .....	47
<b>7. Discussão</b> .....	52
<b>8. Conclusão</b> .....	59
<b>9. Referências Bibliográficas</b> .....	61

## ***Índice de Figuras, Quadros e Tabelas***

Figura 1 - Gel de agarose 2% com resultado da PCR para amplificação do gene do promotor da IL-10 para validação do DNA extraído do sangue periférico dos voluntários recrutados. Tamanho do amplicon: ~123 pb. (4 – 10): DNA dos voluntários 4, 6 a 10; (NO): controle negativo sem DNA; (M): marcador de peso molecular 123 pb.....39

Figura 2 - Gel de agarose 2% com resultado da PCR para amplificação de fragmento do promotor do gene da IL-10 para validação do DNA extraído das linhagens celulares BC-1 e BC-3. Tamanho do amplicon: ~123 pb. (A1): DNA da linhagem celular BC-1; (A2): DNA da linhagem celular BC-3; (NO): controle negativo sem DNA; (M): marcador de peso molecular 123 pb.....40

Figura 3 - Gel de agarose 2% com padrões de banda da linhagem celular BC-1. Os géis apresentam corretamente as bandas de controle interno do kit - colunas 1 a 30: ~800pb; colunas 31 a 53 e 56 a 95: ~1200pb; colunas 54 e 55: ~200pb. (M): marcador de peso molecular 50-2000pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); (96): controle negativo sem DNA.....42

Figura 4 - Gel de agarose 2% com padrões de banda da linhagem celular BC-3. Os géis apresentam corretamente as bandas de controle interno do kit - colunas 1 a 30: ~800pb; colunas 31 a 53 e 56 a 95: ~1200pb; colunas 54 e 55: ~200pb. (M): marcador de peso molecular 50-2000pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); (1-95): colunas com DNA amplificado; (96): controle negativo sem DNA.....43



Figura 5 - Gel de agarose 2% representativo com padrões de banda da amostra do voluntário 2. Os géis apresentam corretamente as bandas de controle interno do kit – colunas 1 a 30: ~800pb; colunas 31 a 53 e 56 a 95: ~1200pb; colunas 54 e 55: ~200pb. (M): marcador de peso molecular 50-2000pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); (1-95): colunas com DNA amplificado; (96): controle negativo sem DNA.....45

Quadro 1 - Condições das reações de PCR empregadas na amplificação de IL-10.....33

Quadro 2: Condições das reações de PCR empregadas na amplificação de genes HLA classe I e II.....35

Quadro 3 - Genótipos do KSHV de linhagens celulares de nosso laboratório.....36

Quadro 4 - Haplótipos HLA de classe I e II das linhagens celulares BC-1 e BC-3.....41

Tabela 1 - Haplótipos HLA de classe I e II dos voluntários recrutados.....46

Tabela 2 – Análise *in silico* das moléculas HLA de classe I utilizando as plataformas de predição de epítotos BIMAS e SYFPEITHI para identificação de bons apresentadores de epítotos da proteína viral K1 do KSHV.....47

Tabela 3 - Voluntários portadores de haplótipos HLA de classe I apontados na análise *in silico* como bons apresentadores de epítotos da proteína K1 do KSHV.....55

*Abstract*

---

## **1. Abstract**

The Kaposi-associated Herpesvirus (KSHV) also known as Human Herpesvirus 8 (HHV-8) is associated with the development of Kaposi's sarcoma (KS) and others lymphoproliferative diseases such as Primary Effusion Lymphoma (PEL) and Multicentric Castleman Disease (MCD). Even though the virus is considered lymphotropic, it is able to infect other cell types such as macrophages, dendritic cells, endothelial cells, monocytes and fibroblasts. After infection, KSHV becomes latent expressing essential viral genes to its maintenance in an infected cell. However, in some circumstances may occur the reactivation of lytic cycle producing new viral particles. K1 protein of KSHV interferes in the cellular signaling inducing proliferation and supporting cellular transformation. K1 is encoded by viral ORF-K1, which shows high variability between different genotypes of KSHV. So far, it is not clear whether different isoforms of K1 have specific immunobiological features. The KSHV latency is maintained under strict control by the immune system supported by an adequate antigen presentation involving Human Leucocyte Antigen (HLA) class I and II. Polymorphisms of HLA class I and II genes confer an enormous variability in molecules that recognize a large amount of antigens, but also can increase the susceptibility to autoimmune diseases. Therefore, the present study aims to genotype HLA class I (A and B) and class II (DR and DQ) from volunteers to identify haplotypes that can provide better response to K1 epitopes of different KSHV genotypes. First of all, 20 volunteers were selected to genotype HLA genes. In our results we observed prevalence of certain HLA class I haplotypes as HLA-A1, HLA-A2, HLA-A24, HLA-A26, HLA-B8, HLA-B18 e HLA-B44. After the *in*

*silico* analysis using BIMAS and SYFPEITHI databases, we observed high scores for epitopes from the B genotype of KSHV, indicating high affinity of these peptides to the HLA class I molecules. Additionally, we observed some HLA molecules that potentially can be good presenters of K1 peptides. And interestingly some of these molecules were described for the first time as possibly capable to present K1 epitopes - HLA-A1, HLA-A3, HLA-A11, HLA-B16, HLA-B38 and HLA-B51. Even though our analyses are so limited, we can conclude that almost all the selected volunteers may be capable to present K1 epitopes. These results will contribute to posterior studies of KSHV immunobiology.

## *Resumo*

---

## 2. Resumo

O Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (*Kaposi-associated Herpesvirus* - KSHV), também denominado herpesvírus humano tipo 8 (*Human herpesvirus 8* - HHV-8) está associado ao desenvolvimento do sarcoma de Kaposi (SK) e de outras doenças linfoproliferativas, como o linfoma de efusão primário (*Primary Effusion Lymphoma* – PEL) e a doença multicêntrica de Castleman (*Multicentric Castleman Disease* – MCD). Apesar de linfotrópico, o vírus é capaz de infectar outros tipos celulares como macrófagos, células dendríticas, células endoteliais, monócitos e fibroblastos. Após a infecção, o KSHV permanece em latência, expressando genes virais essenciais para sua manutenção na célula infectada; entretanto, ocasionalmente sofre reativação lítica, com produção de novas partículas virais. A proteína K1 do KSHV interfere na sinalização celular e proliferação da célula infectada pelo vírus, favorecendo a transformação celular. K1 é codificada pela ORF-K1 viral, a qual apresenta elevada variabilidade entre os diferentes genótipos do KSHV. No entanto, as características imunobiológicas das diferentes formas de K1 não estão totalmente elucidadas. A latência do KSHV no hospedeiro é mantida sob estrito controle pelo sistema imunitário dos indivíduos imunocompetentes, nos quais a apresentação de antígenos aos linfócitos T via HLA (*Human Leucocyte Antigen*) de classe I e II ocorre de forma adequada. Os genes HLA de classe I e II apresentam polimorfismos que conferem grande variabilidade no reconhecimento de antígenos, mas também podem aumentar a susceptibilidade a doenças autoimunitárias. Assim sendo, o presente trabalho tem como objetivo a genotipagem de HLA classe I (A e B) e II (DQ e DR) para

identificar indivíduos com haplótipos capazes de conferir melhor resposta a epítomos das diferentes isoformas da proteína K1 do KSHV. A genotipagem de HLA classe I e II foi realizada seguida de análise *in silico*, empregando as ferramentas de predição de epítomos BIMAS e SYFPEITHI, dos 20 voluntários selecionados. A partir dessas análises, observou-se a prevalência de determinados haplótipos HLA de classe I, como HLA-A1, HLA-A2, HLA-A24, HLA-A26, HLA-B8, HLA-B18 e HLA-B44. Após análise *in silico* foi possível observar elevados scores para epítomos do genótipo B do KSHV, indicando alta afinidade destes peptídeos com as moléculas HLA de classe I analisadas. Nossos achados corroboram dados já presentes na literatura. Adicionalmente, encontramos algumas moléculas que potencialmente poderiam ser boas apresentadoras de epítomos derivados da proteína K1. São elas: HLA-A1, HLA-A3, HLA-A11, HLA-B16, HLA-B38 e HLA-B51. Desta forma, apesar de se tratar de uma análise *in silico*, sem confirmação experimental, podemos concluir que a maioria dos voluntários selecionados pode ser capaz de apresentar epítomos de K1 originados das diferentes isoformas do KSHV. E estes resultados contribuirão para estudos posteriores da imunobiologia do KSHV.

# *Introdução*

---



### **3. Introdução**

#### **3.1. Vírus associado ao Sarcoma de Kaposi/ Herpesvirus Humano tipo**

##### **8**

O Sarcoma de Kaposi (SK) foi inicialmente descrito por Moritz Kaposi em 1872 como uma neoplasia angiomatosa que afetava principalmente homens de países mediterrâneos, como Itália e Israel<sup>1,2</sup>. Quatro formas clínico-epidemiológicas da doença são atualmente conhecidas e diferem de acordo com parâmetros clínicos e epidemiológicos. A doença originalmente descrita corresponde ao SK clássico, também denominado esporádico. O SK endêmico acomete principalmente mulheres e crianças da África equatorial, enquanto o SK iatrogênico é frequentemente observado em indivíduos imunossuprimidos submetidos a transplantes, principalmente transplantes renais<sup>3</sup>. O SK iatrogênico relaciona-se com frequência ao comprometimento neoplásico de vísceras, mas a remoção da terapia imunossupressora tende a possibilitar a regressão da doença<sup>4</sup>.

O desenvolvimento e progressão do SK associado à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome* - AIDS), por sua vez, ocorrem no contexto de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana 1 (*Human Immunodeficiency Virus 1* - HIV-1)<sup>1,5</sup>. O SK associado a AIDS (SK-AIDS) tipicamente apresenta maior agressividade biológica em relação ao SK clássico, com elevadas taxas de mortalidade associada à disseminação do tumor pelo organismo<sup>1,2</sup>. Esta forma é mais comumente observada entre homens que praticam sexo com outros homens (HSH)<sup>6</sup>. Nas

últimas duas décadas, o uso da terapia anti-retroviral potente combinada (*Highly Active Antiretroviral Therapy* - HAART) em pacientes portadores do HIV-1 que desenvolveram SK-AIDS tem contribuído para o controle da progressão da neoplasia, presumivelmente, por contribuir na melhoria da resposta do sistema imunitário do indivíduo<sup>7</sup>.

Em 1994, Chang e colaboradores identificaram sequências de DNA semelhantes às dos genomas de dois gamaherpesvírus, o vírus Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus* - EBV) e o herpesvírus saimiri (HVS), isoladas de lesões de SK<sup>8</sup>. A partir desse resultado, foi descrito um novo gamaherpesvírus, originalmente denominado Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi (*Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus* - KSHV), conhecido também como Herpesvírus Humano tipo 8 (*Human Herpesvirus 8* - HHV-8). Posteriormente, foi verificada associação do KSHV com duas doenças linfoproliferativas incomuns ocorrendo no contexto de infecção pelo HIV: o Linfoma de Efusão Primário (*Primary Effusion Lymphoma* - PEL)<sup>9</sup> e a Doença Multicêntrica de Castleman (*Multicentric Castleman Disease* - MCD)<sup>10</sup>.

O KSHV pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Gamaherpesvirinae* e ao gênero *Radnovirus*, sendo o único desse gênero capaz de infectar células humanas. Possui um capsídeo viral, que é sintetizado na célula hospedeira durante a fase lítica de seu ciclo de vida e um envelope no qual se inserem proteínas do hospedeiro e virais. Seu genoma é formado por um DNA de dupla fita, que se lineariza durante o ciclo lítico viral e mantém-se na forma de epissomo durante a latência<sup>11</sup>. Seu genoma é composto por 86 genes, dos quais 22 com atividades imunomodulatórias<sup>12</sup>. Adicionalmente, o

KSHV contém genes que desempenham funções anti-apoptóticas, angiogênicas, de controle do ciclo celular, de proliferação e transformação celular, além de genes associados à evasão ao sistema imunitário<sup>13</sup>. Diferentemente dos outros herpesvírus, o KSHV possui uma grande quantidade de produtos com funções semelhantes às de proteínas da célula hospedeira<sup>11</sup>.

### **3.2. Biologia do KSHV e papel da proteína viral K1**

A infecção pelo KSHV acomete alguns tipos celulares como as células fusiformes características das lesões do SK<sup>14</sup>, macrófagos, células dendríticas<sup>15</sup>, células endoteliais<sup>11</sup>, monócitos<sup>16</sup>, células epiteliais e fibroblastos<sup>11</sup>. Em modelos *in vitro*, as células mais susceptíveis à infecção pelo KSHV são as HEK 293, uma linhagem de células embrionárias renais humanas<sup>17</sup>.

Após infecção, o KSHV permanece em latência no interior da célula infectada na forma de um epissomo nuclear<sup>18</sup>. A fase lítica só é ativada em situações particulares, como nos casos de imunossupressão. A reativação lítica está associada à produção de nova progênie viral e efeitos citopáticos do vírus, ocasionando a morte da célula hospedeira e infecção de novas células susceptíveis à infecção viral<sup>19</sup>.

Na maioria das células infectadas, o KSHV permanece na forma latente, expressando poucos genes virais essenciais para sua manutenção. Dentre eles, destacam-se a ORF-73, que codifica o antígeno nuclear associado à latência (*Latency-associated Nuclear Antigen* - LANA), responsável por manter o epissomo ligado ao genoma do hospedeiro<sup>20</sup> e por agir como moduladora da

transcrição de genes celulares e virais<sup>13</sup>; a ORF-72, que codifica a proteína ciclina-D viral (*viral Cyclin* - vCyc), que regula o ciclo celular e promove a progressão das células para a fase S do ciclo celular<sup>21</sup>; a ORF-K12, que codifica a kaposina, uma das proteínas responsáveis pela transformação celular que induz a ativação de diversas vias serinas/treoninas quinases<sup>22</sup>; e a ORF-K13, que codifica uma proteína viral semelhante à proteína inibitória de FLICE (*Viral FLICE inhibitory proteins* - FLIP), que inibe a apoptose mediada por FAS e é um importante ativador da via de sinalização celular NF- $\kappa$ B<sup>23</sup>.

Dentre os genes do KSHV expressos na fase lítica podem ser destacados a ORF-K2, que codifica uma proteína viral homóloga à Interleucina 6 (vIL-6); a ORF-16 codificadora de uma proteína viral semelhante à proteína antiapoptótica Bcl-2 (vBcl-2); a ORF-K1, que codifica uma glicoproteína viral de membrana denominada K1, com atividades transformantes e imunomodulatórias; e a ORF-74, que codifica a proteína viral semelhante aos receptores de superfície acoplados à proteína G (*viral G Protein-Coupled Receptors* - vGPCR) com atividades na angiogênese, proliferação, transformação e sobrevivência celular<sup>1</sup>.

Diferentes genótipos do KSHV já foram descritos, e são classificados de acordo com segmentos variáveis do genoma viral, notadamente a ORF-K1. As variações na ORF-K1 do KSHV conferem elevada variabilidade na sequência de aminoácidos da proteína, oscilando entre 30-40%. As regiões hipervariáveis do gene, denominadas VR1 e VR2, permitem a classificação do KSHV em 6 grupos genotípicos principais: A, B, C, D, E<sup>24</sup> e Z<sup>1,11</sup>.

Estudos de epidemiologia molecular revelam influência geográfica na distribuição dos diferentes genótipos do KSHV: genótipos dos grupos A e C são mais prevalentes na Europa, nos Estados Unidos e no Norte da Ásia; o tipo B é mais característico da África; D é encontrado principalmente nas ilhas do Pacífico; E, foi encontrado em ameríndios sulamericanos<sup>25</sup>; e genótipos do grupo Z foram identificados em amostras provenientes de crianças da Zâmbia<sup>26</sup>.

A proteína K1 é uma glicoproteína transmembrana de 46 kDa composta por uma porção extracelular, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática na porção C-terminal. É uma proteína relacionada com a família de receptores das imunoglobulinas e contém um imunorreceptor semelhante a um domínio tirosina-quinase na cauda citoplasmática (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) - ITAM<sup>27</sup>. A presença de ITAM, contendo domínios de ligação SH2, na porção citoplasmática de K1 permite que a proteína viral seja capaz de desencadear sinais intracelulares em inúmeros tipos de células. O fato de ITAM ser encontrado em uma variedade de receptores celulares, como receptor de célula B (*B cell receptor* - BCR) e receptor de célula T (*T cell receptor*- TCR), desempenha importante papel na sinalização intracelular, capaz de estimular a proliferação, diferenciação e/ou morte celular<sup>28</sup>.

K1 é também responsável por induzir a expressão de fatores parácrinos que desempenham papel importante na patogênese do KSHV, como o fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), tanto em células endoteliais como epiteliais, promovendo proliferação e migração celular após destruição da membrana basal dos vasos sanguíneos<sup>29</sup>.

Outro fator parácrino induzido pela proteína K1, a metaloproteinase 9 (MMP9), atua nas células endoteliais promovendo degradação da matriz extracelular, que induz inflamação, reparação tecidual, invasão tumoral e disseminação metastática<sup>30</sup>. O fator nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B* - NF-κB) também é estimulado por K1, atuando nas células endoteliais e linfócitos infectados pelo KSHV de modo a protegê-los da apoptose, além de mantê-los na fase latente do ciclo viral<sup>31</sup>. Em conjunto, essas características conferem potencial oncogênico à K1, ratificado pela observação de tumores em animais transgênicos que expressam essa proteína viral<sup>32</sup>.

Assim como os demais herpesvírus, o KSHV estabelece infecção latente em seu hospedeiro, que é mantida sob controle pelo sistema imunitário de indivíduos imunocompetentes. Em geral, uma resposta imunitária eficiente depende basicamente da apresentação adequada de antígenos reconhecidos por linfócitos T e B. Durante a infecção viral, as proteínas virais são processadas gerando pequenos peptídeos que serão transportados para dentro do retículo endoplasmático, local em que serão complexados a uma molécula de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex I* – MHC-I); subsequentemente, são transportados para a superfície celular, possibilitando o reconhecimento pelo linfócito T citotóxico (CD8<sup>+</sup>) em contexto MHC-dependente.

### **3.3. Sistema HLA**

O complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* – MHC) é um locus responsável por codificar proteínas que têm por função apresentar antígenos aos linfócitos T. As moléculas do MHC humano

receberam o nome de antígeno leucocitário humano (*Human Leucocyte Antigen* – HLA), já que os aloantígenos são expressos em leucócitos humanos e em conjunto possibilitam o controle da exposição do organismo e resposta do sistema imunitário aos epítopos próprios e não-próprios<sup>33</sup>.

As moléculas HLA de classe I são formadas por duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não-covalente: cadeias  $\alpha$  e  $\beta_2$ -microglobulina. A cadeia  $\alpha$  (cadeia pesada) é codificada pelos genes HLA e possui em torno de 44 a 47kD e seus segmentos aminoterminais,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , formam uma plataforma de oito lâminas  $\beta$ -pregueadas, em que as duas  $\alpha$ -hélices paralelas se apoiam, constituindo a fenda de ligação para os peptídeos. Já o segmento  $\alpha_3$  forma um domínio semelhante à imunoglobulina, que é igual em todas as moléculas HLA classe I. A  $\beta_2$ -microglobulina (cadeia leve), por sua vez, é codificada por um gene localizado no cromossomo 15, portanto, não faz parte da região do MHC. Esta cadeia leve possui em torno de 12kD e interage de maneira não-covalente com o domínio  $\alpha_3$  da cadeia pesada.

Já a molécula HLA de classe II é formada por duas cadeias polipeptídicas,  $\alpha$  e  $\beta$ , que contém, de 32 a 34kD e de 29 a 32kD, respectivamente. Ambas são codificadas por genes HLA altamente polimórficos. Os segmentos aminoterminais  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  formam a fenda de ligação dos peptídeos e os segmentos  $\alpha_2$  e  $\beta_2$  são responsáveis pela formação de domínios semelhantes à imunoglobulina. A região transmembrana das duas cadeias culmina em uma curta cauda citoplasmática<sup>33</sup>.

Moléculas HLA de classe I estão presentes em todas as células nucleadas do organismo, sendo responsáveis pela apresentação de antígenos

intracelulares aos linfócitos T CD<sub>8</sub><sup>+</sup>. Uma vez ativados, estes linfócitos são capazes de reconhecer e destruir as células que expressam o peptídeo alvo<sup>34</sup>. Além disso, algumas moléculas de classe I são reconhecidas por receptores de inibição de lise dos linfócitos *natural killer* (*Killer Inhibitory Receptors* - KIRs), inibindo a lise das células alvo por estas células<sup>35</sup>.

A apresentação de antígenos via moléculas HLA de classe I é iniciada pela degradação de proteína. Inicialmente, as proteínas produzidas pelos patógenos são degradadas por enzimas proteolíticas do proteossoma e os polipeptídeos são reduzidos a peptídeos com 8 a 10 aminoácidos. Subsequentemente, esses peptídeos são ligados à proteína transportadora TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*) e encaminhados para o retículo endoplasmático. No interior do retículo ocorre a ligação do peptídeo com a molécula HLA de classe I, de modo que o peptídeo torna-se parte integrante do complexo HLA, sendo fundamental para sua estabilidade dentro e na superfície da célula. O complexo HLA I-peptídeo é então encaminhado para o Complexo de Golgi e, por fim, transportado para a superfície celular, onde será apresentado aos linfócitos T CD<sub>8</sub><sup>+</sup><sup>36</sup>.

As moléculas HLA de classe II, por outro lado, são expressas pelas células apresentadoras de antígenos profissionais (*Antigen-presenting Cell* - APC), que incluem macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Essas células captam antígenos exógenos e migram para os linfonodos, onde ativam linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup>. Estes linfócitos secretam citocinas com papel imunorregulador, ativando, por exemplo, os linfócitos T CD<sub>8</sub><sup>+</sup> para a eliminação das células tumorais ou infectadas por vírus<sup>34</sup>.



O processamento do antígeno pela via HLA de classe II ocorre nos endossomos. Nessas organelas, as catepsinas degradam as proteínas produzidas pelos patógenos em peptídeos de cadeias pequenas, com 14 a 25 aminoácidos. Em seguida, os endossomos fundem-se com vesículas que contêm as moléculas HLA de classe II. Por fim, o complexo HLA II-peptídeo é transportado para a superfície celular sendo exposto ao reconhecimento pelas células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> <sup>37</sup>.

Os genes do sistema HLA localizam-se no braço curto do cromossomo 6, na região 6p21.3, que corresponde ao MHC, com aproximadamente 3600 kb<sup>34</sup>. E estão divididos em três regiões: classe I, que compreende os genes HLA-A, B, C, E, H, G e F; classe II, HLA-DR, DQ e DP; e classe III, que inclui os genes que codificam proteínas da família do Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor* - TNF) e do sistema complemento<sup>38</sup>.

As moléculas HLA de classe I são codificadas por genes altamente polimórficos cujas variações concentram-se, principalmente, nos domínios  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2 que formam a fenda de ligação do peptídeo. O domínio  $\alpha$ 3, que interage com a molécula CD<sub>8</sub> do linfócito T, também possui variações, porém são encontradas em menor número quando comparadas aos domínios  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2<sup>39</sup>. Os genes que codificam as moléculas HLA de classe II são também polimórficos e as variações promovem alterações nos aminoácidos constituintes da fenda de ligação do peptídeo<sup>34</sup>.

Os polimorfismos observados nas moléculas HLA de classe I e II interferem na afinidade aos peptídeos e aos receptores de célula T (*T receptor cell* - TCR) e, ainda, modificam o sítio de interação peptídeo-MHC por meio de

alterações conformacionais das moléculas envolvidas<sup>39</sup>. Dessa forma, amplia o repertório de resposta do organismo a patógenos que poderiam escapar do reconhecimento pelo sistema imunitário; contudo, essa estratégia também pode aumentar a susceptibilidade do indivíduo a doenças autoimunitárias<sup>38</sup>.

De acordo com o banco de dados do consórcio de Imunogenética Internacional (*International ImmunoGeneTics* - IMGT) existem descritos mais de 5400 diferentes alelos HLA de classe I e 1500 alelos HLA de classe II<sup>40</sup>. O grande número de polimorfismos nestes genes influencia diferentes aspectos da resposta imunitária dos indivíduos.

Alguns estudos têm sido realizados na tentativa de identificar uma possível associação entre alelos e/ou haplótipos de HLA e a susceptibilidade a diversas doenças ou sua evolução. Com relação ao SK, é sabido que polimorfismos específicos de determinadas moléculas HLA influenciam o risco de desenvolvimento dos tumores. O alelo HLA-DRB1\*01, por exemplo, confere maior risco ao desenvolvimento do SK em pacientes coinfectados pelo KSHV e pelo HIV<sup>41</sup>. Outros dois alelos associados ao maior risco de desenvolvimento da doença são HLA-DRB1\*1104, mais importante na associação com o desenvolvimento do SK clássico, e HLA-DQB1\*0604<sup>42</sup>.

Sabe-se, ainda, que a molécula HLA-A\*0201 é capaz de apresentar alguns epítomos de proteínas tanto do ciclo lítico como latente do KSHV<sup>43,44</sup>, sendo alguns desses epítomos capazes de estimular tanto resposta celular específica T CD<sub>8</sub><sup>+</sup> como T CD<sub>4</sub><sup>+</sup><sup>45</sup> e podem ser críticos para a imunopatogênese do KSHV e para a progressão do SK<sup>46</sup>. Recentemente, um estudo identificou um epítomo da proteína K8.1 do KSHV como imunodominante, além de

confirmar a imunogenicidade de outros epítomos virais, já descritos na literatura<sup>47</sup>.

Mesmo diante desses estudos de associação que indicam relações de determinados haplótipos HLA com melhor ou pior resposta do sistema imunitário ao KSHV, pouco ainda se sabe sobre os efeitos da infecção pelo vírus em células de linhagem mielóide, em especial células dendríticas, que têm papel importante na resposta imunológica. A caracterização das propriedades de proteínas virais nessas células pode contribuir substancialmente para um melhor entendimento dos mecanismos desenvolvidos pelo vírus para modular a resposta imunológica do hospedeiro. A proteína K1 merece destaque dentre os produtos codificados no genoma do KSHV em virtude da ausência de dados sobre seus efeitos na resposta imunológica, contrapostos às propriedades oncogênicas já documentadas dessa proteína.

Adicionalmente, a grande variedade de polimorfismos nos genes HLA de classe I e II confere enorme variabilidade no reconhecimento de inúmeros antígenos virais pelos linfócitos T CD<sub>8</sub><sup>+</sup> e T CD<sub>4</sub><sup>+</sup>. Assim sendo, a definição dos haplótipos HLA capazes de conferir melhor resposta a diferentes epítomos do KSHV é de elevada importância para o melhor entendimento da imunobiologia do vírus e para definição de possíveis estratégias de combate à sua infecção.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo é realizar a genotipagem dos alelos HLA de classe I e II e posterior análise *in silico* para selecionar indivíduos que, possivelmente, são capazes de conferir melhor resposta aos epítomos da proteína K1 do KSHV. Este trabalho faz parte de um

estudo mais amplo, cujo objetivo será avaliar as diferenças imunofenotípicas de células dendríticas transfectadas com diferentes formas da ORF-K1 do KSHV. Estas células dendríticas serão originadas a partir da diferenciação de células mononucleares periféricas coletadas dos doadores selecionados no presente estudo.

## *Objetivos*

---

#### **4. Objetivos**

O objetivo geral deste trabalho foi realizar a genotipagem dos alelos HLA de classe I e II para selecionar indivíduos capazes de apresentar epítomos da proteína K1 do KSHV. Mais especificamente, foram realizadas genotipagem por PCR e análise *in silico*, utilizando ferramentas de predição de epítomos, para determinação de moléculas HLA de classe I com elevada afinidade para apresentar peptídeos de K1. A seguir, como parte de estudo posterior, os indivíduos serão selecionados como doadores de células mononucleares periféricas que serão diferenciadas *in vitro* em células dendríticas. Estas células dendríticas, por sua vez, serão transfectadas com as diferentes variantes da ORF-K1 do KSHV. O modelo será empregado para avaliação das diferenças imunofenóticas entre as células dendríticas transfectadas que expressam as diferentes isoformas de K1. As moléculas que serão avaliadas no estudo estão envolvidas no processo de apresentação de antígenos.

# *Material e Métodos*

---

## **5. Material e Métodos**

### **5.1. Extração de DNA**

Para realizar a genotipagem de HLA classe I e II e posterior seleção de células mononucleares, foram recrutados 20 voluntários para extração de sangue periférico. A coleta de sangue foi realizada por venopunção periférica de rotina. Em seguida, os leucócitos foram isolados por gradiente com Histopaque (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA): 3,0 mL de sangue periférico adicionados a 3,0 mL de solução Histopaque, com posterior centrifugação a 400xg durante 30 minutos. A seguir, o soro foi descartado e 200µl da camada enriquecida de leucócitos foram isolados. Estes leucócitos foram utilizados para extração do DNA utilizando o kit QIAmp DNA Blood (Qiagen, Valencia, CA, USA), conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Após a extração, as amostras de DNA foram quantificadas por microespectrofotometria UV, utilizando o equipamento Nano Vue (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Por fim, foi feita a amplificação do DNA por PCR para fragmento da região promotora do gene da Interleucina 10, a fim de checar a qualidade das amostras. As condições da reação de PCR estão apresentadas no Quadro 1.



**Quadro 1:** Condições das reações de PCR empregadas na amplificação de IL-10.

<i>Iniciadores</i>	<i>Condições da PCR</i>
Mok 2S – ATCCAAGACAACACTACTAA	100ng DNA; 2,5µl Buffer 10X; 0,25µl dNTP
Mok 2A - GTGGAAGAAGTTGAAATAAC	20mM; 1,5µl MgCl 50mM; 0,25µl Taq
Amplicon: ~123pb	polimerase 5U/µl; 1,0µl Iniciadores 10µM. H <sub>2</sub> O para volume final de 25µl. Termociclagem: 94°C – 30 min (1X); 94°C – 10s (1X); 94°C – 30s; 55°C – 30s; 72°C – 1 min (39X); 72°C – 5 min (1X); 4°C - ∞.

## **5.2. Linhagens Celulares**

Para controle de qualidade do kit de genotipagem de HLA de classe I e II, AB/DR/DQ SSP Unitray (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), foram realizadas inicialmente as genotipagens de amostras de DNA das linhagens celulares BC-1 e BC-3, cujos haplótipos de HLA foram previamente descritos<sup>48</sup>.

As linhagens BC-1 e BC-3 de PEL foram mantidas em cultura em meio RPMI 1640 contendo 10% de FBS e 0,4% de gentamicina. A contagem do número de células, a avaliação da viabilidade celular e a troca do meio de cultura eram realizadas a cada dois dias. Alcançado número suficiente de células -  $2 \times 10^6$  células e  $10 \times 10^6$  células para as linhagens celulares BC-1 e BC-3, respectivamente - foi realizada a extração de DNA de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI). Após extração de DNA, foram realizados quantificação e controle de qualidade conforme descrito anteriormente para as amostras de DNA dos voluntários.

### **5.3. Genotipagem de HLA classe I e II**

Para a tipagem dos genes HLA de classe I e II foi utilizado o kit AB/DR/DQ SSP Unitray (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Este método permite a genotipagem de baixa à média resolução, baseando-se na amplificação por PCR de fragmentos de alelos HLA específicos. O sistema consiste em uma placa de 96 poços na qual se encontram oligonucleotídeos iniciadores liofilizados capazes de identificar uma grande variedade de alelos HLA de classe I (A e B) e de classe II (DR e DQ).

Após validação, as amostras de DNA obtidas das linhagens celulares e de sangue periférico dos voluntários foram submetidas à amplificação por PCR de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante do kit. Para realização da genotipagem das amostras incluídas neste estudo, foram obtidos kits de dois lotes diferentes (Números 027 e 028). Assim sendo, a primeira placa de cada lote foi utilizada para genotipagem das linhagens celulares BC-1 e BC-3, respectivamente, já que o fabricante sugere que as genotipagens iniciais sejam feitas com amostras que tenham haplótipos de HLA previamente conhecidos.

Conforme sugerido pelo fabricante do kit AB/DR/DQ SSP Unitray, a concentração ideal de DNA utilizado na placa de 96 poços varia entre 75 e 125 ng/µl. A quantidade de DNA utilizada foi de aproximadamente 8,0µg distribuídos em 95 poços da placa do kit. Assim sendo, cada poço recebeu aproximadamente 85,0ng de DNA. Sete de nossas amostras possuíam concentrações de DNA inferiores ao recomendado pelo kit; no entanto, ao realizar a genotipagem destas amostras, observamos resultados igualmente

satisfatórios aos encontrados com as amostras de DNA com concentrações mais elevadas.

As condições da reação de PCR para amplificação dos genes de HLA classe I e II estão descritas no quadro a seguir.

**Quadro 2:** Condições das reações de PCR empregadas na amplificação de genes HLA classe I e II.

<i>Constituintes da reação</i>	<i>Condições da PCR</i>
PCR buffer: 580µl	Termociclagem: 96°C por 1 minuto (1x);
Enzima <i>Taq polimerase</i> : 9,3µl	96°C - 25s, 70°C - 50s; 72°C - 45s (5x);
DNA: 4,0 – 8,0µg/placa	96°C – 25s, 65°C – 50s, 72°C – 45s (21x);
H <sub>2</sub> O ultrapura: 348µl	96°C – 25s, 55°C – 60s, 72°C – 120s (4x);
Volume de reação distribuído a cada poço: 8,0µl	4°C - ∞.

Como conseguinte, foi realizada eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo para a análise do padrão de bandas de cada amostra. O padrão de bandas foi analisado com auxílio de planilha fornecida pelo fabricante do kit possibilitando a determinação dos haplótipos HLA de classe I e II de cada amostra.

#### **5.4. Análise *in silico* dos haplótipos HLA classe I e II dos 20 voluntários**

Com a finalidade de selecionar pelo menos 3 voluntários com alelos HLA de classe I e II capazes de apresentar epítomos originados das diferentes variantes da proteína K1 do KSHV, realizou-se uma análise detalhada empregando diferentes ferramentas de predição de epítomos. As análises *in silico* foram

realizadas avaliando as variantes de K1 cujas sequências, apresentadas no quadro 3, já foram isoladas em nosso laboratório.

**Quadro 3:** Genótipos do KSHV de linhagens celulares de nosso laboratório.

<i>Genótipos do KSHV</i>	<i>Linhagens celulares</i>	<i>Acesso GenBank<sup>1</sup></i>
Genótipo A	BC-1, BCP-1, <b>BCBL-1</b> , BCBL-B, BCBL-R	BCBL1: U86667 <sup>1</sup>
Genótipo B	VG-1, BC-5	K1-60/Ced: AF178825 <sup>1</sup>
Genótipo C	BC-2, <b>BC-3</b> , JSC-1	BC3: EU327770 <sup>1</sup>

\*As sequências de aminoácidos das proteínas K1 dos diferentes genótipos do KSHV das linhagens celulares apresentadas em negrito foram utilizadas nas análises *in silico*.

<sup>1</sup>O número de acesso no GenBank é referente às linhagens em negrito, utilizadas nas análises *in silico*.

As análises foram realizadas utilizando as ferramentas de predição de ligação de peptídeos às moléculas HLA (*HLA Peptide Binding Predictions*) disponibilizadas online nos endereços <http://www.syfpeithi.de> e [http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/), ferramentas amplamente utilizadas em diversos estudos na literatura<sup>49</sup>.

As plataformas fornecem sequências de peptídeos que possivelmente são apresentadas pelas moléculas HLA de classe I e II disponíveis para análise. As plataformas escolhidas baseiam-se em princípios de predição de epítomos diferentes. Enquanto o SYFPEITHI fornece um *score* cujo cálculo se baseia na localização dos aminoácidos componentes do peptídeo dentro da fenda de ancoragem nas moléculas HLA<sup>50</sup>, BIMAS fornece um *score* cujo cálculo é baseado na meia-vida de ligação do peptídeo à molécula HLA de classe I<sup>51</sup>. Além disso, a plataforma BIMAS permite apenas análise *in silico* de alelos HLA de classe I. Portanto, para comparar os resultados das duas plataformas, foram

considerados apenas os haplótipos HLA de classe I determinados para todos os voluntários incluídos no estudo.

Para que as moléculas codificadas pelos alelos observados após genotipagem fossem consideradas como possíveis apresentadoras de epítomos da proteína K1 do KSHV determinou-se como *score* mínimo (*cutoff*) o valor 20 para a plataforma SYFPEITHI, conforme descrito em outros trabalhos da literatura. Entretanto, para a plataforma BIMAS não se determinou um *score* mínimo (*cutoff*) específico, já que pode haver grande variabilidade observada ao analisar os dados obtidos nesta plataforma<sup>52,53</sup>.

Após análise *in silico* das moléculas HLA de classe I e II dos voluntários, foi possível prever quais os haplótipos que codificam moléculas HLA que potencialmente seriam capazes de apresentar de forma mais eficiente epítomos das diferentes isoformas da proteína K1 do KSHV.

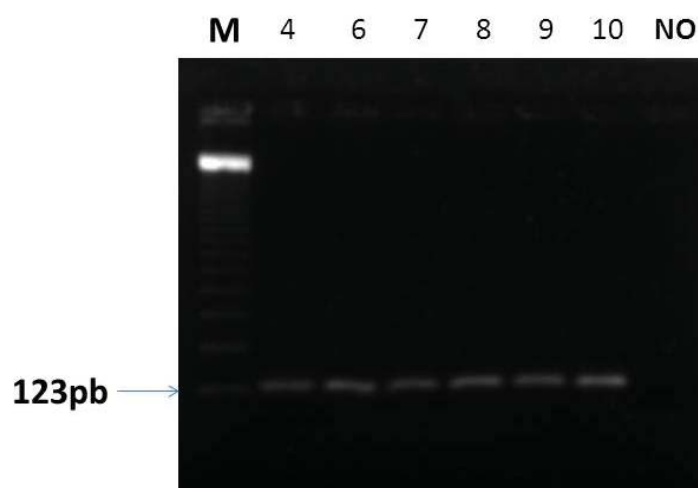
# *Resultados*

---

## 6. Resultados

### 6.1. Extração e checagem da qualidade do DNA das amostras de sangue periférico dos voluntários

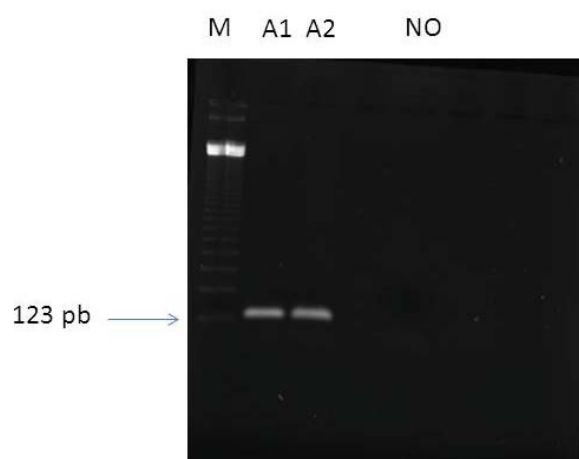
As amostras de DNA extraído do sangue periférico dos voluntários selecionados foram submetidas a PCR convencional para amplificação de fragmento do promotor do gene da Interleucina 10 (IL-10), conforme ilustrado na Figura 1, para validação da extração do DNA. As 20 amostras de DNA apresentaram-se com boa qualidade, portanto, adequadas para posterior genotipagem de HLA de classe I e II.



**Figura 1:** Gel de agarose 2% com resultado da PCR para amplificação do gene do promotor da IL-10 para validação do DNA extraído do sangue periférico dos voluntários recrutados. Tamanho do amplicon: ~123 pb. (4 – 10): DNA dos voluntários 4, 6 a 10; (NO): controle negativo sem DNA; (M): marcador de peso molecular 123 pb.

### 6.2. Extração de DNA das linhagens celulares BC-1 e BC-3

As células BC-1 e BC-3 foram mantidas em cultura até atingirem densidade suficiente para extração de DNA. Para validação da extração, foi realizada reação de PCR em que foi utilizado DNA destas linhagens celulares na concentração de 115ng/μl para BC-1 e 120ng/μl para BC-3. Ambas as amostras de DNA apresentaram amplificação adequada do fragmento da região promotora de IL-10, conforme ilustrado na Figura 2.



**Figura 2:** Gel de agarose 2% com resultado da PCR para amplificação de fragmento do promotor do gene da IL-10 para validação do DNA extraído das linhagens celulares BC-1 e BC-3. Tamanho do amplicon: ~123 pb. (A1): DNA da linhagem celular BC-1; (A2): DNA da linhagem celular BC-3; (NO): controle negativo sem DNA; (M): marcador de peso molecular 123 pb.

### **6.3. Genotipagem HLA de classe I e II das células BC-1 e BC-3**

Após a validação da extração de DNA, as amostras foram submetidas à PCR para tipagem dos genes HLA de classe I e II segundo protocolo fornecido junto ao kit AB/DR/DQ SSP Unitray (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Os haplótipos HLA obtidos com a análise do padrão de bandas observadas nos géis de agarose após eletroforese estão apresentados no quadro 4. Estes haplótipos corroboram os dados descritos por Brander *et al* (2000)<sup>48</sup>.

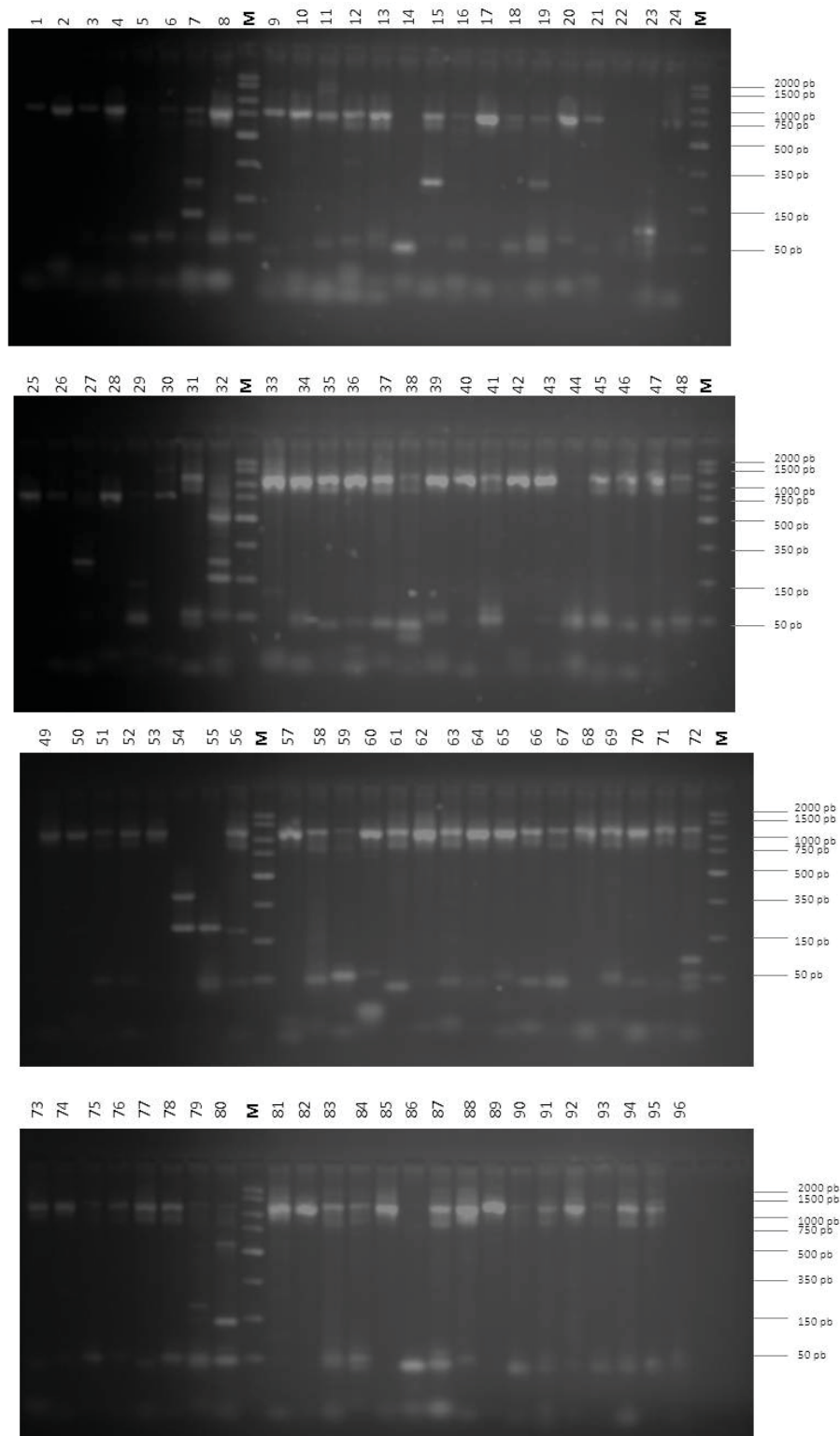


**Quadro 4:** Haplótipos HLA de classe I e II das linhagens celulares BC-1 e BC-3.

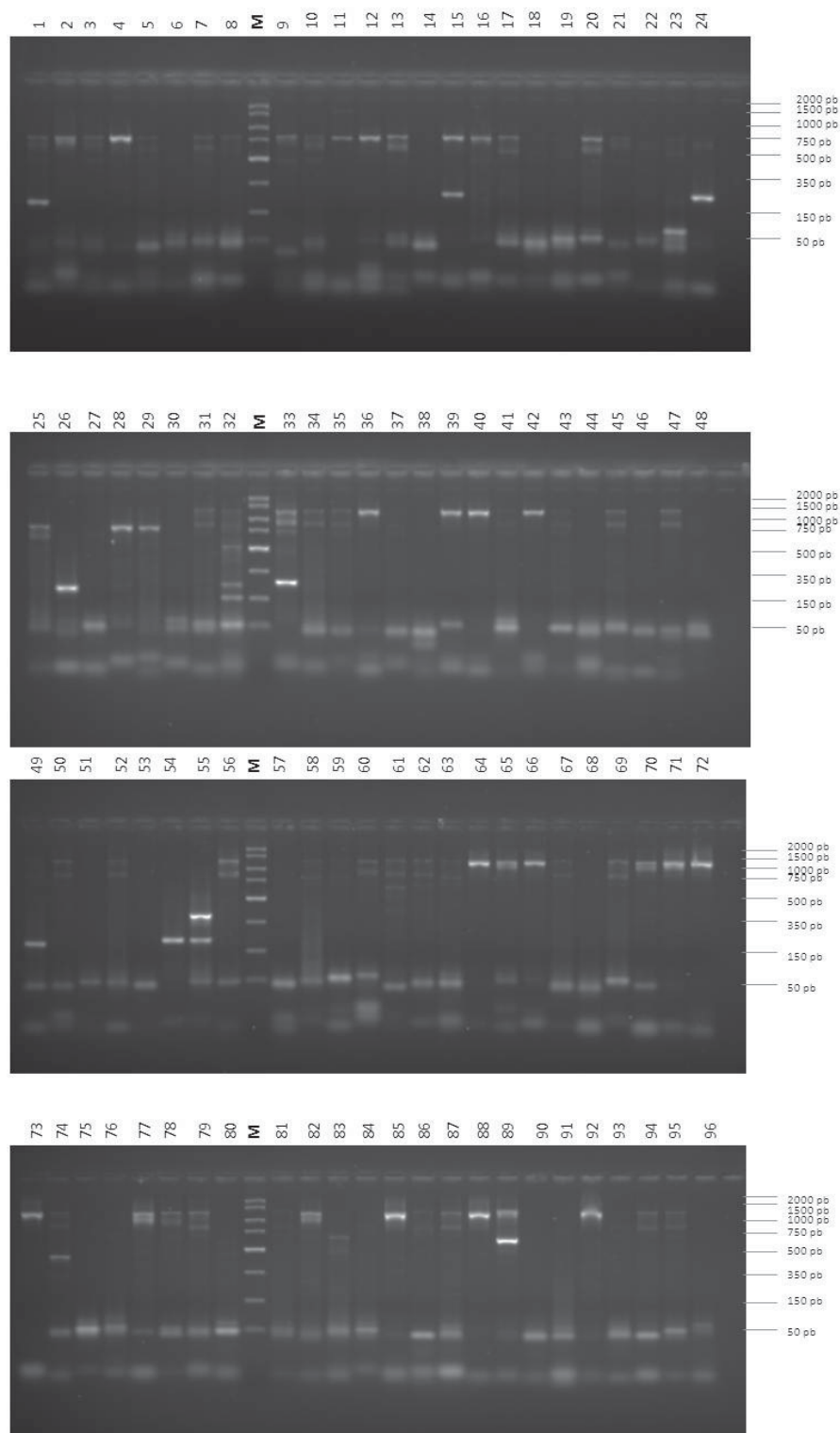
<b>HLA</b>	<b>DR</b>	<b>DQ</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>BC-1</b>	DR4 / DR7	DQ8 / DQ7,8	A*022202 / A*022202	B44 / B44
<b>BC-3</b>	DR1 / DR7	DQ2 / DQ5	A2 / A3	B64 / B75

\*No quadro acima, os alelos de cada linhagem estão separados por /.

Nas figuras 3 e 4 estão apresentadas as fotos dos géis de agarose 2% contendo o padrão de bandas das linhagens BC-1 e BC-3, respectivamente.



**Figura 3:** Gel de agarose 2% com padrões de banda da linhagem celular BC-1. Os géis apresentam corretamente as bandas de controle interno do kit - colunas 1 a 30: ~800pb; colunas 31 a 53 e 56 a 95: ~1200pb; colunas 54 e 55: ~200pb. (M): marcador de peso molecular 50-2000pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); (96): controle negativo sem DNA.

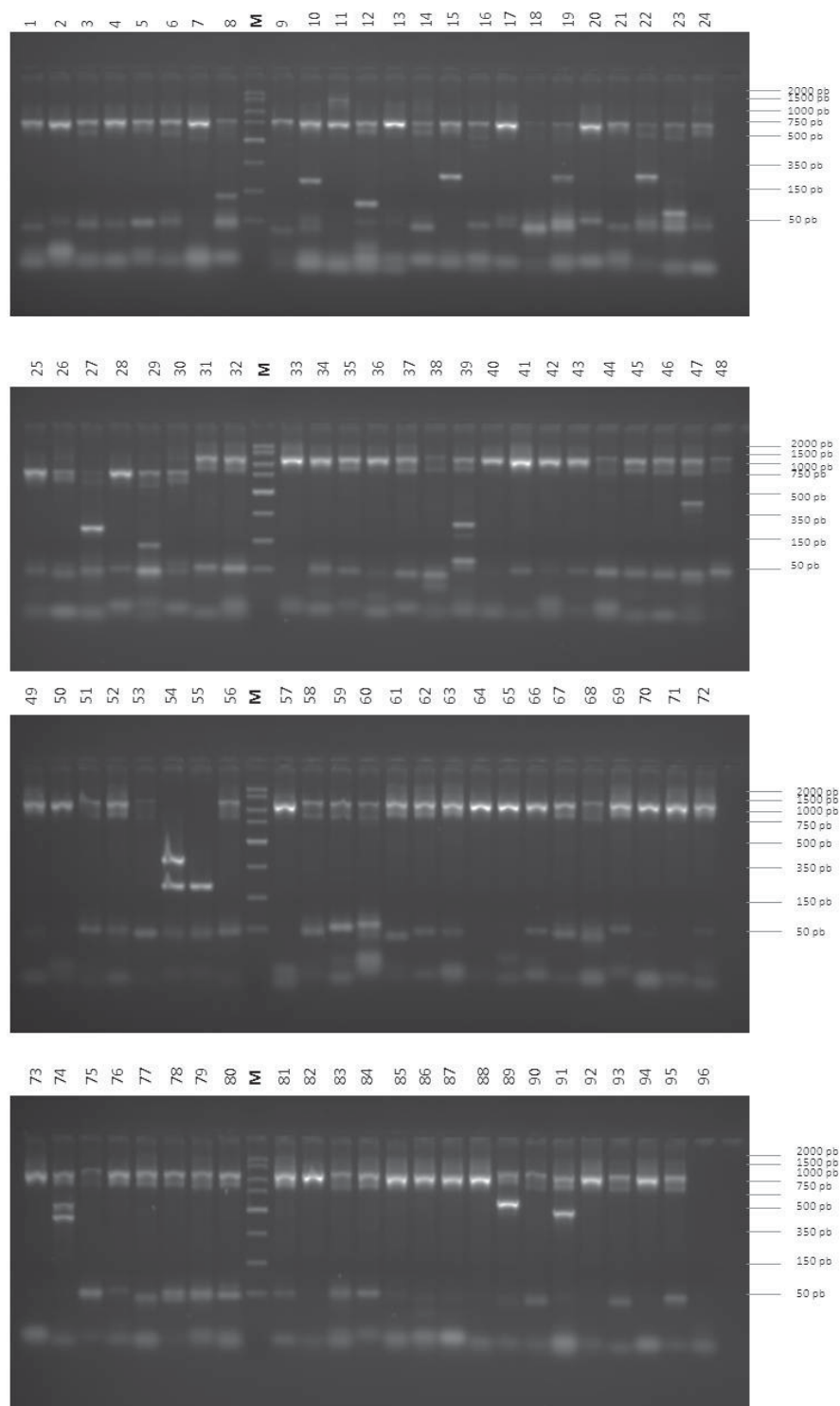


**Figura 4:** Gel de agarose 2% com padrões de banda da linhagem celular BC-3. Os géis apresentam corretamente as bandas de controle interno do kit - colunas 1 a 30: ~800pb; colunas 31 a 53 e 56 a 95: ~1200pb; colunas 54 e 55: ~200pb. (M): marcador de peso molecular 50-2000pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); (1-95): colunas com DNA amplificado; (96): controle negativo sem DNA.

#### **6.4. Genotipagem HLA de classe I e II das amostras dos 20 voluntários recrutados**

Após a validação por PCR, as amostras de DNA extraídas do sangue periférico dos 20 voluntários selecionados foram submetidas a PCR em placa de 96 poços para determinação dos alelos HLA de classe I e II. Todas as amostras apresentaram as bandas de controle interno do kit AB/DR/DQ SSP Unitray – colunas 1 a 30: ~800 pb; colunas 31 a 53 e 56 a 95: ~1200pb; colunas 54 e 55: ~200pb. A coluna 96 consiste no controle negativo da reação (ausência de DNA) e a ausência de contaminação garante a qualidade da reação. Observou-se em todas as amostras a presença de dímeros formados pelos iniciadores na coluna 96.

Não foram observadas diferenças no padrão de amplificação do DNA entre os dois lotes utilizados do kit AB/DR/DQ SSP Unitray. Na Figura 5, observa-se um gel representativo de todas as amostras obtidas dos voluntários recrutados. As bandas analisadas encontram-se entre as bandas de controle interno do kit e as bandas de 50pb, que o fabricante considera como excesso de iniciadores.



**Figura 5:** Gel de agarose 2% representativo com padrões de banda da amostra do voluntário 2. Os géis apresentam corretamente as bandas de controle interno do kit - colunas 1 a 30: ~800pb; colunas 31 a 53 e 56 a 95: ~1200pb; colunas 54 e 55: ~200pb. (M): marcador de peso molecular 50-2000pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); (1-95): colunas com DNA amplificado; (96): controle negativo sem DNA.

### 6.5. Determinação dos alelos HLA de classe I e II dos 20 voluntários

Após a realização das reações de PCR e eletroforese em gel de agarose 2%, realizou-se a análise do padrão de bandas e determinação dos haplótipos HLA de classe I e II de cada voluntário a partir de uma planilha de análise fornecida pelo fabricante do kit. Os resultados da genotipagem podem ser observados na tabela 1.

**Tabela 1:** Haplótipos HLA de classe I e II dos voluntários recrutados.

<b>Amostra #</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>DR</b>	<b>DQ</b>
1 <sup>a</sup>	A3 / <b>A66</b>	B51 / B59	-	DQ5 / DQ5
2	A26,-,A10,Null / A26	B38 / B16	DR7,-,Null / DR11	DQ7,-,DQ8 / DQ9
3 <sup>a</sup>	A1 / A23	<b>B8 / B44</b>	-	DQ2 / DQ7,DQ8
4 <sup>a</sup>	A1, Null,- (A*010107) / <b>A24</b> ( <b>A*240226</b> )	<b>B8,-,Null</b> / B60	DR17,-,DR3 (DRB1*030106/46) / DR8,- (DRB1*0836)	DQ2,- (DQB1*020101-05) / DQ4,- (DQB1*040101-0204)
5 <sup>a</sup>	<b>A24</b> / A30	<b>B18 / B18</b>	DR8 / DR52	DQ2 / DQ4
6 <sup>a</sup>	A*022202 / <b>A66 (A*6602-03/05/10)</b>	<b>B18 (B*180702/29)</b> / B35	DR17,-,DR3 (DRB1*030106/46) / DR13	DQ2,- / DQ6,- ,DQ1,Null
7	A68 / A68	B39 / B51	-	DQ5 / DQ5
8 <sup>a</sup>	A*022202 / <b>A66</b>	B*5828 / Cw*020207 , Cw*050106	-	DQ2,- / DQ6,- ,DQ1,Null (DQB1*060101-39)
9	A26 (A*260116) / A68 (A*6848-50)	B55 / B56	-	DQ7,-,DQ8 / DQ8,-
10 <sup>a</sup>	<b>A*022202</b> / <b>A*022202</b>	B71,-,B70 (B*151001-1002/1801-1804) / B81,-,Null (B*9586)	DR14 (DRB1*1494) / DR52	DQ4,- (DQB1*040101-0204) / DQ6,-,DQ1,Null (DQB1*060101-39)
11 <sup>a</sup>	A11 / A26	B39 (B*3950) / <b>B81,-,Null (Cw*1230)</b>	DR11 / DR52	DQ7,-,DQ8 / DQ7,-,DQ8
12 <sup>a</sup>	A31 / A68 (A*6848-50)	B35 / <b>B81,-,Null</b>	-	DQ2,- / DQ7,-,DQ8
13 <sup>a</sup>	<b>A2</b> / A33	<b>B18 / B44</b>	-	DQ2/ DQ7,-,DQ8
14 <sup>a</sup>	<b>A24</b> / A26	<b>B44,-,B12,Null</b>	-	DQ2 / DQ7

<b>Amostra #</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>DR</b>	<b>DQ</b>
		(B*440208/37/42/91) / B50,-,B45		
15	A*022202 / A26	B7,-,B703,Null / Cw*07140	-	DQ2,- / DQ6,- ,DQ1,Null
16 <sup>a</sup>	A*022202 / A*022202	B13 / B57	-	DQ5 / DQ6,DQ1,Null
17 <sup>a</sup>	A2 / A68	B75 / B53	DR11 / DR14	DQ7,DQ8 / DQ6,DQ1,Null
18 <sup>a</sup>	A*022202 / A26	B8 / B51	-	DQ2 / DQ8
19 <sup>a</sup>	A1 / A*022202	B27 / B75	DR7,-,Null / DR53,- ,DR51,Null	DQ2 / DQ8
20 <sup>a</sup>	A68,- / A2	B18 / B18	DR14 / DR52	DQ5,- / DQ6,-,DQ1, Null

<sup>a</sup> Voluntários recrutados com haplótipos descritos na literatura como possíveis apresentadores de epítomos da proteína K1 do KSHV.

\*Os alelos de cada *locus* obtidos para cada doador estão separados por /.

### 6.6. Análise *in silico*

Após a determinação dos haplótipos HLA de classe I e II de cada voluntário recrutado foram iniciadas as análises detalhadas de cada alelo com o uso das ferramentas de predição de ligação de peptídeos às moléculas HLA - BIMAS e SYFPEITHI, a fim de selecionar ao menos 3 voluntários capazes de apresentar diferentes epítomos das diferentes isoformas da proteína K1 do KSHV. Como citado anteriormente, a plataforma BIMAS permite apenas análise de moléculas HLA de classe I, por isso, nossas análises *in silico* restringiram-se aos alelos HLA de classe I de cada voluntário.

Os resultados obtidos nas duas plataformas foram comparados e podem ser observados na tabela 2.

**Tabela 2:** Análise *in silico* das moléculas HLA de classe I utilizando as plataformas de predição de epítomos BIMAS e SYFPEITHI para identificação de bons apresentadores de epítomos da proteína viral K1 do KSHV.

HLA	Posição do aminoácido	Score		Genótipo de K1
		BIMAS	SYFPEITHI	
A1	274	1.250	26	A3
	268	6.250	29	B
	133	1.250	26	C3
A2	237	23.995	25	A3
	1	309.050	28	B
	41	9.563	26	C3
	81	270.234	25	C3
	96	23.995	25	C3
	211	13.500	25	A3
A3	195	40.000	29	B
	107	3.000	24	C3
	208	1.000	26	A3
A11	211	9.000	21	A3
	189	0.800	28	B
	195	0.800	23	B
	67	1.000	26	C3
	-	-	-	-
A24	231	9.000	21	A3
	19	300.000	20	A3
	1	42.000	20	A3
	231	9.000	21	B
	90	9.000	21	C3
A26	135	-	33	A3
	230	-	27	B
	89	-	27	C3
A30	-	-	-	-
A31	125	6.000	-	A3
	189	6.000	-	B
	24	4.000	-	C3
A33	-	-	-	-
A66	-	-	-	-
A68	208	30.000	24	A3
	54	90.000	19	A3
	189	100.000	18	B
	67	30.000	25	C3
	70	720.000	20	C3
-	-	-	-	A3
B7	13	80.000	22	B
	40	8.000	21	B
	227	80.000	21	B
	205	4.000	20	B
	-	-	-	-
B8	217	8.000	23	A3
	139	4.000	22	A3
	260	4.000	22	A3
	13	16.000	28	B
	260	4.000	22	B



HLA	Posição do aminoácido	Score		Genótipo de K1
		BIMAS	SYFPEITHI	
	11	16.000	21	B
	40	4.000	20	B
	193	0.400	20	B
	71	0.200	23	C3
	76	8.000	23	C3
	3	4.000	22	C3
	119	4.000	22	C3
<b>B13</b>	-	-	-	-
	227	180.000	22	A3
	193	15.000	21	A3
	223	120.000	20	A3
<b>B16 (B*3901)</b>	19	180.000	22	B
	196	7.500	22	B
	57	27.000	21	B
	223	60.000	20	B
	64	90.000	23	C3
	86	180.000	22	C3
	134	-	21	A3
<b>B18</b>	-	-	-	B
	-	-	-	C3
<b>B27</b>	-	-	-	-
	28	40.000	-	A3
<b>B35</b>	13	60.000	-	B
	123	40.000	-	C3
	227	39.000	22	A3
<b>B38 (B*3801)</b>	19	30.000	21	B
	86	39.000	22	C3
	64	30.000	20	C3
	134	-	22	A3
<b>B44 (B*4402)</b>	187	-	18	B
	89	-	16	C3
<b>B50</b>	-	-	-	-
	24	400.000	24	A3
	129	380.666	24	A3
	217	484.000	23	A3
<b>B51</b>	62	242.000	22	A3
	24	520.000	25	B
	76	484.000	24	C3
	43	200.000	21	C3
	65	100.000	20	C3
<b>B53</b>	-	-	-	-
<b>B55</b>	-	-	-	-
<b>B56</b>	-	-	-	-
<b>B57</b>	-	-	-	-
	119	96.000	-	A3
<b>B58 (B*5801)</b>	79	160.000	-	B
	52	52.800	-	C3

HLA	Posição do aminoácido	Score		Genótipo de K1
		BIMAS	SYFPEITHI	
B59	-	-	-	-
B60	-	-	-	A3
	187	17.600	20	B3
	-	-	-	C3
B71	-	-	-	-
B75	-	-	-	-
B81	-	-	-	-
Cw*020207, Cw*050106	-	-	-	-
Cw*07140	-	-	-	-
Cw*1230	-	-	-	-

\*(-): alelos que não estavam disponíveis para análise em uma ou nas duas plataformas utilizadas.

\*HLA: haplótipos HLA de classe I obtidos após genotipagem dos voluntários recrutados.

\*Posição do aminoácido: posição dentro da sequência completa de aminoácidos da proteína viral K1 em que se iniciam os diferentes peptídeos de 9 aminoácidos (nanômeros).

\*Score: BIMAS – determinado pela análise da meia-vida de ligação do peptídeo à molécula HLA de classe I; SYFPEITHI – baseado na localização dos aminoácidos em posições específicas da fenda de ancoragem dos peptídeos nas moléculas HLA de classe I.

## *Discussão*

---

## 7. Discussão

O KSHV pode ser classificado em diferentes genótipos de acordo com variações nucleotídicas presentes na sequência de seu genoma, inclusive na região da ORF-K1<sup>11,24</sup>. Assim sendo, epítomos distintos são gerados a partir dos diferentes genótipos do KSHV e apresentados pelas moléculas HLA de classe I e II aos linfócitos T CD<sub>8</sub><sup>+</sup> e T CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, respectivamente. No entanto, não existem dados de predição de epítomos envolvendo as diferentes variantes da proteína K1 do KSHV. Isso torna o objetivo deste estudo original, no sentido de buscar a identificação de alelos HLA de classe I que codificam moléculas capazes de apresentar peptídeos originados das diferentes isoformas de K1.

Os resultados obtidos baseados apenas na observação dos genótipos determinados para cada voluntário indicaram a presença de 15 indivíduos (amostras marcadas com a letra <sup>a</sup> na tabela 1) com haplótipos HLA de classe I descritos na literatura como possíveis apresentadores de peptídeos da proteína K1 do KSHV: HLA-A2; HLA-A24; HLA-A 66; HLA-B8; HLA-B18; HLA-B81 e HLA-B44<sup>54</sup>. No entanto, essa observação apenas oferece indícios de quais voluntários seriam bons doadores de células mononucleares precursoras de células dendríticas capazes de apresentar peptídeos de K1. Este resultado não é suficiente para determinar se essas moléculas HLA são de fato capazes de apresentar K1, sendo necessários ensaios experimentais que corroborem as análises preditivas.

Assim sendo, foi realizada análise *in silico* a fim de avaliar mais detalhadamente os haplótipos de cada voluntário selecionado. Foram analisadas três isoformas da proteína K1 derivadas de 3 genótipos do KSHV -

variantes A3, B e C3 - para cada alelo HLA de classe I encontrado. Os haplótipos HLA de classe II não foram considerados na análise *in silico*, já que apenas a plataforma SYFPEITHI possuía alelos classe II para análise, não sendo possível a comparação entre as duas plataformas.

Como apresentado na tabela 2, nem todos os alelos determinados para os 20 indivíduos encontravam-se disponíveis para análise em uma ou em ambas as plataformas, inclusive alguns que já foram descritos na literatura como bons apresentadores de epítomos da proteína K1 do KSHV, como é o caso dos alelos: HLA-A66 e HLA-B8<sup>51</sup>. Outras duas moléculas - HLA-B18 e HLA-B44<sup>51</sup> - descritas também como boas apresentadoras estavam disponíveis apenas em uma plataforma - SYFPEITHI, tornando a comparação de resultados inviável.

Ao observar os resultados, pode-se perceber que os epítomos gerados a partir da variante B da proteína K1 do KSHV possuem maior afinidade com as diversas moléculas HLA analisadas, apresentando *scores* próximos a 30 na plataforma SYFPEITHI, considerado bom score e indicativo de alta afinidade<sup>52,53</sup>. Os peptídeos indicados com elevados *scores* na plataforma SYFPEITHI são os mesmos apresentados pela plataforma BIMAS. As moléculas para as quais esse resultado foi observado são: HLA-A1 com score 29 para o epítomo que começa na posição 268 da sequência de aminoácidos da proteína viral de grupo B; HLA-A2 com score 28 para o epítomo que começa na posição 1; HLA-A3 com score 28 para o epítomo que começa na posição 195; HLA-A11 com score 28 para o epítomo que começa na posição 189; HLA-B8 com score 28 para o epítomo que começa na posição 13 e HLA-B51 com score 25 para o epítomo que começa na posição 24.

Alguns alelos, no entanto, apresentaram scores mais elevados para a variante A3 da proteína K1 do KSHV, como é o caso do alelo HLA-A26. O peptídeo com maior afinidade por esta molécula inicia-se no aminoácido localizado na posição 135 da sequência de aminoácidos da proteína viral e apresenta score 33 na plataforma SYFPEITHI, um dos mais altos scores observados em nossa análise.

Já para a molécula HLA-A68, o epítipo de maior afinidade é derivado da variante C3 da proteína K1 do KSHV. Nesse caso, as análises nas duas plataformas são bastante interessantes, pois ambas apresentam as mesmas sequências de aminoácidos com scores elevados. Entretanto, o primeiro e segundo epítipos de maior afinidade encontram-se em posições invertidas nas listas geradas pelas plataformas utilizadas. O epítipo que começa na posição 67 possui o score mais elevado na plataforma SYFPEITHI - 25, e o segundo *score* da plataforma BIMAS - 30.000. O epítipo que começa na posição 70, por sua vez, apresenta o *score* 20 na plataforma SYFPEITHI e o maior *score* da plataforma BIMAS - 720.000. Esse seria um exemplo bastante explicativo do porque não conseguimos determinar um *score* mínimo (*cutoff*) para a plataforma BIMAS.

Resultados bastante interessantes foram observados para as moléculas HLA-A24, HLA-B18 e HLA-B44, descritas na literatura como apresentadoras eficientes da proteína K1 do KSHV<sup>51</sup>. Apesar dos dados descritos na literatura para estas moléculas no que diz respeito à capacidade de apresentarem peptídeos de K1, a análise *in silico* realizada no presente estudo demonstrou *scores* próximos ao *score* mínimo (*cutoff*) - 21 para a molécula HLA-A24 com relação às 3 isoformas da proteína viral K1; a molécula HLA-B18 obteve *score*

21 para a variante A3 de K1 e *score* 18 para peptídeos derivados dos genótipos B e C. Para a molécula HLA-B44, observamos *score* 22 para o peptídeo derivado do genótipo A de K1, *score* 18 para epítipo do genótipo B e *score* 16 para epítipo do genótipo C de K1. Os resultados foram similares para as diferentes isoformas da proteína viral. Portanto, os *scores* são significativamente mais baixos ao se comparar estas moléculas HLA com outras avaliadas em nosso estudo e que ainda não foram descritas como boas apresentadoras da proteína K1 do KSHV.

Os alelos HLA-B16 e HLA-B38, por sua vez, apresentaram *scores* semelhantes entre as diferentes isoformas da proteína viral em ambas as plataformas. A molécula HLA-B58 estava disponível para análise apenas na plataforma BIMAS e os resultados indicaram que o epítipo proveniente do genótipo B do KSHV que começa na posição 79 da sequência de aminoácidos seria o de maior afinidade (*score* 160.000).

Em suma, observou-se que uma mesma molécula HLA de classe I, pode ser capaz de apresentar epítipos provenientes de diferentes isoformas da proteína K1 do KSHV. Apesar das limitações do nosso estudo, pode-se dizer que ao menos 9 indivíduos avaliados seriam bons apresentadores de peptídeos de K1, por apresentarem ambas as moléculas HLA-A e HLA-B com elevada afinidade a estes epítipos (vide tabela 3).

**Tabela 3:** Voluntários portadores de haplótipos HLA de classe I apontados na análise *in silico* como bons apresentadores de epítipos da proteína K1 do KSHV.

<i>Amostra #</i>	<i>HLA-A</i>	<i>HLA-B</i>	<i>Genótipo do KSHV</i>
1**	A3	B51	B
2**	A26	B38 / B16	A3, B e C3
3**	A1	B8 / B44	A3, B

<b>Amostra #</b>	<b>HLA-A</b>	<b>HLA-B</b>	<b>Genótipo do KSHV</b>
4**	A1 / A24	B8	A3, B e C3
5**	A24	B18	A3, B e C3
6	-	B18	A3
9	A26	-	A3
10	A2	-	B
11	A26	-	A3
12	A68	-	C3
13**	A2	B18 / B44	A3 e B
14**	A24 / A26	B44	A3, B e C3
15	A2 / A26	-	B
16	A2	-	B
17	A2 / A68	-	B e C3
18**	A2 / A26	B8	A3 e B
19	A1 / A2	-	B
20**	A2 / A68	B18	A3, B e C3

**HLA:** HLA de classe I com predição de afinidade elevada aos epítomos gerados a partir de diferentes isoformas da proteína viral K1.

**Genótipo do KSHV:** variantes da proteína viral K1 derivada dos diferentes genótipos do KSHV, que geram epítomos cuja predição de ligação às moléculas HLA de classe I apresenta-se elevada nos voluntários recrutados.

(-): moléculas HLA não disponíveis para análise em ambas as plataformas.

\*\* : Ambas as moléculas HLA-A e HLA-B apresentam elevada afinidade aos epítomos da proteína viral K1.

Como apresentado na tabela 3, observamos prevalência de algumas moléculas HLA de classe I para nossa população de estudo - HLA-A1, HLA-A2, HLA-A24, HLA-A26, HLA-A68, HLA-B8, HLA-B18, HLA-B44, o que favorece os estudos posteriores, já que uma ampla gama de voluntários está disponível para posterior seleção como doadores. Além disso, os resultados indicaram que grande parte das moléculas HLA de classe I analisadas apresentam elevada afinidade de ligação de epítomos provenientes da proteína K1 do genótipo B do KSHV.

Vale ressaltar que esses achados, apesar de limitados, suportam a ideia de que algumas das moléculas HLA de classe I analisadas possivelmente são



capazes de apresentar de forma eficiente peptídeos de K1. Porém, não garantem total segurança na seleção dos indivíduos considerados bons apresentadores, já que as análises realizadas são preditivas e não foram validadas com ensaios experimentais. Portanto, seria de grande valia a realização de ensaios de linfoproliferação<sup>45,46,47</sup> de linfócitos T e caracterização da produção de citocinas, para que seja possível avaliar *in vitro* as propriedades imunobiológicas destas moléculas HLA. Somente assim é possível constatar a capacidade de cada molécula HLA avaliada neste estudo em apresentar de maneira eficiente os diferentes epítomos gerados a partir de variantes dos genótipos A, B e C da proteína K1 do KSHV.

*Conclusão*

---

## 8. Conclusão

Ao final do presente estudo podemos concluir:

1. Após genotipagem de HLA, foi observada maior prevalência de HLA-A1, HLA-A2, HLA-A24, HLA-A26, HLA-B8, HLA-B18 e HLA-B44 nos indivíduos voluntários avaliados;
2. A análise *in silico* revelou que moléculas HLA-A1, HLA-A3, HLA-A11, HLA-B16, HLA-B38 e HLA-B51 seriam potencialmente capazes de apresentar epítomos derivados da proteína K1 do KSHV;
3. Scores mais elevados na análise *in silico* foram observados para epítomos de genótipo B do KSHV;
4. Ao menos 9 dos 20 indivíduos analisados são potencialmente bons apresentadores de peptídeos de K1, já que ambas as moléculas HLA-A e HLA-B demonstraram elevada afinidade a esses epítomos. Entretanto, por se tratar de análises preditivas, a realização de ensaios *in vitro* que determinam resposta à apresentação eficiente de epítomos de K1 do KSHV gerados a partir das variantes A3, B e C3 é estritamente necessária para confirmação destes dados.

## *Referências Bibliográficas*

---

## 9. Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Dourmishev LA, Dourmishev AL, Palmeri D, Schwartz RA, Lukac DM. Molecular genetics of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Epidemiology and Pathogenesis. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2003 Jun; 67(2):175-212. Review.
- <sup>2</sup> Schwartz RA. Kaposi's sarcoma: An Update. **J Surg Oncol.** 2004 Sep 1; 87(3):146-151. Review.
- <sup>3</sup> Siegel JH, et al. Disseminated visceral Kaposi's sarcoma. Appearance after human renal homograft operation. **JAMA.** 1969; (207):1493-1496.
- <sup>4</sup> Duman SH, Toz G, Asci S, et al. Successful treatment of postranplant Kaposi's Sarcoma by reduction of immunosuppression. **Nephrol Dial Transplant.** 2002; (17):892-896.
- <sup>5</sup> Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. **Nat Rev Cancer.** Oct 2010; (10)10:707-19.
- <sup>6</sup> Martro E, et al. Risk factors for Human Herpesvirus 8 infection and AIDS-associated Kaposi's sarcoma among men who have sex with men in a European multicenter study. **Int J Cancer.** 2004; (120):1129-1135.
- <sup>7</sup> Wilkinson J, Cope A, Gill J, Bourboulia D, Hayes P, Inami N, Kubo T, Marcelin A, Calvez V, Weiss R, Gazzard D, Boshoff C, Gotch F. Identification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) – specific cytotoxic T-lymphocyte epitopes and evaluation of reconstitution of KSHV-specific responses in human immunodeficiency virus type 1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. **J Virol.** 2002; (76):2634-2640.
- <sup>8</sup> Chang I, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore OS. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **Science.** 1994; (266):1865-1869.
- <sup>9</sup> Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. **N Engl J Med.** 1995; (332):1186-1191.
- <sup>10</sup> Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, Cacoub P, Cazals-Hatem D, Babinet P, d'Agay MF, Clauvel JP, Raphael M, Degos L, et al. Kaposi's sarcoma herpesvirus-like DNA sequences in Multicentric Castleman's disease. **Blood.** 1995; (86):1276-1280.
- <sup>11</sup> Edelman DC. Human Herpesvirus 8 - A novel human pathogen. **Virol J.** 2005 Sep; 2:78. Review.
- <sup>12</sup> Aresté C, Blackbourn DJ. Modulation of the immune system by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **Trends Microbiol.** 2009 Mar; 17(3):119-29.
- <sup>13</sup> Viejo-Borbolla A, Schulz TF. Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV): Key aspects of Epidemiology and Pathogenesis. **AIDS Rev.** 2003 Oct-Dec; 5(4):222-9. Review.
- <sup>14</sup> Boshoff C, Schultz TF, Kennedy MM, Graham AK, Fisher C, Thomas A, McGee JO, Weiss RA, O'Leary JJ. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. **Nat Med.** 1995; 1(12):1274-1278.

- 
- <sup>15</sup> Rappocciolo G, Jenkins FJ, Hensler HR, Piazza P, Jais M, Borowski L, Watkins SC, Rinaldo CR Jr. DC-SIGN is a receptor for human herpesvirus 8 on dendritic cells and macrophages. **J Immunol.** 2006 Feb1; 176(3):1741-9.
- <sup>16</sup> Blasig C, Zietz C, Haar B, Neipel F, Esser S, Brockmeyer NH, Tschachler E, Colombini S, Ensoli B, Sturzl M. Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8. **J Virol.** 1997; 71(10):7963-7968.
- <sup>17</sup> Renne R, Blackbourn D, Whitby D, Levy J, Ganem D. Limited transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. **J Virol.** 1998; 72(6):5182-5188.
- <sup>18</sup> Renne R, Lagunoff M, Zhong W, Ganem D. The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions. **J Virol.** 1996; (70):8151-8154.
- <sup>19</sup> Renne R, Zhong W, Herndier B, McGrath, Abbey N, Kedes D, Ganem D. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. **Nat Med.** 1996; (2):342-346.
- <sup>20</sup> Ballestas ME, Chatis PA, Kaye KM. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. **Science.** 1999; (284):641-644.
- <sup>21</sup> Li M, Lee H, Yoon DW, Albrecht JC, Fleckenstein B, Neipel F, Jung JU. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. **J Virol.** 1997; (71):1984-1991.
- <sup>22</sup> Muralidhar S, Veytsmann G, Chandran B, Ablashi D, Doniger J, Rosenthal LJ. Characterization of the human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) oncogene, kaposin (ORF-K12). **J Clin Virol.** 2000; (16):203-213.
- <sup>23</sup> Liu L, Eby MT, Rathore N, Sinha SK, Kumar A, Chaudhary PM. The human herpesvirus 8 encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the I $\kappa$ B kinase complex. **J Biol Chem.** 2002; (277):13745-13751.
- <sup>24</sup> Whitby D, Marshall VA, Bagni RK, Wang CD, Gamache CJ, Guzman JR, Kron M, Ebbesen P, Biggar RJ. Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. **J Gen Virol.** 2004 Jan; 85(Pt 1):155-163.
- <sup>25</sup> Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F. Human Herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. **J Infect Dis.** 2000 May; 181(5):1562-8.
- <sup>26</sup> Hayward GS. KSHV strains: the origins and global spread of the virus. **Semin Cancer Biol.** 1999 Jun; 9(3):187-99.
- <sup>27</sup> 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. **Mol Cell Biol.** 1998; (18):5219-28.
- <sup>28</sup> Cambier JC. Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). **J Immunol.** 1995; (155):3281-5.

- <sup>29</sup> Wang L, Wakisaka N, Tomlinson CC, DeWire SM, Krall S, Pagano JS, Damania B. The Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) K1 protein induces expression of angiogenic and invasion factors. **Cancer Res.** 2004 Apr 15; 64(8):2774-81.
- <sup>30</sup> Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer.** 2002; (2):161-74.
- <sup>31</sup> Samaniego F, Pati S, Karp JE, Prakash O, Bose D. Human Herpesvirus 8 K1-associated nuclear factor-kappa B-dependent promoter activity: role in Kaposi's sarcoma inflammation? **J Natl Cancer Inst Monogr.** 2001; (28):15-23.
- <sup>32</sup> Prakash O, Tang ZY, Peng X, Coleman R, Gill J, Farr G, Samaniego F. Tumorigenesis and aberrant signaling in transgenic mice expressing the Human Herpesvirus 8 K1 gene. **J Natl Cancer Inst.** 2002 Jun 19; 94(12):926-35.
- <sup>33</sup> Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. **New Engl J Med.** Sep 2000; 343(10):702-709.
- <sup>34</sup> Howell VW, Carter V, Clark B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. **J Clin Pathol.** 2010 May; 63(5):387-90.
- <sup>35</sup> Norman PJ, Parham P. Complex interactions: the immunogenetics of human leukocyte antigen and killer cell immunoglobulin-like receptors. **Semin Hematol.** 2005 Apr; 42(2):65-75
- <sup>36</sup> Kaer LV, et al. Major Histocompatibility Complex class I-restricted antigen processing and presentation. **Tissue Antigens.** 2002 Jul; (60)1:1-9. Review
- <sup>37</sup> Kirschner D, Chang ST, Riggs TW, Perry N, Linderman JJ. Toward a multiscale model of antigen presentation in immunity. **Immunol Rev.** 2007 Apr; 216:93-118.
- <sup>38</sup> Moss DJ, Khanna R. Major histocompatibility complex: from genes to function. **Immunol Today.** 1999 Apr; 20(4):165-7.
- <sup>39</sup> Parham P, Lomen CE, Lawlor DA, Ways JP, Holmes N, Coppin HL, Salter RD, Wan AM, Ennis PD. Nature of polymorphism in HLA-A, -B and -C molecules. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1988 Jun; 85(11):4005-9.
- <sup>40</sup> Site: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>.
- <sup>41</sup> Gayà A, Esteve A, Casabona J, McCarthy JJ, Martorell J, Schulz TF, Whitby D. Amino acid residue at position 13 in HLA-DR beta chain plays a critical role in the development of Kaposi's sarcoma in AIDS patients. **AIDS.** 2004 Jan 23; 18(2):199-204.
- <sup>42</sup> Masala MV, Carcassi C, Cottoni F, Mulargia M, Contu L, Cerimele D. Classic Kaposi's sarcoma in Sardinia: HLA positive and negative associations. **Int J Dermatol.** 2005 Sep; 44(9):743-5.
- <sup>43</sup> Wang QJ, Huang XL, Rappocciolo G, Jenkins FJ, Hildebrand WH, Fan Z, Thomas EK, Rinaldo CR Jr. Identification of an HLA A\*0201-restricted CD8+ T-cell epitope for the glycoprotein B homolog of human herpesvirus 8. **Blood.** 2002 May 1; 99(9):3360-6.
- <sup>44</sup> Lambert M, Gannagé M, Karras A, Abel M, Legendre C, Kerob D, Agbalika F, Girard PM, Lebbe C, Caillat-Zucman S. Differences in the frequency and function of HHV-8-specific CD8 T

---

cells between asymptomatic HHV8 infection and Kaposi Sarcoma. **Blood**. 2006 Dec 1; 108(12):3871-80. Epub 2006 Aug 22.

<sup>45</sup> Robey RC, Lagos D, Gratrix F, Henderson S, et al. The CD8 and CD4 T-cell response against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is skewed towards early and late lytic antigens. **Plos One**. 2009; 4(6):e5890.

<sup>46</sup> Lepone L, Rappocciolo G, Knowlton E, Jais M, Piazza P, Jenkins FJ, Rinaldo CR. Monofunctional and Polyfunctional CD8+ T cell responses to Human Herpesvirus 8 lytic and latency proteins. **Clin vaccine Immunol**. 2010 Oct; 17(10):1507-16. Epub 2010 Aug 18.

<sup>47</sup> Robey RC, Mletzko S, Bower M, Meys R, Boffito M, Nelson M, Bunker CB, Gotch FM. *Ex-Vivo* Recognition of late-lytic CD8 epitopes specific for Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) by HIV/KSHV-coinfected individuals. **Viral Immunol**. 2011 Jun; 24(3):211-20.

<sup>48</sup> Brander C, O'Connor P, Jones NG, van Gorder M, Walker BD. Impaired CTL recognition of cells latently infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **J Immunol**. 2000 Aug 15; 165(4):2977-83.

<sup>49</sup> Lundegaard C, Lund O, Buus S, Nielsen M. Major histocompatibility complex class I binding prediction as a tool in epitope discovery. **Immunology**. 2010 Jul; 130(3):309-18.

<sup>50</sup> Rammensee H, Bachmann J, Emmerich N, Bachor AO, Stevanovic S. SYFPEITHI: databases for MHC ligands and peptide motifs. **Immunogenetics** 1999; 50:213-219.

<sup>51</sup> Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding individual peptide side-chains. **J Immunol**. 1994; 152:163-175.

<sup>52</sup> Seyed N, ZAhedifard F, Safaiyan S, Gholami E, Doustdari F, Azadmanesh K, Mirzaei M, Saeedi Eslami N, Khadem Sadegh A, Eslami Far A, Sharifi I, Rafati S. *In silico* analysis of six known *Leishmania major* antigens and *in vitro* evaluation of specific epitopes eliciting HLA-A2 restricted CD8 T Cell response. **Plos Negl Trop Dis**. 2011 Sep; 5(9):e1295.

<sup>53</sup> Pelte C, Cherepnev G, Schoenemann C, Volk HD, Kern F. Random screening of proteins for HLA-A\*0201-binding nine-amino acid peptides is not sufficient for identifying CD8 T cell epitopes recognized in the context of HLA-A\*0201. **J Immunol**. 2004 Jun 1; 172(11):6783-9

<sup>54</sup> Osman M, Kubo T, Gill J, Neipel F, Becker M, et al. Identification of human herpesvirus 8-specific cytotoxic T-cell responses. **J Virol**. 1999; 73(7):6136-40.