Amanda Schiersner Caodaglio

Caracterização da atividade transcricional de HPV-6

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Laura Cristina Sichero
Vettorazzo

São Paulo

2020

Amanda Schiersner Caodaglio

Caracterização da atividade transcricional de HPV-6

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Laura Cristina Sichero
Vettorazzo

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Caodaglio, Amanda Schiersner
Caracterização da atividade transcricional de HPV-
6 / Amanda Schiersner Caodaglio. -- São Paulo, 2020.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientadora: Laura Cristina Sichero Vettorazzo.

Descritores: 1.Papillomaviridae 2.Papillomavirus
Humano 6 3.Transcrição gênica 4.Fatores de
transcrição 5.Genoma viral 6.Verrugas

USP/FM/DBD-108/20

À todas as mulheres cientistas, reconhecidas ou não.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à toda minha rede de apoio pela ajuda que tive ao longo dessa longa jornada de três anos.

Agradeço a todos meus amigos do Pico da Flor Roxo, em especial Ded, Fricote, Chico, Dalai e Blue e ao meu amigo Seya, por estarem do meu lado em todos os momentos difíceis ao longo destes três anos, me fazendo rir e apreciar as coisas boas desta vida. Vocês são o melhor presente que a biologia me trouxe. Amo vocês!

Agradeço a todos os meus colegas do Centro de Investigação Translacional em Oncologia, onde encontrei pesquisadores incríveis.

Agradeço a todos do Laboratório de Inovação em Câncer, que me ajudaram muito em momentos de dúvidas científicos e tornaram especiais os almoços em equipe.

Agradeço a todo o laboratório BioMol; a minha orientadora Laura Sichero pela orientação amiga, dedicada e paciente, me inspirando sempre a ser melhor. Agradeço a Neide e ao João pelos socorros fornecidos no laboratório, pelos momentos bons em almoços e por conversas na salinha. Agradeço as minhas companheiras, amigas, irmãs do dia a dia Aline Lopes Ribeiro, Valéria Talpe Nunes e Emily Montosa Nunes por todos os conselhos profissionais e pessoais dados, todas as saídas para espairecer, todos os ombros dados para chorar e memes compartilhados. Não consigo imaginar minha vida de mestrandia sem ter tido vocês do meu lado, me ajudando a crescer. Amo vocês do fundo do coração!

Agradeço à minha família, às minhas tias Heloisa e Jurema Caodaglio e Silvia Cristina Hein, ao meu tio Werner Max Schiersner e ao meu pai Ricardo Caodaglio pelo apoio emocional e financeiro no momento que não tive condições de arcar com ótimas oportunidades profissionais. Nunca irei esquecer o quanto acreditaram em mim e me ajudaram a abrir diversas portas. Agradeço ao meu irmão Max Schiersner pela paciência com meu mau-humor e pelas inúmeras risadas e conselhos desde sempre.

E agradeço especialmente a três pessoas fundamentais para eu chegar onde cheguei. Agradeço ao meu avô Adriaan Pieter Wilderon por ser me fazer buscar os porquês da vida e ter me inspirado a seguir a carreira que segui; à minha avó Christel Mies Schiersner por me ajudar sempre a melhor

qualidade de ensino, independente da minha idade; e, principalmente, à minha mãe, que nunca pensou duas vezes em se privar de algo para que seus filhos traçassem o melhor caminho e aproveitassem as melhores oportunidade da vida. Nunca terei palavras para expressar o quanto sou grata por tudo que minha mãe fez e como não teria chegado na metade do caminho sem ela.

*“Nada na Biologia faz sentido exceto à luz da evolução”,
Theodosius Dobzhansky.*

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Símbolos, siglas e abreviaturas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Papilomavírus e comorbidades associadas	16
1.2. Epidemiologia	18
1.3. Evolução e Taxonomia	21
1.4. Estrutura e atividade transcricional do HPV	25
1.5. Regulação da Transcrição	29
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVO	32
3.1. Objetivo principal	32
3.2. Objetivos específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. Cultura celular	33
4.2. Análise da atividade transcricional das variantes B1 e B3 de HPV-6	34
4.3. Ensaaios de Validação	34
4.4. Ligação de FTs à LCR das sublinhagens de HPV-6	35
4.5. Transformação de bactérias E. coli por choque térmico	35
4.6. Purificação do DNA plasmidial	36
4.7. Sequências dos iniciadores utilizados	36
4.8. Ensaaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP)	38
4.9. Padronização dos iniciadores utilizados	39
4.10. PCR em tempo real (RT-qPCR)	40
4.11. Análises estatísticas	40
5. Resultados	41
5.1. Comparação das sequências das LCRs das variantes de B1 e B	41
5.2. Identificação dos fatores de transcrição que atuam sobre as LCRs	42

5.3. Identificação de sítios de ligação putativos dos FTs na LCR	46
5.4. Validação do efeito observado nos ensaios de arranjo dos nove FTs selecionados pela análise in silico	49
5.5. Análise dos efeitos sinérgicos dos FTs selecionados para validação	52
5.6. Análise da ligação de HOXA13 e SOX7 na LCR de HPV-6	54
6. Discussão	57
7. Conclusão	66
8. Referências	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS E MORTES PARA OS 10 CÂNCERES MAIS COMUM EM MULHERES EM 2018.	19
FIGURA 2. MAPA MUNDI INDICANDO OS TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES.....	20
FIGURA 3. CLASSIFICAÇÃO DOS HPVS EM CINCO GÊNEROS..	22
FIGURA 4. ÁRVORE FILOGENÉTICA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS VARIANTES DE HPV-6..	24
FIGURA 5. ESTRUTURA DO HPV..	26
FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LCR E DOS GENES E6 E E7 DE HPVS DE ALTO E BAIXO RISCO, REPRESENTADOS POR HPV-16 E HPV-6, RESPECTIVAMENTE.....	27
FIGURA 7. ATIVIDADE PROMOTORA DIFERENCIAL ENTRE AS DIFERENTES VARIANTES DO HPV-6..	30
FIGURA 8. DESENHO ESQUEMÁTICO DAS POSIÇÕES DOS INICIADORES #4 A #8 ALINHADOS NA SEQUÊNCIA DA LCR DA VARIANTE B1, UTILIZADA COMO MOLDE PARA DESENHOS DOS INICIADORES..	37
FIGURA 9. DIVERGÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS ENTRE AS SEQUÊNCIAS DAS LCRs DAS VARIANTES B1 E B3 DE HPV-6.	41
FIGURA 10. ANÁLISE DA ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DE VARIANTES MOLECULARES PERTENCENTES ÀS SUBLINHAGEM B1 E B3 DE HPV-6.....	44
FIGURA 11. SEQUÊNCIAS COMPLETAS DA LCR DE B1 E B3 COM OS SÍTIOS DE LIGAÇÃO PUTATIVOS OBSERVADOS IN SILICO	48
FIGURA 12. ENSAIO DE VALIDAÇÃO PARA CONFIRMAÇÃO DOS EFEITOS OBSERVADOS NO ENSAIO DE ARRANJOS.....	52
FIGURA 13. ANÁLISE DOS EFEITOS SINERGÉTICOS DOS FTs COM SÍTIOS DE LIGAÇÃO PUTATIVOS SOBREPOSTOS.	54
FIGURA 14. LIGAÇÃO IN VIVO DE HOXA13 E SOX7 À LCR DE HPV-6 UTILIZANDO ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA (CHIP).....	55
FIGURA 15. ANÁLISE DAS INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA DOS 77 FTs ENCONTRADOS NOS ENSAIOS DE ARRANJO.	61

FIGURA 16. SEQUÊNCIAS COMPLETAS DA LCR DE B1 E B3 COM OS SÍTIOS DE LIGAÇÃO PUTATIVOS DE SOX7 OBSERVADOS IN SÍLICO, ANTES DAS ATUALIZAÇÕES DAS MATRIZES DE PREFERÊNCIAS DA PLATAFORMA JASPAR EM 2020.....	63
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. POTENCIAL CARCINOGENICO DE DIFERENTES TIPOS DE HPV DE ACORDO COM A AGÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA EM CÂNCER (IARC) (ADAPTADO DE BOUVARD ET AL., 2009).	16
TABELA 2. SEQUÊNCIAS E USOS DE TODOS OS INICIADORES UTILIZADOS AO LONGO DESTE PROJETO.	38
TABELA 3. DADOS DE LUMINESCÊNCIA NORMALIZADOS PELA LUMINESCÊNCIA DA ATIVIDADE BASAL DA LCR	45
TABELA 4. SEQUÊNCIAS PUTATIVAS DOS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DOS 9 FTs ENCONTRADOS NAS ANÁLISES IN SÍLICO	49

RESUMO

Caodaglio AS. *Caracterização da atividade transcricional de HPV-6* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

As verrugas genitais (VG), a papilomatose respiratória recorrente e alguns raros casos de câncer estão associados à infecção pelo HPV-6. Variantes da sublinhagem B1 de HPV-6 estão associadas a um maior risco de desenvolvimento de VGs em homens em comparação às variantes da sublinhagem B3, o que poderia estar em parte associado à maior atividade transcricional da variante B1 quando comparada à variante B3. A transcrição viral é regulada por proteínas celulares e virais que se ligam à LCR e pouco foi descrito sobre a regulação da transcrição do HPV-6. Portanto, os objetivos deste trabalho foram identificar fatores de transcrição (FTs) que afetam a transcrição do HPV-6; identificar FTs que atuam distintamente na transcrição das variantes B1 e B3; determinar quais FTs se ligam à LCR; e determinar o impacto dos FTs sinergicamente na transcrição do HPV-6. Usando a tecnologia *GFC-Transfection Array* (Origene), mais de 700 plasmídeos de expressão de FTs foram transformados em bactérias *E. coli* e o DNA plasmidial isolado por minipreparação. Em seguida, células C33 foram co-transfectadas com plasmídeos de expressão de FTs e plasmídeos repórteres recombinantes LCR-Luc. Foi observado que 77 FTs ativaram ou reprimiram a LCR de pelo menos uma das variantes testadas. Entre estes, 9 FTs apresentaram potenciais sítios de ligação na LCR de ambas as variantes, baseado em análise *in silico*, e foram selecionados para ensaios de validação em que células C33 foram co-transfectadas com o plasmídeo repórter, além de quantidades crescentes dos plasmídeos de expressão de cada FT. Assim, verificou-se que SNAI2 e E2F1 reprimiram significativamente a atividade da LCR da variante B1, enquanto, HOXA13 ativou significativamente apenas a LCR dessa variante. Adicionalmente, ELF5 apresentou efeito transrepressor sobre a LCR de ambas as variantes testadas. Ensaios de co-transfecção de FTs para avaliar o impacto sinérgico destes FTs sobre a LCR revelaram que quando HOXA13 é co-expresso com SNAI2 o efeito ativador e repressor destas proteínas, respectivamente, é anulado. Ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) mostraram a ligação *in vitro* de HOXA13 e SOX7 à LCR de ambas as variantes. Estes resultados indicam um papel de HOXA13 na ativação diferencial da transcrição da variante pertencente a sublinhagem B1, em comparação com a atividade transcricional da variante B3. A identificação

de FTs celulares que interagem diferencialmente com a LCR de diferentes variantes do HPV-6 poderia explicar, pelo menos em parte, as diferenças no risco de desenvolver VGs atribuídos a essas variantes e futuramente servir como um potencial alvo terapêutico.

Descritores: Papillomaviridae; Papillomavirus Humano 6; Transcrição gênica; Fatores de transcrição; Genoma viral; Verrugas.

ABSTRACT

Caodaglio AS. *Characterization of HPV-6 transcriptional activity* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Genital warts (GW), recurrent respiratory papillomatosis and some rare cases of cancer are associated with HPV-6 infection. Variants of the HPV-6 B1 sublineage are associated with an increased risk of developing GWs in men compared to infections with variants of the B3 sublineage what could be at least in part associated to the higher transcriptional activity of the B1 variant compared to the B3 variant. Viral transcription is regulated by cellular and viral proteins that bind to LCR and little has been described about the regulation of HPV-6 transcription. Therefore, the objectives of the present study were to identify transcription factors (TFs) that affect HPV-6 transcription; identify TFs that act distinctly in the transcription of variants B1 and B3; determine which TFs bind to the LCR; and determine the impact of TFs synergistically on HPV-6 transcription. Using the GFC-Transfection Array (Origene) technology, more than 700 TFs expression plasmids were transformed *into E. coli* bacteria and the plasmidial DNA isolated by mini-preparation. Then, C33 cells were co-transfected with the TFs expression plasmids and recombinant reporter plasmids LCR-Luc. We observed that 77 TFs activated or suppressed the LCR of at least one of the tested variants. Among these, 9 TFs showed potential binding sites within the LCR of both variants, according to *in silico* analysis, and were selected for validation tests in which C33 cells were co-transfected with the reporter plasmid, in addition to increasing amounts of the expression plasmids of each TF. Thus, we verified that SNAI2 and E2F1 significantly repressed the LCR activity of the B1 variant, while HOXA13 activated significantly solely the LCR of this variant. Additionally, ELF5 showed a transrepressor effect upon the LCR of both variants tested. TFs co-transfection assays to assess the synergistic impact of these TFs upon the LCR revealed that when HOXA13 is co-expressed with SNAI2, the activation and repression effect of these proteins, respectively, is abolished. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays showed the *in vivo* binding of HOXA13 and SOX7 to the LCR of both variants. These results indicate a role for HOXA13 in the differential transcriptional activation of the variant belonging to the B1 sublineage. The identification of cellular TFs that differentially interact with the LCR of different HPV-6 variants could explain, at least in part, the differences in the risk of developing GWs attributed to these variants and in the future serve as a potential therapeutic target.

Descriptors: Papillomaviridae; Human papillomavirus 6; Transcription, genetic; Transcription Factors; Genome, Viral; Warts.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Papilomavírus e comorbidades associadas

Os *Papilomavírus* são um grupo diverso de pequenos vírus cujo genoma é constituído de uma molécula de DNA circular dupla fita, e que infectam os epitélios mucosos e cutâneos (STUBENRAUCH; LAIMINS, 1999; BENNETTS et al., 2015; BURK; HARARI; CHEN, 2013). Estes são vírus espécie-específicos, com diferentes tipos encontrados em répteis (HERBST et al., 2009), aves (TERAI; DESALLE; BURK, 2002), marsupiais (BENNETT et al., 2010) e outras espécies de mamíferos (revisado por BERNARD et al., 2012).

Os papilomavírus humano (HPV) são os principais *Papilomavírus* estudados devido a sua associação com diversas comorbidades. De todos os casos de câncer causados por infecções, cerca de um terço é atribuído aos HPVs (VIARISIO; GISSMANN; TOMMASINO, 2017a). Os HPVs responsáveis pela ocorrência de casos de câncer, sendo considerados os seus agentes etiológicos, são denominados como HPVs de alto risco oncogênico (HR, de *high risk*). Hoje em dia, 12 tipos de HPVs são considerados carcinógenos para humanos (Grupo 1) de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial de Saúde. O HPV-68 é considerado como provável carcinógeno para humanos (Grupo 2A), enquanto os tipos 5, 8, 26, 53, 66, 67, 70, 73 e 82 são considerados como possíveis carcinógenos para humanos (Grupo 2B). Os tipos restantes de HPV são considerados como não carcinógenos para humanos (Grupo 3) (Tabela 1) (BOUVARD et al., 2009).

Tabela 1. Potencial carcinogênico de diferentes tipos de HPV de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) (Adaptado de Bouvard et al., 2009).

Alfa HPV		
Grupos	Tipos de HPV	Comentários
1	16	Tipo oncogênico mais prevalente; causador de câncer em diferentes sítios anatômicos
1	18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Evidências suficientes para câncer cervical
2A	68	Evidências limitadas em humanos e fortes evidências experimentais para câncer cervical
2B	26, 53, 66, 67, 70, 73, 82	Evidências limitadas em humanos
2B	30, 34, 85, 97	Classificados por analogias filogenéticas aos tipos de HPV com evidências suficientes ou limitadas em humanos
3	6, 11	Não carcinógenos para humanos

Embora os HPV de baixo risco oncogênico (LR, de *low risk*) sejam considerados como não carcinógenos para humanos, infecções por LR-HPV tem importantes implicações clínicas, uma vez que estão associadas à patologias de baixo grau em diferentes regiões anatômicas (CLIFFORD et al., 2006; HOOTS et al., 2009; SRODON et al., 2006), e também a ocasionais casos de neoplasias malignas.

Os HPV-6 e HPV-11 são os LR-HPVs melhor estudados, ainda que sejam poucos os estudos quando comparados com aqueles sobre os HR-HPVs 16 e 18. Estes dois LR-HPVs são responsáveis pela ocorrência dos casos da rara, mas séria, papilomatose respiratória recorrente (PRR) (DONNE et al., 2010; MAKIYAMA et al., 2013), além de 90% dos casos de verrugas genitais (VG) em ambos os homens e mulheres (GARLAND et al., 2009; HAWKINS et al., 2013). Extensas revisões sistemáticas indicam que as VGs representam uma patologia altamente prevalente associada a um problema cosmético significativo, bem como a um fardo psicológico com custos de saúde substanciais e dependentes do número e localização das lesões (EGAWA; DOORBAR, 2017; PATEL et al., 2013; RAYMAKERS et al., 2012). Somente na Inglaterra estima-se que o custo para o tratamento das VGs ao sistema de saúde público seja de em torno de 16,8 milhões de libras/ ano (DESAI et al., 2011).

Embora os HPV-6 e HPV-11 sejam considerados LR-HPVs, publicações descrevem a detecção de DNA destes em tumores em diferentes sítios anatômicos. Os HPV-6 e HPV-11 estão associados ao desenvolvimento do tumor de Buschke-Löwenstein (BOSHART; ZUR HAUSEN, 1986), e vários estudos identificaram a presença de HPV-6 em tumores malignos, incluindo carcinomas da vagina (OKAGAKI et al., 1984), vulva (KASHER; ROMAN, 1988; RANDO et al., 1986), língua (KITASATO et al., 1994), colo do útero (OFT et al., 1993b), e tonsila (BERCOVICH et al., 1991). Ainda mais, ambos LR-HPVs foram detectados em um tipo raro de carcinoma celular escamoso (*squamous cell carcinoma* - SCC) invasivo da cérvix, o carcinoma de células escamosas condilomatoso (CHO et al., 1998; MASUDA et al., 2018).

Adicionalmente, alguns relatos acerca da transformação maligna de VGs (BLOMBERG et al., 2012; NORDENVALL et al., 2006; SIGURGEIRSSON; LINDELOF; EKLUND, 1991) implicam na associação da infecção por LR-HPVs com o aumento do risco de câncer anogenital em pacientes com histórico de VGs. De fato, embora alguns estudos prospectivos e de caso-

controle reportem um maior risco de câncer anogenital em homens e mulheres com um histórico de VGs, é necessário ter cautela ao analisar estes resultados, uma vez que alguns destes estudos não buscaram identificar a presença de HPV-6 e HPV-11 especificamente, mas apenas buscaram analisar a presença ou ausência de VGs e a sua associação com o maior risco de desenvolvimento de tumores anogenitais (BENNETTS et al., 2015).

Até o momento não há tratamento terapêutico para a infecção por HPV, a não ser por remoção cirúrgica completa da manifestação clínica da infecção. No caso de PRR, por exemplo, os papilomas podem persistir por anos ou décadas com recorrências em intervalos regulares após o tratamento e até mesmo originar lesões metastáticas no trato respiratório inferior e nos pulmões (GEREIN et al., 2005). Ainda que não haja tratamento terapêutico para as infecções por HPV e as proteínas virais E6 e E7 apresentem propriedades transformantes e/ ou imortalizantes, a maioria das infecções por HPVs são assintomáticas e eliminadas pelo sistema imune entre 12 e 24 meses, e o aparecimento de patologias está geralmente relacionado à ocorrência de infecções virais persistentes (ÖSTÖR, 1993; STERLING; HANDFIELD-JONES; HUDSON, 2001). Geralmente, as infecções por HPV são ubíquas e alguns HPVs de alto e baixo risco residem na pele de indivíduos imunocompetentes sem sinais de lesões sintomáticas, fazendo parte da fauna microbiana epitelial normal (ANTONSSON et al., 2003a, 2003b; DE KONING et al., 2007; GUSSEKLOO et al., 2014; POLJAK et al., 2009).

1.2. Epidemiologia

Segundo dados do *Global Cancer Statistics* 2018 (BRAY et al., 2018), o câncer cervical é o quarto tipo de câncer mais incidente em mulheres, e também o quarto tipo com maior taxa de mortalidade (Fig. 1).

Figura 1. Distribuição dos casos e mortes para os 10 cânceres mais comum em mulheres em 2018. a) Distribuição dos 10 tipos de câncer mais incidentes em mulheres em 2018; b) Distribuição dos 10 tipos de câncer com maior taxa de mortalidade. Em ambos os gráficos, a área reflete a proporção total no número de casos ou de mortes (Adaptado de BRAY et al., 2018).

No que concerne à distribuição geográfica, o câncer cervical é o mais incidente em 28 países (Fig. 2A), além de ser o câncer com maior taxa de mortalidade em 42 países (Fig. 2B), com a vasta maioria destes países localizada na África Subsaariana (BRAY et al., 2018). Estas taxas são de 7 a 10 vezes maiores do que as encontradas em regiões como a América do Norte, Nova Zelândia e Austrália, e uma possível explicação para isto está relacionada com o aumento da média do nível socioeconômico destes países, o aumento da eficácia do rastreamento realizado para a identificação precoce de lesões precursoras, e com a diminuição do risco de infecções persistentes por HR-HPVs, resultante da melhoria em hábitos de higiene genital, da redução da paridade e da diminuição da prevalência de doenças sexualmente transmissíveis (IARC, 2005).

Figura 2. Mapa mundi indicando os tipos de câncer mais incidentes (a) e com maior taxa de mortalidade (b) em mulheres por país. (Adaptado de BRAY et al., 2018).

A ausência de rastreamento efetivo em regiões como o Leste Europeu e a Ásia central (incluindo a região considerada como antiga União Soviética) levou a um rápido aumento na mortalidade prematura por câncer cervical nas gerações recentes (BRAY et al., 2013). Em países

da África Subsaariana, o aumento uniforme nas taxas de mortalidade por câncer cervical tem como algumas das possíveis causas a dificuldade em implementar programas de rastreamento e vacinação profilática nessas regiões (CHOKUNONGA et al., 2013; VACCARELLA et al., 2017; WABINGA et al., 2014).

Embora as VGs sejam geralmente lesões benignas, a incidência de novos casos por ano é de 0,16%, somente na Inglaterra, com uma incidência de recorrência de 0,13% (STANLEY; PINTO; TRIMBLE, 2012). Quando analisada globalmente, a taxa de incidência de VGs varia entre 85 – 205 casos a cada 100.000 pessoas (de ambos os sexos) (PATEL et al., 2013). Análises temporais de tendências mostram um aumento na incidência de VGs em diversos países desenvolvidos e uma explicação putativa para isto seria a alta taxa de transmissão (até a 60%) de HPVs presentes nas VGs (FORMANA et al., 2012; PATEL et al., 2013; WOODHALL et al., 2008).

1.3. Evolução e Taxonomia

Os *Papilomavirus* compreendem um diverso grupo de vírus que infectam tanto humanos como animais. Sua origem parece estar associada às mudanças no epitélio de seu hospedeiro ancestral conforme os primeiros répteis surgiram a cerca de 350 milhões de anos atrás. Desde então estes vírus co-evoluíram com seus respectivos hospedeiros, sendo encontrados em aves, répteis, marsupiais e mamíferos, mas não em anfíbios ou ordem filogenéticas menores (BRAVO; DE SANJOSÉ; GOTTSCHLING, 2010), com pouca existência do mesmo tipo viral entre as espécies, resultando em elevada espécie-especificidade e diversidade patológicas.

Conforme os genomas dos HPVs evoluíram, mutações, inserções, deleções e rearranjos ocorridos foram selecionados e fixados por meio do isolamento do hospedeiro, gerando identidades discretas denominadas de tipos (BERNARD; CHAN; DELIUS, 1994; GOTTSCHLING et al., 2007).

Os *Papilomavirus* foram originalmente agrupados com os poliomavírus em uma família denominada *Papovaviridae*, devido ao fato de ambos serem os únicos dois grupos de vírus que apresentam um DNA circular de dupla fita relativamente pequeno, e um capsídeo icosaédrico não-envelopado. Entretanto, estes vírus passaram a constituir famílias distintas independentes quando

se tornou claro que seus genomas eram muito diferentes entre si, surgindo assim a família *Papillomaviridae* (revisado por VAN DOORSLAER et al., 2013).

Até o momento, mais de 200 HPVs foram identificados e classificados em gêneros e espécies (Fig. 3), sendo Alfa-papilomavírus e Beta-papilomavírus os dois principais gêneros, englobando cerca de 90% de todos os HPVs descritos até o momento (DOORBAR et al., 2015; VAN DOORSLAER et al., 2013). Os Alfa-papilomavírus, o maior e melhor estudado gênero, engloba os HPV genitais/ mucosos, enquanto que o segundo maior gênero, os Beta-papilomavírus, estão tipicamente associados às infecções cutâneas assintomáticas em indivíduos saudáveis, mas que podem também estar associados ao surgimento do câncer de pele não-melanoma em indivíduos imunocomprometidos (HARWOOD; PROBY, 2002; PFISTER, 2003; STERLING, 2005); os três gêneros restantes que englobam os HPVs são os Gamma-, Mu- e Nu-papilomavírus, cujos tipos virais estão associados com o desenvolvimento de papilomas e verrugas cutâneas mas não ao desenvolvimento tumoral (DOORBAR et al., 2015; SHAMANIN et al., 1994).

Figura 3. Classificação dos HPVs em cinco gêneros. Os tipos de papilomavírus humanos encontrados em humanos se enquadram em cinco gêneros, com os gêneros Alfa e Beta / Gama representando os maiores grupos. Os tipos de papilomavírus humanos do gênero Alfa são frequentemente agrupados em cutâneo de baixo risco (cinza), mucoso de baixo risco (laranja) ou alto risco (rosa). Os tipos de alto risco identificados com fonte em vermelho são aqueles classificados como "carcinogêneos humanos" com base em dados epidemiológicos e biológicos. Os demais tipos de alto risco são "prováveis" ou "possíveis" cancerígenos em humanos. A árvore evolutiva é baseada no alinhamento das sequências nucleotídicas dos genes E1, E2, L1 e L2 (SHAMANIN et al., 1994) (adaptado de DOORBAR et al., 2015).

Os HPVs são classificados em diferentes gêneros quando a identidade entre as sequências do gene *L1* (o gene mais conservado do genoma viral) é menor do que 60%, e são considerados de uma mesma espécie quando a identidade entre suas sequências do gene *L1* é entre 60% e 70% (VILLIERS et al., 2004).

Um tipo distinto de HPV é estabelecido quando a sequência do gene viral *L1* de um tipo viral tem pelo menos 10% de dissimilaridade com qualquer outra sequência do gene *L1* já descrita. Isolados de um mesmo tipo viral são classificados em variantes quando a dissimilaridade da sequência do genoma completo com outras sequências já descritas é menor do que 2% (BERNARD et al., 2012; VILLIERS et al., 2004). Por sua vez, as variantes virais podem ser ainda classificadas em linhagens e sublinhagens e esta classificação tem como base a sequência completa do genoma viral; variantes pertencentes à mesma linhagem possuem dissimilaridade na identidade de 1%-2% em suas sequências genômicas completa e variantes pertencentes a mesma sublinhagem possuem uma dissimilaridade na identidade em suas sequências genômicas entre 0,5% e 1% (BURK; CHEN; VAN DOORSLAER, 2009; CHEN et al., 2005, 2009).

Um estudo recente baseado em um grande número de amostras HPV-6 positivas (724 isolados e 190 genomas completos) obtidas de diversas regiões geográficas e de diferentes sítios anatômicos (cérvix uterina, VGs, PRR, entre outras), revelou que o HPV-6 é um tipo viral muito conservado (JELEN et al., 2014). Ainda mais, os dados de sequência de DNA gerados permitiram agrupar filogeneticamente os isolados de HPV-6 em duas linhagens de variantes denominadas A e B, sendo que a linhagem B engloba cinco sublinhagens nomeadas B1, B2, B3, B4 e B5 (Fig. 4A). O isolado protótipo (primeiro genoma de HPV-6 a ser completamente sequenciado) antes classificado como HPV-6b é um membro da linhagem A (BURK et al., 2011; JELEN et al., 2014). Foi observado que com exceção do continente asiático onde as variantes da linhagem A são as mais prevalentes, as variantes da sublinhagem B1 são mais frequentemente encontradas nas VGs e em amostras de PRR HPV-6 positivas no mundo todo, sendo as variantes da sublinhagem B3 a segunda mais prevalente (Fig. 4B) (DANIELEWSKI et al., 2013; DE MATOS et al., 2013; JELEN et al., 2014; KOCJAN et al., 2009).

Nosso grupo descreveu pela primeira vez o impacto da variabilidade genética de HPVs 6 e 11 sob o risco de desenvolvimento de VGs entre os homens participantes do estudo multinacional prospectivo HIM (*HPV in men*) (FLORES-DÍAZ et al., 2017a). Foi observada nesse estudo maior prevalência de variantes B3 nos esfregaços genitais normais oriundos de indivíduos controles (homens que não desenvolveram VGs), enquanto a prevalência de variantes B1 estava aumentada tanto nos esfregaços normais quanto nas biópsias de VGs de homens que desenvolveram VGs. Adicionalmente, se observou uma associação significativa entre a infecção por variantes da sublinhagem B1 e o desenvolvimento de VGs em comparação às variantes B3. Por outro lado, não foi observada associação entre variantes de HPV-11 e o risco de VGs nestes homens (FLORES-DÍAZ et al., 2017b). Mais recentemente, nosso grupo descreveu que entre mulheres não houve diferença significativa na associação entre as diferentes variantes moleculares de HPVs 6 e 11 e o risco de desenvolvimento de anormalidades citológicas (SICHERO et al., 2019). Acredita-se que a discrepância dos dados gerados se deva, ao menos em parte, ao número muito maior de amostras de homens HPV-6 positivos analisados que permitiram identificar a associação positiva entre as variantes B1 de HPV-6 e o risco aumentado de desenvolvimento de VGs.

1.4. Estrutura e atividade transcricional do HPV

Os HPVs, vírus pertencentes à família *Papillomaviridae*, possuem um capsídeo não-envelado de 50 nm de diâmetro que engloba uma molécula de DNA dupla fita circular de aproximadamente 8 kb (BERNARD, 2005; revisador por VIARISIO; GISSMANN; TOMMASINO, 2017b). O capsídeo é composto por 360 moléculas da proteína principal do capsídeo L1 disposta em pentâmeros que envolvem a proteína secundária do capsídeo L2, formando 72 capsômeros (Fig. 5) (GOLDBERG et al., 2004).

Figura 5. Estrutura do HPV. a) Imagem em 3D de um virion construída a partir da obtenção de imagens de microscopia crioeletrônica e da cristalização da proteína L1, com círculo vermelho destacando a estrutura de um capsômero. b) Desenho esquemático do genoma do HPV-16 (representado pelo círculo preto), mostrando os promotores precoce (p97) e tardio (p670) marcados por setas. As seis ORFs precoces (E1, E2, E4 e E5, em verde, e E6 e E7, em vermelho) são expressas a partir de p97 ou p670 em diferentes estágios durante a diferenciação do epitélio. As ORFs tardias (L1 e L2, em amarelo) são também expressas a partir de p670, após uma mudança nos padrões de processamento do mRNA, e um deslocamento na utilização do sítio de poliadenilação [do sítio de poliadenilação inicial (PAE) para o sítio de poliadenilação tardia (PAL)]. A LCR (long control region) se encontra entre a ORF do gene L1 e do gene E6 (adaptado de SANTOS-LÓPEZ; MÁRQUEZ-DOMÍNGUEZ, 2015, e de DOORBAR, 2006).

Funcionalmente, o genoma viral está dividido em 3 regiões: a região precoce (E ou *early*), a região tardia (L ou *late*), e a LCR (*long control region*) (Fig. 5B). As denominações precoce e tardia se referem à fase do ciclo celular em que as proteínas são expressas. As proteínas E1 e E2 codificadas por genes presentes na região precoce têm função na regulação da transcrição e replicação do DNA viral (VAN DOORSLAER; MCBRIDE, 2016), enquanto as proteínas precoces E4, E5, E6 e E7 estão envolvidas com a desregulação do ciclo celular, a evasão imune e o recrutamento de fatores do hospedeiro para a replicação (DOORBAR et al., 2016). As proteínas tardias L1 e L2 constituem a proteína principal e secundária do capsídeo, respectivamente. A LCR é uma região não-codificante do genoma entre os genes *L1* e *E6*, que compreende aproximadamente 10% do genoma viral e é responsável pela regulação da transcrição e replicação.

A LCR dos HPVs genitais possui 4 sítios de ligação a E2 (E2bs1-4) que dividem a LCR em 3 segmentos funcionais distintos: o 5' distal, o central e o 3' terminal (Fig. 6). A região 5' distal contém o primeiro destes sítios (E2bs#1), além dos sítios para terminação da transcrição e para poliadenilação do transcrito policistrônico da região tardia. O segmento central da LCR é flanqueado por dois sítios de ligação a E2 (E2bs#1 e #2). A maior parte dos fatores de transcrição

(FT) celulares que influenciam a transcrição viral liga-se a elementos dentro da região central da LCR. Estes incluem AP1, NF1, TEF1, OCT1, YY1, BRN-3a, NF-IL6, KRF-1, NF-κB, FOXA1, GATA3, entre outros (O'CONNOR et al., 1995; SICHERO; SOBRINHO; VILLA, 2012; THIERRY et al., 1992). Assim, a ativação dos promotores de HPV envolve sinergismo entre essas proteínas que variam em afinidade pelos diferentes elementos em *cis* presentes na LCR. Por fim, o segmento 3' terminal contém dois sítios de ligação à proteína viral E2 (E2bs#3 e #4), além do sítio de ligação à proteína E1 que se sobrepõe a origem de replicação (BERNARD, 2002; SICHERO; SOBRINHO; VILLA, 2012; THIERRY et al., 1992).

Figura 6. Representação esquemática da LCR e dos genes E6 e E7 de HPVs de alto e baixo risco, representados por HPV-16 e HPV-6, respectivamente. Quatro sítios de ligação E2 (E2bs) são conservados entre os HPVs mucosos, dividindo a LCR em três segmentos distintos: o segmento 5', o segmento central e o segmento 3'. O segmento 5' contém o sinal de terminação da transcrição tardia ("late pA"), o segmento central funciona como um intensificador específico do epitélio, e o segmento 3' abrange a origem da replicação. Os promotores precoces também são indicados: HPV-16 (P97) e HPV-6 (P90, P270, P680) (adaptado de RIBEIRO; CAODAGLIO; SICHERO, 2018).

P97 e P105 são os principais promotores precoces dos HPVs 16 e 18, respectivamente, sendo também os mais bem estudados. Para ambos os HPVs de alto risco, os transcritos iniciados a partir destes promotores precoces são editados diferencialmente pelo processo de processamento alternativo, de modo que todos os transcritos precoces são codificados a partir de um único código aberto de leitura (*open reading frame* – ORF) (STEGEER; REHTANZ; SCHNABEL, 2001). Adicionalmente, para ambos os tipos virais, uma parte do RNA mensageiro (RNAm) de E6 é deletado para a tradução eficiente de E7 (SMOTKIN; PROKOPH; WETTSTEIN, 1989).

Já nos LR-HPVs, HPV-6 e HPV-11, dois promotores precoces foram identificados, P90 e P270, que permitem a transcrição individual dos genes *E6* e *E7*, respectivamente, embora a regulação de ambos os promotores seja controlada por elementos cis presentes na LCR (CHOW et al., 1987; DILORENZO; STEINBERG, 1995; KARLEN; OFFORD; BEARD, 1996; SMOTKIN; PROKOPH; WETTSTEIN, 1989; STOLER et al., 1989; ZHAO; CHOW; BROKER, 1997). Ademais, há a presença de um terceiro promotor precoce nestes tipos virais, o P680, crucial para a expressão da proteína de fusão E1^{E4} (Fig. 6) (NASSERI et al., 1987).

Estudos relataram a regulação diferencial dos promotores precoces P90, P270 e P680, o que pode indicar que a independência da regulação das proteínas precoces E6, E7 e E1^{E4} é importante para o ciclo de vida viral (DILORENZO; STEINBERG, 1995; DOLLARD et al., 1992; IFTNER et al., 1992; RAPP et al., 1997; STOLER et al., 1989). Um exemplo da importância desta regulação independente é o efeito diferencial que a ligação da proteína viral E2 aos seus sítios de ligação na LCR acarreta; enquanto que a ligação de E2 aos sítios de ligação mais distais resulta na ativação do promotor precoce P270, a ligação desta proteína aos sítios mais proximais leva à inibição do promotor precoce P90 (RAPP et al., 1997). Além disso, enquanto o RNAm de E7 foi o transcrito mais abundantemente detectado em uma amostra de carcinoma cervical, observou-se que os transcritos E1^{E4} foram os mais prevalentes em uma amostra de condilomata acuminata genital (OFT et al., 1993a)

1.5. Regulação da Transcrição

A transcrição é o primeiro passo para o controle da expressão gênica e sua regulação limita a expressão dos genes virais precoces e tardios, evitando assim, a produção inadequada de proteínas virais imunogênicas, e consequentemente o reconhecimento do vírus pelo sistema imune. Ainda, a regulação da transcrição limita o repertório dos tipos celulares passíveis de serem infectados pelo HPV (BERNARD, 1990, 2013).

A regulação da transcrição pode ocorrer por diversos mecanismos, como por meio de modificações epigenéticas (SOTO; SONG; MCLAUGHLIN-DRUBIN, 2017), e pela ligação de diversos FTs às sequências específicas da LCR, sendo a principal regulação realizada pela proteína viral E2 (GARCÍA-VALLVÉ et al., 2006). A proteína E2 de HPV se liga em dímeros às sequências nucleotídicas específicas (THIERRY; YANIV, 1987). O terceiro sítio de ligação a E2 (E2bs#3) se sobrepõe à sequência de reconhecimento da proteína celular SP1, e o quarto sítio (E2bs#4) à TATA box competindo, assim, por ligação na sequência na LCR com o FT celular TFIID; a ocupação diferencial destes sítios regula os níveis de expressão de E6/E7. Em células em diferenciação, os fatores SP1, TFIID e outros fatores da maquinaria de transcrição celular se ligam à TATA box resultando na atividade máxima do promotor viral (DEMERET; YANIV; THIERRY, 1994; GARCIA-CARRANCA; THIERRY; YANIV, 1988; GLOSS et al., 1987). Entretanto, quando E2 é expresso em altas concentrações, é capaz de deslocar ambas as proteínas SP1 e TFIID, levando à diminuição da ativação do promotor, uma vez que E2 é um ativador mais fraco que SP1 (STUBENRAUCH; LAIMINS, 1999). Este tipo de regulação é importante e provavelmente é um dos mecanismos pelo qual a maior parte das infecções por HPV pode persistir em forma subclínica, onde os genomas virais são mantidos como epissomos. Interessantemente, foi observado que a proteína viral E2 tem efeitos opostos nos promotores P90 e P270 de HPV-6. Enquanto a repressão de P90 por E2 é dependente da presença intacta dos dois sítios de ligação proximais (E2bs#3 e E2bs#4), todos os sítios de ligação a E2 contribuem para a ativação do promotor de E7, P270, embora esta ativação seja claramente mediada pelo sítio de ligação de E2 mais distal (E2bs#1)(RAPP et al., 1997).

A partir do fim da década de 80, estudos utilizando tanto análise computacional quanto ensaios de proteção por DNases (*footprinting*) de fragmentos da LCR verificaram que nesta região do

genoma se ligam diversos FTs celulares (CONNOR; CHAN; BERNARD, 1995). Cabe ressaltar que, embora a LCR seja uma região pouco conservada, diversos sítios de ligação para diversos FTs são conservados entre os diferentes tipos de papilomavírus que infectam o trato anogenital humano. Ainda mais, sabe-se que os diferentes membros de algumas famílias de FTs têm funções diferentes e são expressos diferencialmente em células específicas, assim, a epitélio-especificidade dos HPVs não seria devido à quantidade dos FTs, mas devido à qualidade destes.

O estudo dos elementos reguladores do HPV progrediu rapidamente por aproximadamente 15 anos, começando no início dos anos 80, mas o interesse declinou dramaticamente, o que possivelmente esteve associado com limitações das metodologias disponíveis para estas análises. No entanto, a compreensão da regulação transcricional do HPV está longe de atingir a maturidade. Na última década, o desenvolvimento de tecnologias de *array* possibilitou a identificação de vários TFs adicionais que impactam sobre a atividade transcricional do HPV. Ensaios de competição usando um *array* de 345 sítios de ligação consenso para diferentes FTs identificaram proteínas que ligam-se especificamente a LCR do HPV-16 em células diferenciadas e indiferenciadas (CARSON; KHAN, 2006). Vale ressaltar que a metodologia utilizada foi capaz de confirmar vários FTs já descritos capazes de influenciar a atividade da LCR, embora a maioria das associações relatadas ainda não tinham sido reportadas (SICHERO; SOBRINHO; VILLA, 2012).

No que concerne à atividade transcricional dos LR-HPVs, foi relatado que uma variante da sublinhagem B1 de HPV-6 é dez vezes mais transcricionalmente ativa do que uma variante B3 do mesmo tipo viral (Fig. 7).

Figura 7. Atividade promotora diferencial entre as diferentes variantes do HPV-6. A variante da sublinhagem B1 foi dez vezes mais transcricionalmente ativa do que era uma variante da sublinhagem B3 (adaptado de MEASSO DO BONFIM et al., 2015)

Uma vez que uma associação significativa entre as variantes da sublinhagem B1 e o desenvolvimento de VGs em homens foi recentemente descrita, é possível supor que a maior atividade transcricional poderia resultar na expressão aumentada de E1 e E2 viral, o que pode conferir uma replicação potencialmente maior às variantes B1 (FLORES-DÍAZ et al., 2017a).

2. JUSTIFICATIVA

Mais de 25 anos de estudos acerca do ciclo de vida e das propriedades transformantes de tipos de HPV que infectam a mucosa epitelial estabeleceram a relação causal direta entre a infecção por HPV e o desenvolvimento das neoplasias associadas. Mundialmente, as VGs e a rara PRR estão etiologicamente associadas aos HPVs - 6 e -11. Ademais, estes HPVs estão entre os tipos de baixo-risco mais frequentemente detectados independentemente do sítio anatômico estudado. Interessantemente, o HPV-6 pode ser encontrado, embora raramente, como agente causal de neoplasias do colo do útero, vagina, vulva, canal anal, pênis e orofaringe. No que concerne à heterogeneidade genômica de HPV-6, foi observada homogeneidade na distribuição mundial das diferentes variantes moleculares. Mais recentemente, foi descrito que variantes da sublinhagem B1 de HPV-6 estão associadas a um maior risco de desenvolvimento de VGs em homens, em comparação às variantes da sublinhagem B3 (FLORES-DÍAZ et al., 2017a), e que variantes da sublinhagem B1 são 10 vezes mais transcionalmente ativas que variantes da sublinhagem B3 (MEASSO DO BONFIM et al., 2015). Estes resultados apontam para a relevância clínica da variabilidade intratípica do HPV-6, garantindo novos estudos que possam esclarecer as implicações funcionais da infecção por variantes B1 de HPV-6 no desenvolvimento de lesões genitais.

Iniciando no final dos anos 80, embora primordialmente restritos aos HPVs 16 e 18, o estudo dos elementos reguladores de papilomavírus progrediu rapidamente por cerca de 15 anos, contudo o interesse diminuiu drasticamente. Na última década, a tecnologia de arranjos permitiu identificar mais FTs que se ligam à sequência promotora viral. Cason e Kahn (2006) utilizaram um arranjo contendo 345 sítios de ligação para FTs, e por ensaios de competição identificaram fatores que se ligam especificamente à LCR de HPV-16, em células não-diferenciadas e

diferenciadas. No nosso laboratório uma abordagem poderosa analisou os efeitos funcionais de 704 FTs diferentes sobre a atividade da LCR de HPV-16 e HPV-18 utilizando-se um ensaio de transfecção de larga escala (SICHERO; SOBRINHO; VILLA, 2012). Este ensaio identificou 28 FTs que estimularam e 36 que reprimiram a atividade promotora a partir da LCR, a maior parte dos quais ainda não havia sido descrita impactar a LCR viral. Embora muitos destes FTs identificados pareçam agir por mecanismos indiretos, foram identificados sítios de ligação na LCR viral para um subconjunto destes moduladores potencialmente muito importantes da transcrição de HPV. Entretanto, ambos os estudos conduzido por nós (SICHERO; SOBRINHO; VILLA, 2012) e por Cason e Khan (2006) não são capazes de explicar todos os detalhes da regulação transcricional, além de claramente sugerir que muitos mecanismos mais complexos estão envolvidos do que os sugeridos pelas pesquisas anterior à década de 1990 e que tinham como alvo menos de uma dúzia de FTs específicos. Ainda mais, são poucos estudos que visaram a caracterização da atividade transcricional de LR-HPVs. Este conhecimento é fundamental para melhor compreender a biologia, patogenia, diagnóstico e manejo clínico das doenças associadas a estes tipos virais.

Uma compreensão mais ampla da expressão do RNAm do HPV e sua regulação poderia levar ao desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e revelar alvos celulares estratégicos para o desenvolvimento de terapias antivirais inovadoras (BERNARD, 2002). Embora a inibição de fatores regulatórios da transcrição possa ser prejudicial às células normais, uma vez que é necessária para a homeostase da célula hospedeira, estas proteínas podem ser inibidas usando compostos direcionados às sequências específicas de LCR, afetando assim o ciclo de vida viral.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo principal

Este projeto visa caracterizar de maneira abrangente a LCR e a atividade transcricional do promotor precoce de E6 (P90) de variantes moleculares de HPV-6 pertencentes às sublinhagens B1 e B3.

3.2. Objetivos específicos

Mais especificamente, objetiva-se:

- (1) identificar FTs celulares que atuem sobre a LCR de HPV-6 utilizando-se uma tecnologia de transfecção de arranjos de cDNA de FTs;
- (2) identificar FTs celulares que atuem distintamente sobre a LCR de variantes moleculares de HPV-6 pertencentes às sublinhagens B1 e B3;
- (3) determinar quais dentre estes FTs celulares se ligam à LCR viral;
- (4) determinar o impacto destes FTs celulares sinergisticamente sobre a atividade transcricional de P90 de HPV-6 das diferentes variantes moleculares.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura celular

Para a identificação e validação dos FTs que atuam sobre a LCR de HPV-6 e para os ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), células C33 (queratinócitos derivados de carcinoma de colo de útero HPV negativo e TP53 mutado) (ATCC nº HTB-31) foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), ou meio D10.

Para os ensaios de *western blot*, células de epitélio humano de tonsila (HTE, *human tonsilar epithelial cells*), queratinócitos orais normais imortalizados por hTERT (NOKs, *normal oral keratinocytes*) – ambas gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Paul F. Lambert (McArdle Laboratory for Cancer Research, Wisconsin, EUA) – e queratinócitos humanos primários de prepúcio (PHK, *primary human foreskin keratinocytes*) (Clonetics, Nova Jersey, EUA) foram cultivadas em meio KSFM livre de soro (*Keratinocyte Serum-Free Medium*) (Life Technologies, Califórnia, EUA); queratinócitos humanos imortalizados espontaneamente (HaCat) (BCRJ nº 0341) foram cultivados em meio D10 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* suplementado com 10% de soro fetal bovino)

(Gibco/Thermofisher, Massachusetess, EUA); e células de carcinoma de hipofaringe (FaDu) (ATCC nº HTB-43) foram cultivadas em meio M10 (*Minimum Essential Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Todos os cultivos foram feitos em garrafas T175cm², a 37°C e com CO₂ a 5%.

4.2. Análise da atividade transcricional das variantes B1 e B3 de HPV-6

Para a análise da atividade transcricional, foi utilizada a tecnologia de *Transcription Factor-Genome-wide full lenght cDNA transfection ready clone sets (GFC)-Transfection Array* (Origene, Maryland, EUA). Este arranjo consiste de 704 plasmídeos de expressão que contêm cDNA humanos de todas as categorias de FTs. Estes plasmídeos são fornecidos liofilizados em placas de 384 poços. Os plasmídeos foram então ressuspensos em água destilada e deionizada, sendo em seguida transformados por choque térmico em bactérias *E.coli* competentes. O DNA plasmidial foi então purificado e sequenciado para confirmação da sequência nucleotídica adequada do FT.

A análise da atividade transcricional de ambas as variantes moleculares de HPV-6 foi realizada inicialmente em larga escala empregando-se células C33. Em resumo, em cada poço de placas de 384 poços foram adicionados 60ng de cada plasmídeo de expressão de FT, 100ng do plasmídeo recombinante *reporter* (pGL3-LCR-HPV-6-B1-Luc ou pGL3-LCR-HPV-6-B3-Luc) previamente construídos no laboratório (MEASSO DO BONFIM et al., 2015), além do reagente de transfecção Eugene6 (Roche, Indianápolis, EUA). Foram realizados 3 experimentos independentes com cada variante molecular e cada FT.

Após 48 horas, a medida da atividade transcricional das diferentes variantes foi medida indiretamente pela atividade da enzima luciferase utilizando-se o kit *ONE-Glo Luciferase Assay System* (Promega, Madison, EUA), e as leituras de luminescência foram realizadas no equipamento *Victor Light Luminescence Counter* (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA).

4.3. Ensaios de Validação

Células C33 foram transfectadas em placas de 96 poços com 100ng do plasmídeo recombinante

repórter (pGL3-LCR-HPV-6-B1-Luc ou pGL3-LCR-HPV-6-B3-Luc), quantidades crescentes do vetor de expressão contendo o cDNA correspondente ao FT a ser analisado a fim de verificar uma possível dose dependência do efeito transativador ou transrepressor do mesmo (25, 100, e 300ng), além de 100ng do vetor pCMV- β -Gal (MACGREGOR; CASKEY, 1989), sendo este utilizado como controle interno da eficiência da transfecção medida indiretamente pela atividade da enzima β -Galactosidase.

Após 48 horas da transfecção, o extrato total de proteína foi extraído utilizando-se o *Reporter Lysis Buffer* (Promega, Madison, EUA). A leitura da luminescência foi medida no equipamento *Victor Light Luminescence Counter* (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA) empregando-se o *kit ONE-Glo Luciferase Assay System* (Promega, Madison, EUA) conforme instruções do fabricante. Para o ensaio de β -Galactosidase foi utilizado o *kit The Promega β -Galactosidase enzyme assay system*. A atividade relativa da enzima β -Galactosidase foi medida por leitura a 420nm em um *microplate* Benchmark (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Foram realizados 16 experimentos independentes com cada controle e cada fator de transcrição em triplicata.

4.4. Ligação de FTs à LCR das sublinhagens de HPV-6

A fim de identificar potenciais sítios de ligação dos FTs selecionados na LCR de HPV-6, análises *in silico* utilizando o banco de dado JASPAR (base de dados de FTs e seus sítios de ligação ao DNA) foram realizadas (<http://jaspar.genereg.net/>).

A sequência inteira da LCR de ambas as variantes foi introduzida nos bancos de dados e os possíveis sítios de ligação de todos os FTs indicados pelos programas foram anotados para comparações.

4.5. Transformação de bactérias *E. coli* por choque térmico

Os plasmídeos de expressão contendo a sequência de diversos FTs foram transformados em bactérias *E. coli* DH5 α por choque térmico. Estes plasmídeos são oriundos da tecnologia *Transcription Factor-Genome-wide full lenght cDNA transfection ready clone sets (GFC)-Transfection Array* (Origene, Maryland, EUA) e foram fornecidos 60 ng de cada liofilizados,

sendo posteriormente ressuspensos em 40µL de água destilada e deionizada. Na transformação bacteriana, foram adicionados à 50µL de bactérias *E. coli*, 5µL do DNA do plasmídeo a ser transformado e a solução foi mantida em gelo por 30 minutos. A solução foi incubada à 42°C por 2 minutos e mais 1 minuto em gelo. 500µL de meio de cultura LB (Invitrogen, Califórnia, EUA) foram adicionados a solução e esta foi incubada por 1h a 37°C, sob agitação de 180 rpm. 200µL da solução foram então plaqueados em placas de 10cm contendo meio LB agar (Invitrogen, Califórnia, EUA) e antibiótico ampicilina (Invitrogen, Califórnia, EUA), na concentração final de 65µg/mL, e a placa foi incubada por aproximadamente 16h a 37°C.

Uma única colônia foi transferida para um tubo falcon de 50mL contendo 5mL de meio de cultura LB e antibiótico ampicilina, concentração final de 50µg/mL, e o tubo foi incubado a 37°C por aproximadamente 16h, sob agitação a 200rpm. Em seguida, o DNA plasmidial foi purificado por minipreparação.

4.6. Purificação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi isolado de bactérias competentes por minipreparação utilizando-se o *kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System A160* (Promega, Madison, EUA) de acordo com protocolo definido pelo fabricante, sendo em seguida o DNA sequenciado utilizando-se os iniciadores F0 e R0 complementares ao vetor pGL3-Basic em um sequenciador *ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer* (ThermoFisher, Massachusetts, EUA), utilizando-se o reagente *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) .

4.7. Sequências dos iniciadores utilizados

Para o sequenciamento dos plasmídeos de expressão contendo as sequências dos FTs, foram utilizados os *iniciadores* F0 (5'-GGACTTTCCAAAATGTCTG-3') e R0 (5'-ATTAGGACAAGGCTGGTGGG-3').

Para análise dos ensaios de ChIP por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), foram inicialmente utilizados os pares de iniciadores F1 (5'-

GTGTGTATGTACTGTTATGTATATGTG-3') / R1 (5'-CACTGAGTCACAGGGTGTA-3'), F2 (5'-CGCCTTACACACATAAGTAA-3') / R2 (5'-GAGTAAGGCAATACCGCA-3') e F3 (5'-TTTATTGCCACTGCAATAA-3') / R3 (5'-GCTAAATTTTAGGGCTGGTT-3'), de modo a amplificar 3 regiões distintas da LCR de ambas as variantes de HPV-6: entre os nucleotídeos 7220 e 7452, entre 7480 e 7725 e entre 7730 e 8019 (respectivamente) para a variante B1; e entre os nucleotídeos 7322 e 7534, entre 7562 e 7806 e entre 7811 e 91 (respectivamente) para a variante B3, cobrindo desta forma a LCR inteira.

Devido ao não funcionamento adequado nas reações com os iniciadores inicialmente utilizados, foram desenhados novos iniciadores para análise dos ensaios de ChIP por RT-qPCR: F4 (5'-TGTGTGTATGTACTGTTATGTATATGTG-3') / R4 (5'-ATTACACACATAACACACACACAC-3'), F5 (5'-GTGTAATGTGTATGTGTGTTTATGTG-3') / R5 (5'-CATGTATATTACTTATGTGTGTAAGGC-3'), F6 (5'-GCCTTACACACATAAGTAATATACATG-3') / R6 (5'-CAAAATATATAGGATTAACAGGCAAC-3'), F7 (5'-TTGCCAAGTGCATCATATC-3') / R7 (5'-GCTACAAGCCAAAAATGC-3'), F8 (5'-GCACATTTTTTTGCTCTTACTG-3') / R8 (5'-GTTGAACCGTTTTTCGGTC-3') (Fig. 8). As seqüências de todos os iniciadores e seus usos estão indicadas na tabela 2.

Figura 8. Desenho esquemático das posições dos iniciadores #4 a #8 alinhados na sequência da LCR da variante B1, utilizada como molde para desenhos dos iniciadores. Os iniciadores foram desenhados de modo que não se alinhassem nas regiões que continham mutação, alinhando, portanto, no mesmo local na LCR das duas variantes.

Tabela 2. Sequências e usos de todos os iniciadores utilizados ao longo deste projeto.

Iniciadores	Sequência	Uso
F'	5'-TAGCAAAATAGGCTGTCCC -3'	Sequenciamento LCRs
R'	5' -TATGTTTTTGGCGTCTTCC -3'	
F0	5'-GGACTTTCCTAAAATGTCTG -3'	Sequenciamento FTs
R0	5'-ATTAGGACAAGGCTGGTGGG- 3'	
F1	5'- GTGTGTATGTACTGTTATGTATATGTG - 3'	Análise ChIP
R1	5'-CACTGAGTCACAGGGTGTA-3'	
F2	5'-CGCCTTACACACATAAGTAA-3'	Análise ChIP
R2	5'-GAGTAAGGCAATACCGCA-3'	
F3	5'- TTTATTGCCACTGCAATAA-3'	Análise ChIP
R3	5'-GCTAAATTTTAGGGCTGGTT-3'	
F4	5'-TGTGTGTATGTACTGTTATGTATATGTG-3'	Análise ChIP
R4	5'- ATTACACACATAACACACACACAC-3'	
F5	5'-GTGTAATGTGTATGTGTGTTTATGTG -3'	Análise ChIP
R5	5'-CATGTATATTACTTATGTGTGTAAGGC-3'	
F6	5'- GCCTTACACACATAAGTAATATACATG-3'	Análise ChIP
R6	5' - CAAAATATATAGGATTAACAGGCAAC- 3'	
F7	5' - TTGCCAAGTGCATCATATC - 3'	Análise ChIP
R7	5' - GCTACAAGCCAAAAATGC - 3'	
F8	5' - GCACATTTTTTTGCTCTTACTG - 3'	Análise ChIP
R8	5' - GTTGAACCGTTTTTCGGTC - 3'	

4.8. Ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP)

Foram utilizados dois kits distintos para os ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP). Primeiramente utilizamos o kit *High-Sensitivity ChIP Kit* (Abcam, Cambridge, Inglaterra) para os ensaios de imunoprecipitação de cromatina das células C33 permanentemente transfectadas com a LCR de uma das duas variantes B1 ou B3, de acordo com instruções dos fabricantes. Brevemente,

foi feito o *cross-link* do DNA com os FTs nas células C33 por incubação com formaldeído 1% livre de metanol (Polyscience, Filadélfia, EUA), sendo em seguida incubadas com solução de glicina 1,25 M. A fragmentação da cromatina foi realizada por sonicação de 10 pulsos de 15 segundos utilizando a Cuba Ultrassônica (Cristófoli, Paraná, Brasil). O tamanho dos fragmentos produzidos foi verificado por eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed (Biotium, Freemont, Canadá) na concentração 1X. A cromatina fragmentada foi incubada com 0,8µg de anticorpo policlonal de coelho anti-SOX7 (ab89954, Abcam, Cambridge, Inglaterra) ou anticorpo monoclonal de coelho anti-HOXA13 (ab172570, Abcam, Cambridge, Inglaterra), assim como anti-RNA polIII ou IGG não imune (Abcam, Cambridge, Inglaterra) fornecidos no kit, utilizados como controles positivos e negativos, respectivamente.

Segundamente, utilizamos o *MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System* (Invitrogen, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Novamente, o *cross-link* do DNA com os FTs nas células C33 foi feito por incubação com formaldeído 1% livre de metanol (Polyscience, Filadélfia, EUA), sendo em seguida também incubadas com solução de glicina 1,25 M. A cromatina foi então fragmentada com 15 pulsos de 15 segundos a uma intensidade de 4 no sonicador *Sonic Dismembrator Model 100* (Fisher Scientific, New Hampshire, EUA). A cromatina foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed (Biotium, Freemont, Canadá) na concentração 1X com o objetivo de avaliar o tamanho dos fragmentos gerados e incubada com 1,5µg dos anticorpos de anti-SOX7 ou anti-HOXA13 supracitados, assim como anti-RNA polIII ou IGG não imune, utilizados como controles positivos e negativos, respectivamente.

Ainda, uma amostra de cromatina fragmentada não foi incubada com nenhum anticorpo em nenhum dos dois protocolos descritos, de modo a ser utilizada como o terceiro controle (*input*) nas análises. O DNA recuperado foi submetido à análise por PCR em tempo real.

4.9. Padronização dos iniciadores utilizados

Primeiramente, os iniciadores utilizados tiveram sua temperatura ótima de funcionamento padronizada por reações em cadeia da polimerase (PCR convencional). Para isto, foi utilizada a

GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As seguintes temperaturas de anelamento foram testadas: 52°C, 55°C e 58°C para a primeira leva de iniciadores utilizados na análise dos ensaios de ChIP; e 55°C, 58°C e 60°C para a segunda leva de iniciadores utilizados na análise dos ensaios de ChIP. Em seguida, para determinar a concentração ótima dos iniciadores foram realizados experimentos de PCR em tempo real, como descrito a seguir.

4.10. PCR em tempo real (RT-qPCR)

Para análise do DNA recuperado após os ensaios de imunoprecipitação de cromatina e padronização das temperaturas de anelamento e concentração adequadas dos iniciadores pedidos, foram realizadas reações de RT-qPCR utilizando o reagente *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, Madison, EUA). Brevemente, à 10µL deste reagente foram adicionados 1µL do plasmídeo da LCR de B1 (utilizada como molde para construção dos iniciadores) a uma concentração de 30ng/µL, 7µL de água destilada e deionizada e, por fim, 1µL dos iniciadores a serem utilizados nos ensaios de ChIP em diferentes concentrações (200nM, 500nM e 900nM), de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram realizadas no termociclador *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

4.11. Análises estatísticas

Para calcular a diferença estatística entre as diferentes quantidades de plasmídeos de expressão transfectados nos ensaios de validações, primeiramente foram removidos *outliers* matematicamente calculados utilizando-se a amplitude interquartil. Em seguida, testes de normalidade utilizando o teste Shapiro-Wilk foram feitos para indicar o tipo de distribuição das populações (paramétrica ou não-paramétrica). Após a comprovação que as distribuições das diferentes populações nos ensaios eram não-paramétricas, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e de comparações múltiplas de Dunn para identificar quais as populações que diferiam significativamente.

5. Resultados

5.1. Comparação das sequências das LCRs das variantes de B1 e B

Plasmídeos recombinantes repórteres previamente construídos no nosso laboratório (MEASSO DO BONFIM et al., 2015) contendo a sequência da LCR de uma das duas variantes (pGL3-LCR-HPV-6-B1-Luc ou pGL3-LCR-HPV-6-B3-Luc) foram sequenciados utilizando os primers F' e R', e as sequências obtidas foram alinhadas utilizando a plataforma BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), de modo a permitir a visualização das dissimilaridades nucleotídicas entre as sequências da LCR das duas variantes (Fig. 10).

Variante	Posição no genoma	Sequência						Posição no genoma
B1	7191	tatatgtgta	tatgtactgt	tatatatatg	tgtgtatgta	ctgttatgta	tatgtatgta	7250
B3	7293	TATATGTGTA	TATGTACTGT	TATATATATG	TGTGTATGTA	CTGTTATGTA	TATGTCTGTA	7352
B1	7251	tgtactgtta	tatgtatgtg	tgtgttatat	atgtgtgtat	atgtgtgtat	gtgtgtatat	7310
B3	7353	TGTACTGTTA	TATGTATGTG	TGTGTATAT	ATGTGTGTAT	ATATGTGTAT	GTGTGTATAT	7412
B1	7311	gtatatgtat	gtgtgtgtta	tatatatgtg	tgtgtgtgtt	atgtgtgtaa	tgtatattat	7370
B3	7413	GTATATGTAT	GTGTGTGTAA	TATATATGTG	TGTGTGTGTT	ATGTGTGTAA	TGTAATTAT	7472
B1	7371	ttgtgtaatg	tgtatgtgtg	tttatgtgca	ATAACAATT	AACTACATTA	TGTATATCT	7430
B3	7473	TTGTGTAATG	TGTATGTGTG	TTTATGTGCA	ATAACAATT	AAC-----	-----	7515
B1	7431	TGTTACACCC	TGTGACTCAG	TGGCTGTTGC	ACGCGTTTTG	GTTTGACACG	GCCTTACACA	7490
B3	7516	---TACACCC	TGTGACTCAG	TGGCTGTTGC	ACGCGTTTTG	GTTTGACACG	GCCTTACACA	7572
B1	7491	cataagtaat	atacatgcac	aatatatata	ttttgttcc	caataatata	tttttatatt	7550
B3	7573	CATAAGTAAT	ATACATGCAC	AATATATATA	TTTTG-TTA	CAATAATATA	TTTTTATATT	7631
B1	7551	tGCAACCGTT	TTCCGTTGCC	CTTGGCATA	ACTTCCACC	AATTTGTAC	AACGTGTTGC	7610
B3	7632	TGCAACCGTT	TTCCGTTGCC	CTTGGCATA	ACTTCCACC	AATTTGTAC	AACGTGTTGC	7691
B1	7611	CTGTTAATCC	TATATATTTT	GTGCCAGGTA	CACATTGCC	TGCCAAGTTC	ATTGCCAAGT	7670
B3	7682	CTGTTAATCC	TATATATTTT	GTGCCAGGTA	CACATTGCC	TGCCAAGTTC	ATTGCCAAGT	7751
B1	7671	GCATCATATC	CTGCCAATCA	CACACCTGGC	GCCAGGGTGC	GGTATTGCCT	TACTCATATG	7730
B3	7752	GCATCATATC	CTGCCAATCA	CACACCTGGC	GCCAGGGTGC	GGTATTGCCT	TACTCATATG	7811
B1	7731	TTTATTGCCA	CTGCCAATAAA	CCTGTCTTTG	TGTTATACTT	TATGCACTG	TAGCCAACTC	7790
B3	7812	TTTATTGCCA	CTGCCAATAAA	CCTGTCTTTG	TGTTATACTT	TCTGCACTG	TAGCCAACTC	7871
B1	7791	TTAAAAGCAT	TTTTGGCTTG	TAGCAGCA	TTTTTTTGCT	CTTACTGTTT	GGTATACAAT	7850
B3	7872	TTAAAAGCAT	TTTTGGCTTG	TAGCAGCA	TTTTTTTGCT	CTTACTGTTT	GGTATACAAT	7931
B1	7851	AACATAAAAA	TGAGTAACCT	AAGGTACAC	ACCTGCAACC	GGTTTCGGTT	ATCCACACCC	7910
B3	7932	AACATAAAAA	TGAGTAACCT	AAGGTACAC	ACCTGCAACC	GGTTTCGGTT	ATCCACACCC	7991
B1	7911	TACATATTTT	CTTCTTATAG	TTAATAACAA	TCTTGGTTTT	AAAAAATAGG	AGGGACCGAA	7970
B3	7992	TACATATTTT	CTTCTTATAG	TTAATAACAA	TCTTGGTTTT	AAAAAATAGG	AGGGACCGAA	41
B1	7971	AACGGTTCAA	CCGAAAACGG	TTGTATATA	ACCAGCCCTA	AAATTTAGCA	AACGAGGCATT	8031
B3	42	AACGGTTCAA	CCGAAAACGG	TTGTATATA	ACCAGCCCTA	AAATTTAGCA	AACGAGGCATT	102

Figura 9. Divergências nucleotídicas entre as sequências das LCRs das variantes B1 e B3 de HPV-6. Retângulos vermelhos indicam as posições das divergências nucleotídicas, sendo os traços (-) indicativos de inserções na LCR da variante B1 e a ausência de barras de alinhamento (|) indicativos de substituições nucleotídicas.

5.2. Identificação dos fatores de transcrição que atuam sobre as LCRs

A fim de verificar se as divergências nucleotídicas impactam sobre o efeito de diferentes FTs sobre a LCR das variantes de HPV-6 e, conseqüentemente, impactam a atividade transcricional destas, foi realizado inicialmente, um *screening* empregando-se um arranjo com plasmídeos de expressão contendo a sequência nucleotídica de diversas classes de FT.

Dos 704 FTs originalmente fornecidos na tecnologia *Transcription Factor-Genome-wide full lenght cDNA transfection ready clone sets (GFC) Transfection Array* (Origene, Maryland, EUA), 535 plasmídeos foram eficazmente clonados e sequenciados, construindo-se, assim, uma biblioteca de expressão de fatores de transcrição. Os plasmídeos de expressão foram co-transfectados em células C33, juntamente com o plasmídeo repórter de uma das duas variantes de HPV-6 (pGL3-LCR-HPV-6-B1-Luc ou pGL3-LCR-HPV-6-B3-Luc), e a luminescência dessas células foi medida após 48h.

Dentre os 535 plasmídeos da biblioteca de expressão, 77 FTs foram identificados capazes de ativar duas vezes ou mais ou reprimir ao menos pela metade a atividade transcricional da LCR de pelo menos uma das variantes em ao menos 2 dos 3 experimentos de *screening* realizados (Fig. 9a). Enquanto a maioria dos FTs identificados ativam a LCR da variante da sublinhagem B1, a LCR da variante da sublinhagem B3 é reprimida ou não sofre efeito após superexpressão destes FTs (Fig. 9b).

a)

b)

		B3			
		Ativa	Sem efeito	Inibe	Total
B1	Ativa	6	30	1	37
	Sem efeito	2	-	31	33
	Inibe	1	6	-	7
	Total	9	36	32	77

Figura 10. Análise da atividade transcricional de variantes moleculares pertencentes às sublinhagem B1 e B3 de HPV-6. A análise da atividade transcricional foi realizada utilizando-se a tecnologia (GFC) Transfection Array. Células C33 foram co-transfectadas com 60ng de plasmídeo de expressão contendo cDNA de diferentes classes de fatores de transcrição (FT). Após 48h, essas células foram lisadas e a luminescência medida. (a) 77 FTs ativaram duas vezes ou mais ou inibiram ao menos pela metade a atividade transcricional de pelo menos uma das variantes, em pelo menos dois dos três experimentos independentes realizados (N1, N2 e N3). As medidas de luminescência obtidas foram comparadas com a medida de luminescência da atividade basal da LCR (sem transfecção do plasmídeo de expressão), arbitrariamente classificada como 1. Quanto maior a ativação do FT, mais intensa a coloração verde no heatmap, e quanto maior a inibição do FT, mais intensa é a coloração vermelha; em preto estão os FTs que não tem efeito sobre a LCR das variantes. (b) Diagrama de Venn ilustrando os efeitos de cada FT sobre a atividade transcricional de cada variante, sendo os fatores ativadores destacados em verde e os fatores inibidores destacados em vermelho; fatores que possuem efeitos opostos nas duas variantes estão destacados em amarelo. Aqueles FTs que tem efeito apenas na atividade transcricional da variante B1 se encontram no círculo azul, enquanto que os FTs que tem efeito apenas na atividade transcricional de B3 se encontram no círculo roxo; na interseção entre os círculos se encontram os fatores que tem efeito em ambas as variantes. A tabela mostra o número total de fatores que ativam ou reprimem a LCR das variantes, desse modo é possível observar a maior quantidade de fatores ativando a atividade transcricional de B1 (36) quando comparada com B3 (10), além de observar a maior quantidade de FT inibindo a atividade transcricional da variante de B3 (33) em comparação a atividade de B1 (7).

A tabela 3 mostra os dados de luminescência normalizados pela luminescência da atividade basal da LCR de cada variante obtidos nos três experimentos independentes realizados (N1, N2 e N3), assim como o símbolo do FT e sua sequência identificadora no banco de dados GenBank.

Tabela 3. Dados de luminescência normalizados pela luminescência da atividade basal da LCR. Estes dados foram obtidos a partir da realização de três experimentos independentes, N1, N2 e N3. Em verde estão aqueles FTs que ativam duas vezes ou mais a atividade transcricional da variante, enquanto que os FT que inibem pelo menos na metade estão indicados em vermelho; os FT que não tem efeito sobre a variante ($0.6 \leq \text{dados de luminescência} \leq 1.9$) estão indicados em preto.

Identificação GenBank	Nome FT	B1			B3		
		N1	N2	N3	N1	N2	N3
NM_005760	CEBPZ	1.8	2.1	3.2	2.1	2.1	1.5
NM_000660	TGFB1	78.8	1.0	3.4	2.9	0.2	2.0
NM_014724	ZNF305	64.3	2.8	3.4	2.7	1.8	2.5
NM_030573	THAP7	22.0	2.4	4.0	1.1	2.5	2.3
NM_006625	FUSIP1	41.2	2.5	2.0	1.9	2.2	2.6
NM_015898	ZBTB7A	38.5	2.3	2.3	2.1	0.7	3.2
NM_003269	NR2E1	1.9	7.6	7.0	1.2	2.6	1.3
NM_016531	KLF3	2.5	1.6	4.5	1.6	1.0	1.0
NM_005596	NFIB	2.6	2.0	1.9	1.4	0.9	1.1
NM_005653	TFCP2	2.0	2.1	1.8	1.5	0.8	0.9
NM_014517	UBP1	2.4	2.3	2.8	1.4	2.7	1.2
NM_013354	CNOT7	2.2	2.1	1.8	1.4	1.0	1.6
NM_018975	TERF2IP	2.4	2.5	1.7	1.5	1.5	1.0
NM_003670	BHLHB2	5.6	1.6	3.1	1.6	1.2	1.3
NM_021132	PPP3CB	1.8	2.5	3.0	1.6	1.4	1.4
NM_005339	HIP2	2.3	2.9	0.8	1.0	0.9	0.6
NM_006874	ELF2	2.5	2.4	1.9	1.6	1.0	1.5
NM_012086	GTF3C3	1.8	2.3	2.0	2.1	0.9	1.0
NM_006958	ZNF16	4.5	1.8	2.6	1.4	0.1	1.3
NM_021705	NFYA	2.0	2.2	1.4	1.5	1.0	1.3
NM_002687	PNN	2.0	2.2	1.9	1.6	1.7	1.4
NM_005642	TAF7	2.1	1.1	2.0	1.1	1.6	1.2
NM_005916	MCM7	2.7	2.3	2.1	0.9	1.6	1.1
NM_014213	HOXD9	2.4	1.6	2.1	1.3	1.3	1.0
NM_012099	CD3EAP	2.3	1.8	2.4	1.2	1.4	1.5
NM_138494	ZNF655	43.6	2.0	3.1	1.1	0.9	1.6
NM_020727	ZNF295	60.7	2.3	2.7	1.1	1.3	3.1
NM_138473	SP1	28.1	2.1	2.3	1.5	0.8	1.8
NM_003601	SMARCA5	52.0	2.4	3.4	1.2	0.8	3.7
NM_152735	ZBTB9	55.4	2.4	2.6	1.1	0.8	2.6
NM_020924	ZBTB26	78.1	3.1	3.0	1.4	0.4	3.2
NM_001564	ING2	121.2	2.4	2.4	1.0	1.0	2.3
NM_003884	PCAF	54.4	2.2	3.3	0.9	1.2	1.1
NM_001730	KLF5	66.6	2.1	3.5	1.0	0.3	0.9
NM_003223	TFAP4	54.0	3.2	4.1	1.9	1.0	1.8
NM_000522	HOXA13	41.6	2.3	3.2	0.7	0.6	1.7
NM_005461	MAFB	1.1	1.0	0.8	1.1	2.3	2.8
NM_000325	PITX2	20.9	1.0	1.3	2.1	1.1	2.6
NM_004379	CREB1	7.4	0.3	0.5	2.7	0.9	5.1
NM_004789	LHX2	16.9	0.5	0.5	0.6	0.6	0.7
NM_030593	SIRT2	0.4	0.5	0.4	0.8	0.6	0.9
NM_152475	ZNF417	18.7	0.5	0.4	0.6	0.7	1.0
NM_005249	FOXG1B	0.5	0.5	0.4	1.0	1.1	0.8
NM_000123	ERCC5	1.3	0.1	0.1	1.8	0.6	1.1
NM_025231	ZNF435	1.6	0.1	0.1	1.1	0.1	1.3
NM_003016	SFRS2	0.6	0.8	0.5	0.7	0.3	0.5
NM_002913	RFC1	1.9	1.8	2.5	0.3	1.7	0.5
NM_152323	SPIC	12.5	0.5	0.8	0.5	0.4	0.5

NM_004599	SREBF2	23.1	0.7	0.8	0.5	0.5	0.8
NM_024504	PRDM14	10.8	0.8	0.8	0.5	1.4	0.5
NM_002503	NFKBIB	18.0	0.6	0.6	0.5	0.5	0.6
NM_005225	E2F1	17.1	0.6	0.8	0.1	0.3	0.8
NM_005653	TFDP2	11.6	0.4	0.6	0.4	0.3	0.7
NM_015897	PIAS4	12.6	0.5	0.6	0.4	0.4	0.9
NM_015975	TAF9B	0.9	0.9	0.6	0.4	0.2	0.3
NM_020395	INTS12	1.5	1.1	0.2	0.9	0.0	0.5
NM_001422	ELF5	1.0	1.0	0.4	0.5	0.1	0.6
NM_006352	ZNF238	27.7	1.1	1.0	0.5	0.3	0.7
NM_003068	SNAI2	14.5	0.0	0.7	0.5	0.5	0.8
NM_003213	TEAD4	21.7	0.9	1.1	0.5	0.5	1.1
NM_015874	RBPSUH	26.6	1.0	1.3	0.6	0.5	0.5
NM_006299	ZNF193	19.9	1.1	0.9	0.5	0.5	0.5
NM_006898	HOXD3	32.2	1.0	1.2	0.6	0.5	0.5
NM_014965	TRAK1	20.1	0.9	0.8	0.5	0.4	0.8
NM_145271	ZNF688	20.9	1.4	1.1	0.1	0.5	1.5
NM_153607	LOC153222	19.4	0.5	0.8	0.5	0.5	0.7
NM_130898	CREB3L4	25.6	0.4	1.1	0.4	0.4	0.9
NM_003187	TAF9	32.3	1.6	2.2	0.5	0.5	1.0
NM_152626	ZNF92	27.6	0.9	1.0	0.5	0.4	0.8
NM_153633	HOXC4	26.3	1.2	1.4	0.5	0.5	1.4
NM_031439	SOX7	22.0	0.9	0.8	0.4	0.2	0.2
NM_139353	TAF1C	32.6	1.3	0.9	0.5	0.4	1.0
NM_080740	SUHW1	85.3	0.9	2.0	0.5	0.5	1.1
NM_152736	ZNF187	61.0	0.8	1.2	0.4	0.3	1.6
NM_014607	UBXD2	16.4	0.9	1.1	0.5	0.3	0.8
NM_001986	ETV4	54.3	0.9	1.1	0.4	0.5	1.3
NM_003489	NRIP1	27.2	0.8	1.9	0.5	0.2	1.1

5.3. Identificação de sítios de ligação putativos dos FTs na LCR

Com o objetivo de determinar quais dentre os 77 FTs possuem sítios de ligação putativos na LCR das variantes de HPV-6, análises *in silico* utilizando a plataforma JASPAR foram realizadas. Foi observado que 9 FTs apresentam possíveis de sítios de ligação na LCR de ambas as variantes: TFDP2, LHX2, SNAI2, E2F1, ELF5, HOXA13, KLF5 e SP1, indicando que ao menos nestes casos o impacto sobre a atividade transcricional viral pode ser direto (Fig 11). Estes 9 fatores foram selecionados para seguir adiante nos ensaios de validação.

a)

SOX7

HOXA13

LHX2

KLF5

SP1

SNAI2

E2F1

TFCP2

ELF5

Variante	Posição no genoma	Sequência						Posição no genoma
B1	7191	tatatgtgta	tatgtactgt	tatatatatg	tgtgtatgta	ctgttatgta	tatgtgttta	7250
B3	7293	TATATGTGTA	TATGTACTGT	TATATATATG	TGTGTATGTA	CTGTTATGTA	TATGTGTGTA	7352
B1	7251	tgtactgta	tatgtatgtg	tgttgtatat	atgtgtgtat	atatgtgtat	gtgtgtatat	7310
B3	7353	TGTACTGTTA	TATGTATGTG	TGTTGTATAT	ATGTGTGTAT	ATATGTGTAT	GTGTGTATAT	7412
B1	7311	gtatatgtat	gtgttgtgta	tatatatgtg	tgtgtgtgtt	atgtgtgttaa	tgtaatattat	7370
B3	7413	GTATATGTAT	GTGTTGTGTA	TATATATGTG	TGTGTGTGTT	ATGTGTGTAA	TGTAATTTAT	7472
B1	7371	tttgttaatg	tgtatgtgtg	tttatgtgca	ATAAACAATT	AAC	TACATTA	7430
B3	7473	TTGTGTAATG	TGTATGTGTG	TTTATGTGCA	ATAAACAATT	A	-----	7515
B1	7431	TGTTACACCC	TGTGACTCAG	TGGCTGTTGC	ACGCGTTTTG	GTTTGACCGC	GCCTTAcaca	7490
B3	7516	---TACACCC	TGTGACTCAG	TGGCTGTTGC	ACGCGTTTTG	GTTTGACCGC	GCCTTACACA	7572
B1	7491	cataagtaat	atacatgcac	aatatatata	tttttgtttc	caataatata	tttttatatt	7550
B3	7573	CATAAGTAAT	ATACATGCAC	AATATATATA	TTTTTG-TTA	CAATAATATA	TTTTTATATT	7631
B1	7551	tGCAACCGTT	TTCGGTTGCC	CTTGGCATAC	ACTTTCCACC	AATTGTGTAC	AACGTGTTGC	7610
B3	7632	TGCAACCGTT	TTCGGTTGCC	CTTGGCATAC	ACTTTCCACC	AATTGTGTAC	AACGTGTTGC	7691
B1	7611	CTGTTAATCC	TATATATTTT	GTGCCAGGTA	GACATTGCCC	TGCCAAGTTG	ATTGCCAAGT	7670
B3	7682	CTGTTAATCC	TATATATTTT	GTGCCAGGTA	GACATTGCCC	TGCCAAGTTC	ATTGCCAAGT	7751
B1	7671	GCATCATATC	CTGCCAACCA	CACAGCTGGC	GGCAGGTTGC	GGTATTGCCCT	TACTCATATG	7730
B3	7752	GCATCATATC	CTGCCAACCA	CACAGCTGGC	GGCAGGTTGC	GGTATTGCCCT	TACTCATATG	7811
B1	7731	TTTATTGCCA	CTGCAATAAA	CCGTGCTTTG	TGTTATACTT	TTATGCACTG	TAGCCAACTC	7790
B3	7812	TTTATTGCCA	CTGCAATAAA	CCGTGCTTTG	TGTTATACTT	TTCTGCACTG	TAGCCAACTC	7871
B1	7791	TTAAAAGCAT	TTTTGGCTTG	TAGCAGCACA	tttttttGCT	CTTACTGTTT	GGTATACAAT	7850
B3	7872	TTAAAAGCAT	TTTTGGCTTG	TAGCAGAACA	TTTTTTTGTCT	CTTACTGTTT	GGTATACAAT	7931
B1	7851	AACATAAAAA	TGAGTAACCT	AAGGTCACAC	ACCTGCAACC	GGTTTCGGTT	ATCCACACCC	7910
B3	7932	AACATAAAAA	TGAGTAACCT	AAGGTCACAC	ACCTGCAACC	GGTTTCGGTT	ATCCACACCC	7991
B1	7911	TACAATATTTC	CTTCCTATAG	TTAATAACAA	TCTTGTTTTT	AAAAATAGG	AGGGACCGBA	7970
B3	7992	TACAATATTTC	CTTCCTATAG	TTAATAACAA	TCTTGTTTTT	AAAAATAGG	AGGGACCGBA	41
B1	7971	AACGGTTGAA	CCGAAAACGG	TTGTATATAA	ACCAGCCCTA	AAATTTAGCA	AACGAGGCATT	8031
B3	42	AACGGTTGAA	CCGAAAACGG	TTGTATATAA	ACCAGCCCTA	AAATTTAGCA	AACGAGGCATT	102

b)

	Variante	Posição no genoma	Sequência						Posição no genoma
	B1	7191	tatatgtgta	tatgtactgt	tatatatatg	tgtgtatgta	ctgttatgta	tatgtgttta	7250
	B3	7293	TATATGTGTA	TATGTA CTGT	TATATATATG	TGTGTATGTA	CTGTTATGTA	TATGTGTGTA	7352
	B1	7251	tgtactgtta	tatgtatgtg	tgttgtatat	atgtgtgtat	atgtgtgtat	gttgttatat	7310
	B3	7353	TGTACTGTTA	TATGTATGTG	TGTTGTATAT	ATGTGTGTAT	ATATGTGTAT	GTGTGTATAT	7412
	B1	7311	gtatatgtat	gtgttgtgtg	tatatatatg	tgtgtgtgtt	atgtgtgtta	tgttaatttat	7370
	B3	7413	GTATATGTAT	GTGTTGTGTA	TATATATGTG	TGTGTGTGTT	ATGTGTGTAA	TGTAATTTAT	7472
	B1	7371	ttgtgtaatg	tgtatgtgtg	tttatgtgCA	ATAAACAAAT	AACACATTA	TTGTATATCT	7430
	B3	7473	TTGTGTAATG	TGTATGTGTG	TTTATGTGCA	ATAAACAAAT	AAC-----		7515
	B1	7431	TGTTACACCC	TGTACTCAG	TGGCTGTTGC	ACGCGTTTTC	GTTTGCACGC	GCCTTAcaca	7490
	B3	7516	---TACACCC	TGTACTCAG	TGGCTGTTGC	ACGCGTTTTC	GTTTGCACGC	GCCTTACACA	7572
	B1	7491	cataagtaat	atacatgcac	aatatatata	tttttgttt	caataatata	tttttatatt	7550
	B3	7573	CATAAGTAAT	ATACATGCAC	AATATATATA	TTTTTG-TTA	CAATAATATA	TTTTTATATT	7631
	B1	7551	tGCAACCGTT	TTCGGTTGCC	CTTGGCATAc	ACTTTCcACC	AATTTGTTAC	AACGTGTTGC	7610
	B3	7632	TGCAACCGTT	TTCGGTTGCC	CTTGGCATAc	ACTTTCcACC	AATTTGTTAC	AACGTGTTGC	7691
	B1	7611	CTGTTAATCC	TATATATTTT	GTGCCAGGTA	CACATTGCCc	TGCCAAGTTG	ATTGCCAAGT	7670
	B3	7682	CTGTTAATCC	TATATATTTT	GTGCCAGGTA	CACATTGCCc	TGCCAAGTTG	ATTGCCAAGT	7751
	B1	7671	GCATCATATC	CTGCCAACCA	CACACCTGGC	GCCAGGGTGC	GGTATTGCCT	TACTCATATG	7730
	B3	7752	GCATCATATC	CTGCCAACCA	CACACCTGGC	GCCAGGGTGC	GGTATTGCCT	TACTCATATG	7811
	B1	7731	TTTATTGCCA	CTGCAATAAA	CCTGCTCTTG	TGTTACTATT	TTATGCACGT	TAGCCAACTC	7790
	B3	7812	TTTATTGCCA	CTGCAATAAA	CCTGCTCTTG	TGTTACTATT	TTCTGCACGT	TAGCCAACTC	7871
	B1	7791	TTAAAGCAT	TTTTGGCTTG	TAGCAGCACA	tttttttGCT	CTTACTGTTT	GGTATACAAT	7850
	B3	7872	TTAAAGCAT	TTTTGGCTTG	TAGCAGCACA	TTTTTTTCT	CTTACTGTTT	GGTATACAAT	7931
	B1	7851	AACATAAAAA	TGAGTAACCT	AAGGTCAcAC	ACCTGCAACC	GGTTTCGGTT	ATCCACACCC	7910
	B3	7932	AACATAAAAA	TGAGTAACCT	AAGGTCAcAC	ACCTGCAACC	GGTTTCGGTT	ATCCACACCC	7991
	B1	7911	TACATATTTC	CTTCTTATAG	TTAATAACAA	TCTTGGTTTT	AAAAAATAGG	AGGGACCGAA	7970
	B3	7992	TACATATTTC	CTTCTTATAG	TTAATAACAA	TCTTGGTTTT	AAAAAATAGG	AGGGACCGAA	41
	B1	7971	AACGGTTCAA	CCGAAAACGG	TTGTATATAA	ACCAGCCCTA	AAATTTAGCA	AACGAGGCATT	8031
	B3	42	AACGGTTCAA	CCGAAAACGG	TTGTATATAA	ACCAGCCCTA	AAATTTAGCA	AACGAGGCATT	102

Figura 11. Sequências completas da LCR de B1 e B3 com os sítios de ligação putativos observados in silico. Os 77 FTs identificados nos ensaios de arranjo foram analisados no banco de dados JASPAR e observou-se que (A) 9 FTs possuem sítios de ligação putativos na LCR de ambas as variantes (TFCP2, LHX2, SNAI2, E2F1, ELF5, HOXA13, KLF5, SP1 e SOX7). (B) Sítios de ligação putativos diferenciais entre as LCRs de B1 e B3.

Na tabela 4 é possível observar os sítios de ligação putativos diferenciais entre as sequências das duas variantes, as sequências preditivas desses sítios, assim como o score diferencial entre eles.

Tabela 4. Sequências putativas dos sítios de ligação dos 9 FTs encontrados nas análises in silico. Foram considerados como sítios de ligação putativos apenas os sítios que possuíam score maior ou igual a 0.85.

B1								
Matriz ID	Nome	Score	Score relativo	Sequência ID	Ínicio	Término	Fita	Sequência putativa
MA0650.1	HOXA13	11.59	0.92	B1	208	217	+	GCAATAAACA
MA0650.2	HOXA13	8.55	0.86	B1	207	217	+	TGCAATAAACA
MA0650.1	HOXA13	8.4	0.85	B1	340	349	+	CCAATAATAT
MA0650.1	HOXA13	11.59	0.92	B1	539	548	-	GCAATAAACA
MA0650.2	HOXA13	12.05	0.91	B1	539	549	-	GGCAATAAACA
MA0650.1	HOXA13	11.09	0.91	B1	553	562	+	GCAATAAACC
MA0650.2	HOXA13	10.45	0.89	B1	552	562	+	TGCAATAAACC
MA0700.1	LHX2	5.23	0.85	B1	398	407	+	ACCAATTTGT
MA0700.2	LHX2	11.95	0.95	B1	213	223	+	AAACAATTAAC
MA0700.1	LHX2	8.8	0.91	B1	214	223	+	AACAATTAAC
MA0700.1	LHX2	7	0.88	B1	214	223	-	GTTAATTGTT
MA0599.1	KLF5	11.99	0.96	B1	712	721	+	TCCACACCCCT
MA0599.1	KLF5	7.87	0.9	B1	242	251	+	GTTACACCCCT
MA0599.1	KLF5	6.86	0.89	B1	767	776	-	GTCCTCCTA
MA0599.1	KLF5	4.24	0.86	B1	514	523	-	ACCGCACCCCT
MA0079.3	SP1	9.63	0.9	B1	766	776	-	GTCCCTCCTAT
MA0745.1	SNAI2	5.34	0.85	B1	389	397	-	GGAAAGTGT
MA0745.1	SNAI2	6.24	0.87	B1	443	451	+	GCCAGGTAC
MA0745.1	SNAI2	6.26	0.87	B1	474	482	+	GCCAAGTGC
MA0745.1	SNAI2	9.04	0.93	B1	502	510	-	GCCAGGTGT
MA0745.2	SNAI2	10.03	0.88	B1	500	512	+	ACACACCTGGCGC
MA0745.1	SNAI2	10.23	0.95	B1	558	566	-	GACAGGTTT
MA0745.2	SNAI2	8.62	0.86	B1	556	568	+	ATAAACCTGTCTT
MA0745.1	SNAI2	11.82	0.98	B1	689	697	-	TGCAGGTGT
MA0745.2	SNAI2	11.84	0.91	B1	687	699	+	ACACACCTGCAAC
MA0024.2	E2F1	11.4	0.94	B1	505	515	-	CTGGCGCCAGG
MA0024.2	E2F1	11.4	0.94	B1	506	516	+	CTGGCGCCAGG
MA0145.3	TFCP2	13.52	0.96	B1	696	705	+	CAACCGGTTT
MA0145.3	TFCP2	13.09	0.95	B1	696	705	-	AAACCGGTTG
MA0145.3	TFCP2	9.23	0.87	B1	779	788	+	AAAACGGTTC
MA0145.3	TFCP2	8.23	0.86	B1	779	788	-	GAACCGTTTT
MA0136.2	ELF5	10.34	0.91	B1	725	735	-	AGAAGGAAATA

B3								
Matriz ID	Nome	Score	Score relativo	Sequência ID	Ínicio	Término	Fita	Sequência putativa
MA0650.1	HOXA13	11.59	0.92	B1	208	217	+	GCAATAAACA
MA0650.2	HOXA13	8.55	0.86	B1	207	217	+	TGCAATAAACA
MA0650.1	HOXA13	11.59	0.92	B1	518	527	-	GCAATAAACA
MA0650.2	HOXA13	12.05	0.91	B1	518	528	-	GGCAATAAACA
MA0650.1	HOXA13	11.09	0.91	B1	532	541	+	GCAATAAACC
MA0650.2	HOXA13	10.45	0.89	B1	531	541	+	TGCAATAAACC
MA0700.2	LHX2	11.95	0.95	B1	213	223	+	AAACAATTAAC
MA0700.1	LHX2	8.8	0.91	B1	214	223	+	AACAATTAAC
MA0700.1	LHX2	7	0.88	B1	214	223	-	GTTAATTGTT
MA0700.1	LHX2	5.23	0.85	B1	377	386	+	ACCAATTTGT
MA0700.1	LHX2	5.45	0.85	B1	446	455	-	GGCAATGAAC
MA0599.1	KLF5	11.99	0.96	B3	691	700	+	TCCACACCCCT
MA0599.1	KLF5	8.27	0.91	B3	222	231	+	ACTACACCCCT
MA0599.1	KLF5	6.86	0.89	B3	746	755	-	GTCCTCCTA
MA0599.1	KLF5	4.24	0.86	B3	493	502	-	ACCGCACCCCT
MA0079.3	SP1	9.63	0.9	B3	745	755	-	GTCCCTCCTAT
MA0745.1	SNAI2	5.34	0.85	B3	368	376	-	GGAAAGTGT
MA0745.1	SNAI2	6.24	0.87	B3	422	430	+	GCCAGGTAC
MA0745.1	SNAI2	6.26	0.87	B3	453	461	+	GCCAAGTGC
MA0745.1	SNAI2	9.04	0.93	B3	481	489	-	GCCAGGTGT
MA0745.2	SNAI2	10.03	0.88	B3	479	491	+	ACACACCTGGCGC
MA0745.1	SNAI2	10.23	0.95	B3	537	545	-	GACAGGTTT
MA0745.2	SNAI2	8.62	0.86	B3	535	547	+	ATAAACCTGTCTT
MA0745.1	SNAI2	11.82	0.98	B3	668	676	-	TGCAGGTGT
MA0745.2	SNAI2	11.84	0.91	B3	666	678	+	ACACACCTGCAAC
MA0024.2	E2F1	11.4	0.94	B3	484	494	-	CTGGCGCCAGG
MA0024.2	E2F1	11.4	0.94	B3	485	495	+	CTGGCGCCAGG
MA0145.3	TFCP2	13.52	0.96	B3	675	684	+	CAACCGGTTT
MA0145.3	TFCP2	13.09	0.95	B3	675	684	-	AAACCGGTTG
MA0145.3	TFCP2	9.23	0.87	B3	758	767	+	AAAACGGTTC
MA0145.3	TFCP2	8.23	0.86	B3	758	767	-	GAACCGTTTT
MA0136.2	ELF5	10.34	0.91	B3	704	714	-	AGAAGGAAATA

5.4. Validação do efeito observado nos ensaios de arranjo dos nove FTs selecionados pela análise in silico

Os 9 FTs identificados pela análise in silico foram então utilizados nos experimentos de validação. Nestes ensaios, células C33 foram co-transfectadas com um dos dois plasmídeos repórteres (pGL3-LCR-HPV-6-B1-Luc ou pGL3-LCR-HPV-6-B3-Luc), além dos plasmídeos de

expressão, de maneira semelhante aos ensaios de arranjo. Entretanto, quantidades crescentes dos plasmídeos de expressão (25ng, 100ng e 300ng) foram transfectados com o objetivo de verificar o efeito dose dependente dos FTs sobre a atividade transcricional viral. Ainda mais, estas células foram co-transfectadas com o vetor controle pCMV- β -Gal (MACGREGOR; CASKEY, 1989) e todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Após 48h a luminescência foi medida, assim como a atividade da enzima β -galactosidase para ser utilizada como controle interno da eficiência da transfecção.

Dentre os 9 FTs selecionados para validação, HOXA13 ativou de maneira estatisticamente significativa a atividade transcricional da variante B1, enquanto SP1 apenas apresentou uma tendência de ativação da transcrição desta variante de HPV-6 (Fig. 12a). Por outro lado, E2F1, ELF5 e SNAI2 inibiram significativamente a atividade transcricional da variante B1 (Fig. 12b), enquanto LHX2 apresentou uma tendência em inibir (Fig 12c). KLF5, TFCP2 e SOX7 não apresentaram efeitos significativos sobre a atividade transcricional de B1 nos ensaios de validação (Fig. 12a, b).

Nenhum dos FTs selecionados para validação ativaram a atividade transcricional da variante B3. Em contrapartida, ELF5 inibiu de modo significativo a atividade transcricional de B3, enquanto E2F1, SNAI2 e SOX7 apresentaram tendências inibitórias nesta variante (Fig. 12b, c), enquanto TFCP2, KLF5, HOXA13, LHX2 e SP1 não apresentaram efeitos significativos (Fig. 12a, c).

a)

b)

c)

Figura 12. Ensaio de validação para confirmação dos efeitos observados no ensaio de arranjos. Em placas de 96 poços, células C33 foram co-transfectadas com o plasmídeo repórter, quantidades crescentes do plasmídeo de expressão de FTs, com o objetivo de verificar a dose dependência do efeito, e com o vetor controle β -gal. Após 48h, foram medidas a luminescência e a atividade da enzima β -galactosidase. Foram realizados 20 experimentos independentes, as medidas de luminescência foram comparadas com o valor de referência (1) do plasmídeo de expressão transfectado sem sequência de FT algum e o valor de cada um dos experimentos está representado como círculo, quadrado ou triângulo nos gráficos; outliers foram retirados para melhor ajuste aos cálculos estatísticos. (a) Os efeitos de HOXA13, SP1 e KLF5 sobre a atividade transcricional de B1 e B3. Enquanto HOXA13 ativou significativamente a variante da sublinhagem B1 e SP1 parece ter uma tendência em ativa-lá, KLF5 não teve efeito sobre sua atividade transcricional. Estes três FTs não tiveram efeito sobre a atividade transcricional de B3. (b) E2F1, SNAI2 e ELF5 inibiram significativamente a atividade transcricional de B1, enquanto somente ELF5 inibiu significativamente a atividade transcricional de B3; E2F1 e SNAI3 apenas apresentaram ter uma tendência de inibir. (c) Os efeitos de SOX7, LHX2 e TFCEP2 sobre a atividade transcricional de B1 e B3. Somente SOX7 e LHX2 apresentaram tendências inibitórias em B1 e B3, respectivamente.

5.5. Análise dos efeitos sinérgicos dos FTs selecionados para validação

Uma vez que alguns dos fatores analisados possuíam sítios de ligação putativos sobrepostos, é possível que haja competição entre os FTs para ligação a um determinado sítio no DNA, ocasionando alterações nos efeitos observados *in vitro* no que concerne à atividade transcricional. Para determinar os efeitos sinérgicos de dois FTs competindo por um sítio, células C33 foram co-transfectadas com um dos plasmídeos repórteres (pGL3-LCR-HPV-6-B1-Luc ou pGL3-LCR-HPV-6-B3-Luc), o vetor controle β -gal

e quantidades crescentes de dois plasmídeos de expressão que possuíam sítios de ligação putativos sobrepostos, como mostrado na figura 11a. Foram avaliadas, neste estudo, algumas destas combinações.

Na figura 11a é possível observar que há um sítio putativo a HOXA13 que se sobrepõe a SNAI2 e outro a LHX2. De fato, quando foram co-transfectados HOXA13 com SNAI2 ou LHX2, HOXA13 perdeu o efeito transativador sobre a LCR da variante B1. Ainda mais, na presença de HOXA13A SNAI2 perdeu seu efeito transrepressor sobre a LCR da variante B1 (Fig. 13a). Quando SNAI2 foi co-transfectado com TFCP2, é perdido o efeito repressor de SNAI2 sobre a LCR da variante B1 (Fig. 13b). Interessantemente, quando SNAI2 foi co-expresso junto com E2F1 e o plasmídeo repórter contendo a sequência da LCR da variante B1, não é observado um efeito somatório na repressão da transcrição, embora esta ainda esteja significativamente reduzida.

a)

b)

Figura 13. Análise dos efeitos sinérgicos dos FTs com sítios de ligação putativos sobrepostos. Células C33 foram co-transfectadas com um dos plasmídeos repórteres (pGL3-LCR-HPV-6-B1-Luc ou pGL3-LCR-HPV-6-B3-Luc), o vetor controle β -gal e quantidades crescentes de dois plasmídeos de expressão que possuísem sítios de ligação putativos sobrepostos. (a) HOXA13 transfectado com quantidades iguais de SNAI2 ou LHX2 perde o efeito transativador sobre a LCR da variante B1. Quando HOXA13 é co-transfectado com SNAI2 em ambas as variantes, é possível notar ainda que SNAI2 perde o efeito repressor. (b) SNAI2 transfectado com quantidades iguais de TF2P2 ou E2F1 também perde o efeito inibidor significativo visto anteriormente.

5.6. Análise da ligação de HOXA13 e SOX7 na LCR de HPV-6

Uma vez que observou-se que HOXA13 possui efeito ativador significativo sobre a atividade transcricional da variante da sublinhagem B1 e que nas análises *in silico* este fator possuía um sítio de ligação preditivo a mais nesta variante em relação à variante B3, objetivou-se avaliar por ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) a ligação de HOXA13 na LCR de HPV-6 de ambas as

variantes. Além de HOXA13, SOX7 também foi selecionado para estes ensaios de ChIP, por ser o único fator que possui uma tendência inibitória sobre a LCR da variante B3 que entretanto não tem efeito sobre a atividade transcricional de B1.

Para isso, células C33 permanentemente transfectadas com a LCR das variantes de B1 e B3 foram incubadas com formaldeído 1% para *cross-linking* dos FTs à LCR viral. A cromatina foi então fragmentada e incubada com anticorpos anti-SOX7 ou anti-HOXA13. Os fragmentos ligados aos anticorpos foram então recuperados e submetidos a análises por RT-qPCR (Fig. 14a).

É possível observar maior ligação de HOXA13 e SOX7 no segmento 1 da LCR de B3 em comparação ao segmento 1 da LCR de B1; ainda se pode perceber que HOXA13 ligou mais neste segmento em B3 quando comparado com SOX7. Em contrapartida, HOXA13 e SOX7 ligam-se mais no segmento 2 da variante B1 em comparação ao mesmo segmento da variante B3, sendo, a ligação de HOXA13 neste segmento de B1 maior do que a ligação de SOX7 na mesma variante e maior do que a ligação do próprio HOXA13 no segmento da variante B3 (Fig. 14b). Ainda assim, cabe ressaltar que este experimento foi realizado apenas uma vez.

Figura 14. Ligação *in vivo* de HOXA13 e SOX7 à LCR de HPV-6 utilizando ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP). HOXA13 e SOX7 foram selecionados para realização dos ensaios de ChIP. (a) Desenho esquemático do ensaio de ChIP. Células C33 permanentemente transfectadas com a LCR das variantes de B1 e B3 foram incubadas com formaldeído 1% e em seguida com solução de glicina 1,25 M. A cromatina foi então fragmentada e incubada com anticorpos anti-SOX7 ou anti-HOXA13. Os fragmentos ligados aos anticorpos foram então recuperados e analisados por RT-qPCR (adaptado de DAHL, 2014). (b) Histograma representando análise das amostras imunoprecipitadas por RT-qPCR. Quanto maior as barras do histograma, maior a amplificação dos fragmentos imunoprecipitados e purificados, indicando, assim, a maior ligação do FT em um determinado fragmento. Pode-se observar maior ligação de HOXA13 e SOX7 no segmento 1 da LCR da variante B3 do que no segmento 1 da LCR da variante B1; ainda pode se perceber que HOXA13 ligou mais nesta fração em B3 quando comparado com SOX7. Na fração 2 observa-se uma maior ligação de HOXA13 e SOX7 na variante B1 em comparação com a variante B3, sendo a ligação de HOXA13 nesta fração de B1 muito maior do que a ligação de SOX7. Em azul: resultados do ensaio de ChIP utilizando a linhagem de C33 transfectada permanentemente com a LCR de B1; em roxo: resultados do ensaio de ChIP utilizando a linhagem de C33 transfectada permanentemente com a LCR de B3. (c) Desenho esquemático representando a posição do sítio de ligação putativo revelado na análise *in silico*. As setas coloridas representam os iniciadores e direção de amplificação; as setas amarelas representam o segmento 1 da LCR, enquanto setas rosas representam o segmento 2. Os retângulos verticais indicam a ligação de HOXA13 revelada pelo ensaio de ChIP ao seu sítio putativo; retângulo azul representa a ligação de HOXA13 na variante B1 e retângulo roxo representa a ligação de HOXA13 na variante B3. O retângulo azul, representado em tamanho maior, indica maior a intensidade de ligação de HOXA13 à LCR, de acordo com o observado nos ensaios de ChIP.

6. Discussão

Embora os HPVs de baixo risco oncogênico (LR, de *low risk*) sejam considerados como não carcinógenos para humanos, infecções por LR-HPV tem importantes implicações clínicas, uma vez que estão associadas à patologias de baixo grau em diferentes regiões anatômicas (CLIFFORD et al., 2006; HOOTS et al., 2009; SRODON et al., 2006), e também à ocasionais casos de neoplasias malignas.

O HPV-6, juntamente com HPV-11, é responsável pela ocorrência da rara, mas séria, papilomatose respiratória recorrente (PRR) (DONNE et al., 2010; MAKIYAMA et al., 2013), além de 90% dos casos de verrugas genitais (VG) em ambos homens e mulheres (GARLAND et al., 2009; HAWKINS et al., 2013).

VGs são altamente infecciosas e cerca de 65% das pessoas com parceiros infectados desenvolvem VGs dentro de 3 semanas a 8 meses (LACEY; LOWNDES; SHAH, 2006). Estudos em populações inglesas, australianas e estadunidenses revelaram que estas populações apresentavam uma prevalência de VGs de em torno de 4 – 5,6%, sendo esta porcentagem ainda maior, quase 11%, em populações nórdicas (GIULIANO et al., 2008). Quando analisada globalmente, a taxa de incidência de VGs varia entre 85 – 205 casos a cada 100.000 pessoas (de ambos os sexos), sendo esta taxa maior em jovens com 30 anos (PATEL et al., 2013).

Extensas revisões sistemáticas indicam que as VGs representam uma patologia altamente prevalente associada a um problema cosmético significativo, bem como a um fardo psicológico com custos de saúde substanciais e dependentes do número e localização das lesões (EGAWA; DOORBAR, 2017; PATEL et al., 2013; RAYMAKERS et al., 2012). Estima-se que na Inglaterra o custo para o tratamento das VGs ao sistema de saúde público seja de em torno de 16,8 milhões de libras/ ano (DESAI et al., 2011), enquanto que o custo anual do tratamento de VGs para os planos de saúde privados nos EUA atingem entre US\$140 milhões e US\$220 milhões (GIULIANO et al., 2008). A principal limitação para as terapias atuais reside na alta taxa de recorrência das VGs após a primeira remissão (PATEL et al., 2013).

Embora o HPV-6 esteja associado à comorbidades de baixo risco oncogênico, há relatos da associação deste HPV com o desenvolvimento do tumor de Buschke-Löwenstein (BOSHART;

ZUR HAUSEN, 1986; GIULIANO et al., 2008). Ainda, foi identificada a presença deste HPV-6 em diferentes tipos tumorais, de diferentes sítios anatômicos (OKAGAKI et al., 1984; KASHER; ROMAN, 1988; RANDO et al., 1986; KITASATO et al., 1994; OFT et al., 1993b; BERCOVICH et al., 1991). Recentemente, foi relatada a presença de HPV-6 no carcinoma de células escamosas condilomatoso (MASUDA et al., 2018).

Ademais, é sabido que diferentes variantes moleculares de HPV-6 estão associadas ao risco diferencial de desenvolvimento de VGs. Além da identificação da maior prevalência de variantes da sublinhagem B1 em biópsias de VGs e nos esfregaços genitais oriundos destes homens, observou-se um risco aumentado no desenvolvimento de VGs em homens infectados com variantes desta sublinhagem em comparação aos homens infectados com variantes da sublinhagem B3 (FLORES-DÍAZ et al., 2017a). Uma possível explicação para este risco aumentado é a maior atividade transcricional de B1, quando comparada com a atividade transcricional de B3 (MEASSO DO BONFIM et al., (2015), o que poderia resultar na expressão aumentada de E1 e E2 viral, conferindo assim um potencial de replicação maior às variantes da sublinhagem B1 (FLORES-DÍAZ et al., 2017a).

Embora na última década, a tecnologia de arranjos permitiu identificar mais FTs que se ligam à sequência promotora viral (CARSON; KHAN, 2006; SICHERO; SOBRINHO; VILLA, 2012) são poucos os estudos que visaram a caracterização da atividade transcricional de LR-HPVs.

Para melhor compreender os mecanismos de regulação da transcrição das variantes moleculares de HPV-6 e como as diferenças poderiam impactar as práticas clínicas, o presente estudo teve como objetivo identificar FTs celulares que atuam diretamente e de maneira distinta sobre a LCR das variantes das sublinhagens B1 e B3.

Uma vez que sítios de ligação à FTs são pequenos, em torno de 6 a 12 bases nucleotídicas, alterações nucleotídicas podem resultar no desaparecimento ou criação de sítios de ligação (LAMBERT et al., 2018). Assim, primeiramente foram avaliadas as diferenças nucleotídicas entre a LCR das duas variantes de HPV-6, B1 e B3. Foi realizado então o sequenciamento dos plasmídeos repórteres previamente construídos pelo grupo (MEASSO DO BONFIM et al., 2015) contendo a sequência da LCR de uma das duas variantes, utilizando os iniciadores F' e R' a fim de confirmar que os plasmídeos adequados seriam utilizados. Os resultados dos sequenciamentos foram alinhados utilizando a plataforma BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), de modo a permitir a visualização das divergências nucleotídicas entre as sequências da LCR das duas variantes (Fig. 9). É possível observar uma inserção de 20 nucleotídeos (TACATTATTGTATATCT TGT) a partir da posição 7414 no genoma da variante B1, além da inserção de um nucleotídeo (T) na posição 7527. Adicionalmente, existem cinco substituições de nucleotídeos entre as variante B1 e B3: 7248 (T → G), na posição 7530 (C → A), na posição 7660 (G → C), na posição 7773 (A → C) e na posição 7817 (C → A).

Em seguida, objetivou-se identificar quais FTs atuam sobre a LCR de HPV-6, além de avaliar diferenças entre o repertório de FTs que atuam sobre a atividade transcricional das duas variantes virais. Para isto foi realizado um ensaio de arranjo com 535 plasmídeos de expressão contendo a sequência nucleotídica de diferentes FTs. Estes plasmídeos foram transfectados em células de carcinoma cervical HPV negativo e P53 mutado (linhagem celular C33), juntamente com um dos dois plasmídeos repórteres pGL3-LCR-HPV-6-B1-Luc ou pGL3-LCR-HPV-6-B3-Luc, previamente construídos. Estes plasmídeos contêm a sequência completa da LCR de uma das duas variantes à montante do gene da luciferase, de modo que, após 48h, a atividade da enzima luciferase foi medida e a atividade transcricional das diferentes variantes foi aferida indiretamente.

Dos 535 plasmídeos utilizados, 77 ativaram pelo menos duas vezes mais ou inibiram pelo menos pela metade a atividade transcricional de uma das duas variantes, em ao menos dois dos três experimentos independentes realizados (Fig. 10a e Tabela 3). Enquanto a maioria dos FTs identificados que atuam sobre apenas sobre uma das variantes ativa a LCR da variante pertencente à sublinhagem B1, a LCR da variante pertencente à sublinhagem B3 é reprimida, como indicado pela maior predominância da coloração verde nos experimentos utilizando a variante B1 e pela maior predominância das colorações vermelha e preta nos experimentos utilizando a variante B3 (Fig. 10a).

Dentre os 77 FTs observados, apenas seis FTs ativaram a atividade transcricional de ambas variantes (ZNF305, THAP7, TGFB1, FUSIP1, ZBTB7A e CEBPZ), 30 FTs ativam somente a variante B1 (NR2E1, TFAP4, BHLHB2, ZBTB26, ZNF16, SMARCA5, KLF3, KLF5, HOXA13, PCAF, ZNF655, ZNF295, UBP1, ZBTB9, PPP3CB, ING2, MCM7, ELF2, SP1, TERF2IP, CD3EAP, NFIB, PNN, HOXD9, CNOT7, GTF3C3, HIP2, TFCEP2, NFYA e TAF7) e dois FTs ativaram somente B3 (MAFB e PITX2). Quanto aos FTs que inibiram a atividade transcricional das variantes, seis FTs inibiram apenas B1 (ZNF417, SIRT2, FOXG1B, ERCC5, LHX2 e

ZNF435) e 31 FTs inibiram apenas B3 (SOX7, TAF9B, ELF5, E2F1, SPIC, INTS12, ZNF193, TFDP2, SFRS2, ZNF238, UBXD2, RBPSUH, NFKBIB, HOXD3, CREB3L4, LOC153222, PIAS4, NRIP1, TRAK1, SREBF2, SNAI2, ZNF92, TAF9, TAF1C, TEAD4, SUHW1, ZNF688, ZNF187, ETV4, HOXC4, PRDM14 e RFC1). Apenas CREB1 e TAF9 apresentaram atividades opostas nas variantes, ativando a atividade transcricional de B3 e inibindo a de B1 e ativando a atividade transcricional de B1 e inibindo B3, respectivamente (Fig. 10b).

O próximo passo foi identificar quais destes FTs poderiam possuir atividade direta sobre a LCR das variantes, ou seja, quais destes se ligavam diretamente ao DNA viral. Embora análises in silico utilizando a plataforma “*STRING: functional protein association networks*” (<https://string-db.org/>) demonstrarem a capacidade de ligação ao DNA humano da grande maioria dos 77 FTs encontrados no ensaio de arranjo (Fig. 16), somente nove apresentaram sítios de ligação putativos na LCR das duas variantes quando analisados utilizando o banco de dados JASPAR, e foram selecionados para seguir com os ensaios de validação dos efeitos vistos nos ensaios de arranjo (Fig. 11). Ainda assim, cabe ressaltar que a atividade de um FT sobre a LCR pode ser de maneira indireta, devido à interação com outras proteínas que se ligam diretamente à LCR viral (Fig. 16).

Figura 15. Análise das interações proteína-proteína entre os 77 FTs encontrados nos ensaios de arranjo. A análise das interações proteína-proteína por meio da plataforma STRING revelou as funções já descritas em humanos para cada FT (ligação ao DNA, em vermelho; FT com ligação ao DNA, em azul; regulação da transcrição, em verde), assim como a natureza da relação entre eles. Interações conhecidas provenientes de bancos de dados com curadorias (em azul) e aquelas determinadas experimentalmente (ligações em rosa). Interações preditivas compõe: genes vizinhos (ligações em verde), fusões gênicas (ligações em vermelho) e genes co-ocorrentes (ligações em azul). Ligações em amarelo são representativas de análises textuais, em preto representativas de co-expressão e em cinza claro representativas de homologia entre proteínas.

Os sítios de ligação putativos destes nove FTs foram identificados por análise in silício utilizando a plataforma JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>). JASPAR é uma coleção de sítios de ligação preferencias de FTs que se ligam ao DNA, representados como matrizes de peso ou de posição (PWMs ou PSSMs), usadas para varrer sequências genômicas (FORNES et al., 2020).

Embora os sítios de ligação do fator de transcrição SOX7 não estejam apresentados na figura 11, este FT foi selecionado para seguir adiante nos ensaios de validação. O motivo desta escolha foi a identificação de sítios de ligação putativos de SOX7 na primeira análise feita na plataforma (Fig 17). As atualizações das matrizes de preferência da plataforma resultaram em modificações nos sítios de ligação previamente indicados e, resumidamente, as matrizes associadas ao fator SOX7 foram reclassificadas como parte da coleção não-validada da plataforma, uma coleção de perfis e matrizes novas na plataforma a partir de 2020, explicando assim as modificações vistas nos sítios de ligação putativos de SOX7 (FORNES et al., 2020).

HOXA13, como confirmado pelos ensaios de validação, possui efeito transativador somente sobre a atividade transcricional de B1 (Fig. 12a), que é perdido quando este fator de transcrição é co-expresso com SNAI2 e LHX2, para os quais foram preditos sítios de ligação sobrepostos (Fig. 13a). Assim como HOXA13, SNAI2 também perdeu seu efeito repressor quando co-expresso com E2F1, TFDP2 e HOXA13 (Fig 13b). Uma possível explicação para esta perda do efeito de HOXA13 e SNAI2 é a sobreposição do sítio de ligação de HOXA13 com os sítios de ligação de SNAI2 e LHX2, e sobreposição do sítio de ligação de SNAI2 com os sítios de ligação de E2F1, TFDP2 e HOXA13 (Fig. 11), o que poderia resultar na competição destes FTs pela região de ligação, ocasionando a menor ligação de HOXA13 e SNAI2. Por outro lado, SOX7 apresentou uma tendência inibitória somente na variante B3, não tendo nenhum efeito na atividade transcricional de B1 (Fig. 12c), diferentemente de E2F1, ELF5 e SNAI2 que apresentaram efeitos inibitórios em ambas as variantes (Fig. 12b).

SOX7

Variante	Posição no genoma	Sequência	Posição no genoma
B1	7191	tatatgtgtatatgtactgttatatatatgtgtgtatgtactgttatgtatatgtgttta	7250
B3	7293	TATATGTGTATATGTACTGTTATATATATGTGTGTATGTACTGTTATGTATATGTGTGA	7352
B1	7251	tgtactgttatatgtatgtgtgtgtatatatgtgtgtatatatgtgtatgtgtgtatat	7310
B3	7353	TGTACTGTTATATGTATGTGTGTGTATATATGTGTGTATATATGTGTATGTGTGTATAT	7412
B1	7311	gtatatgtatgtgtgtgtatatatatatgtgtgtgtgtgttatgtgtgtaatgtaatttat	7370
B3	7413	GTATATGTATGTGTGTGTATATATATGTGTGTGTGTATGTGTGTAATGTAATTAT	7472
B1	7371	tgtgtaatgtgtatgtgtgtttatgtgCAATAAACAATTAACTACATTATGTATATCT	7430
B3	7473	TGTGTAATGTGTATGTGTGTTTATGTGCAATAAACAATTAAAC-----	7515
B1	7431	TGTTACACCCGTGACTCAGTGGCTGTTGCACGCGTTTTGGTTGCACGCGCCTTAcaca	7490
B3	7516	---TACACCCGTGACTCAGTGGCTGTTGCACGCGTTTTGGTTGCACGCGCCTTACACA	7572
B1	7491	cataagtaatatatacatgcacaatatatatacttttggtttccaataatatatttttatatt	7550
B3	7573	CATAAGTAATATACATGCACAATATATATTTTTTG-TTACAATAATATATTTTATATT	7631
B1	7551	tGCAACCGTTTTCGGTTGCCCTTGGCATACTTTCCACCAATTGTTACACGTGTTGC	7610
B3	7632	TGCAACCGTTTTCGGTTGCCCTTGGCATACTTTCCACCAATTGTTACACGTGTTGC	7691
B1	7611	CTGTTAATCCTATATATTTTGTGCCAGGTACACATTGCCCTGCCAAGTTGATTGCCAAGT	7670
B3	7682	CTGTTAATCCTATATATTTTGTGCCAGGTACACATTGCCCTGCCAAGTTCATTGCCAAGT	7751
B1	7671	GCATCATATCCTGCCAACACACACCTGGCGCCAGGGTGCGGTATTGCCTTACTCATATG	7730
B3	7752	GCATCATATCCTGCCAACACACACCTGGCGCCAGGGTGCGGTATTGCCTTACTCATATG	7811
B1	7731	TTTATTGCCACTGCAATAAACCTGTCTTTGTGTATACTTTTATGCACTGTAGCCAACTC	7790
B3	7812	TTTATTGCCACTGCAATAAACCTGTCTTTGTGTATACTTTTCTGCACTGTAGCCAACTC	7871
B1	7791	TTAAAAGCATTTTGGCTTGTAGCAGCACATTTTTTGGCTTACTGTTTGGTATACAAT	7850
B3	7872	TTAAAAGCATTTTGGCTTGTAGCAGAACATTTTTTGGCTTACTGTTTGGTATACAAT	7931
B1	7851	AACATAAAAAATGAGTAACCTAAGGTCACACACCTGCAACCGTTTTCGGTTATCCACACCC	7910
B3	7932	AACATAAAAAATGAGTAACCTAAGGTCACACACCTGCAACCGTTTTCGGTTATCCACACCC	7991
B1	7911	TACATATTTCTTCTTATAGTTAATAACAATCTTGGTTTTAAAAAATAGGAGGGACCGAA	7970
B3	7992	TACATATTTCTTCTTATAGTTAATAACAATCTTGGTTTTAAAAAATAGGAGGGACCGAA	41
B1	7971	AACGGTTCAACCGAAAAACGGTTGTATATAAACAGCCCTAAAATTTAGCAAAACGAGGCAT	8031
B3	42	AACGGTTCAACCGAAAAACGGTTGTATATAAACAGCCCTAAAATTTAGCAAAACGAGGCAT	102

Figura 16. Sequências completas da LCR de B1 e B3 com os sítios de ligação putativos de SOX7 observados in silico, antes das atualizações das matrizes de preferências da plataforma JASPAR em 2020. A análise in silico utilizando o score relativo de 0.85 realizada previamente para o FT SOX7 revelou a existência de 7 sítios de ligação putativos de SOX7 em B1 e 5 sítios de ligação putativos em B3, sendo este FT então selecionado para seguir adiante com os ensaios de validação e ChIP.

Devido à ativação significativa de HOXA13 exclusivamente sobre a atividade transcricional de B1 e o efeito de SOX7 somente na variante B3, ambos se tornaram fortes candidatos para explicar, em partes, a diferença transcricional observada entre as variantes.

Com o objetivo de validar os sítios de ligação de HOXA13 preditos e de identificar novos sítios de ligação de SOX7 na LCR das variantes, foi realizado um ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP).

Devido à problemas nas reações de RT-qPCR que compreendiam os iniciadores responsáveis pela amplificação dos fragmentos 3, 4 e 5 da LCR, somente foram possíveis de avaliação as ligações que ocorrem nos fragmentos 1 e 2. Ainda assim, nesses resultados parciais é possível observar diferenças de ligação de HOXA13 e SOX7 na LCR das duas variantes. Enquanto HOXA13 e SOX7 se ligam com maior afinidade ao fragmento 1 da LCR de B3, estes fatores se ligam com maior afinidade ao fragmento 2 da LCR de B1. Nota-se ainda que HOXA13 se liga com mais intensidade ao fragmento 2 da LCR de B1 do que qualquer outra ligação analisada (Fig 14b). Deste modo é plausível sugerir que HOXA13 se ligue ligando aos sítios preditos na análise *in silico* (Fig. 11 e Tabela 4) e que a maior atividade transcricional de B1 esteja relacionada com a maior ligação de HOXA13 a estes sítios. Entretanto, é importante notar que apenas um experimento foi feito e novas replicatas precisam ser realizadas para confirmação destas ligações.

Dados gerados até o momento sugerem que SOX7 tenha função de supressor tumoral em múltiplos tipos de câncer. A diminuição da expressão de SOX7 foi demonstrada em diferentes tumores em estágio avançado e está correlacionada com o baixo prognóstico de pacientes com câncer (CHAN et al., 2012; GUO et al., 2008; HAYANO et al., 2013; LI et al., 2012; STOVALL et al., 2013). Já a expressão ectópica de SOX7 induz a apoptose em diversas linhagens celulares tumorais, enquanto seu silenciamento resulta no aumento da capacidade de células não tumorigênicas em formar colônias *in vitro* (GUO et al., 2008; ZHANG et al., 2009). Ainda que não existam relatos no que concerne ao efeito de SOX7 sobre a atividade transcricional do HPV, Garcia-Vallvé et al. (2006) por meio de análises *in silico* identificou sítios putativos de ligação de outros membros da família de transcrição SOX (SOX-5 e SOX-9) na LCR de cinco tipos de HPV (HPV-16, -18, -6, -8 e -4). Interessantemente Sichero et al. (2012) demonstrou que SOX7 não apresentou efeito sobre a atividade transcricional de HPV-16 e HPV-18 (Tabela suplementar 2).

Alguns estudos já reportaram a expressão desregulada de HOXA13 em diversas linhagens celulares derivadas de tumores e em amostras de tecidos tumorais, além da maior expressão associada ao processo de transformação da célula, incluindo a aumentada proliferação celular (CHANG et al., 2016; ZHANG et al., 2017). Embora estudos tenham abordado a associação de HOXA13 com a presença de HPV, a maioria destes foca na ação das proteínas virais na expressão dos genes HOX, na consequência da expressão aberrante deste gene e na sobrevida de pacientes com carcinoma cervical com alta expressão de HOXA13 (EOH et al., 2017; NESTERUK et al., 2020; SAHA et al., 2017), não havendo relatos descrevendo a regulação da transcrição viral por HOXA13. Extensos estudos abordando a identificação de FTs celulares que atuam sobre a LCR de outros tipos virais também não avaliaram a atuação de HOXA13 nestes (CONNOR; CHAN; BERNARD, 1995; GARCIA-CARRANCA; THIERRY; YANIV, 1988; GARCÍA-VALLVÉ et al., 2006; SICHERO; SOBRINHO; VILLA, 2012).

É interessante a observação da atuação ativadora de HOXA13 sobre a atividade transcricional de B1 e da atuação inibitória de SOX7 sobre a atividade transcricional de B3, uma vez que os resultados dos estudos supracitados sugerem que se tratam de potencial oncogene e supressor tumoral, respectivamente. Embora ainda seja um passo muito distante, é possível pensar em novos caminhos que busquem entender se as atividades oncogênicas e supressora tumoral destes FTs estejam de fato relacionadas com a atividade transcricional de HPV-6, o que poderia resultar em maior ou menor nível das proteínas virais E1 e E2, conferindo maior ou menor potencial replicativo às células infectadas por este tipo viral.

A dificuldade de implementação de estratégias terapêuticas envolvendo FTs tem se mostrado algo recorrente, devido à expressão constitutiva destes FTs em muitos órgãos, além da atuação complexa destes em inúmeros alvos diferentes. Entretanto, abordagens de afinidade inversa tem sido utilizadas para identificar compostos que se ligam a FTs alvo; resumidamente, nesta abordagem, a proteína alvo é ligada a uma resina de afinidade, exposta a extratos naturais complexos e os compostos que se ligam à proteína são então detectados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS). Um exemplo do uso desta abordagem para a identificação de alvos específicos a FTs é a ligação de cromomicina 5 (CA₅) no fator de transcrição TBX-2, contribuindo para sua atividade citotóxica (SAHM et al., 2020). Assim, além da identificação de FTs celulares que interagem diferencialmente com a LCR de diferentes

variantes do HPV-6 explicar, pelo menos em parte, as diferenças no risco de desenvolver VGs atribuídos a essas variantes, futuramente estes estudos podem servir para a identificação de um potencial alvo terapêutico.

7. Conclusão

Ainda que novos ensaios de imunoprecipitação de cromatina precisem ser realizados para confirmar os achados sobre as posições dos sítios de ligação de HOXA13 e SOX7, o presente trabalho identificou diferentes FTs que atuam de maneira distinta e similar sobre a LCR das variantes B1 e B3 de HPV-6. Entre aqueles que apresentaram atuação diferencial entre as variantes, destaca-se a atividade de HOXA13, que ativou significativamente a atividade transcricional da variante B1, e de SOX7, que apresentou tendência inibitória apenas na variante B3. Ainda, ensaios *in silico* revelaram um sítio de ligação putativo extra na LCR da variante B1, o que poderia resultar em maior ligação de HOXA13 à LCR desta variante, como inicialmente indicado pelos ensaios de imunoprecipitação de cromatina, e parcialmente explicar a maior atividade transcricional de B1. Ademais, ensaios de superexpressão estão sendo realizados para a identificação dos níveis dos FTs co-transfectados nos ensaios validação, assim como western blots para identificar os níveis de HOXA13 e SOX7 em linhagens celulares com diferentes graus de malignidade.

A identificação de HOXA13 como importante ativador da atividade transcricional de B1 poderá, não somente explicar, pelo menos em parte, as diferenças no risco de desenvolvimento de VGs em infecções com diferentes variantes, mas também servir como futuro alvo terapêutico em associação com outros componentes.

8. Referências

- ANTONSSON, A. et al. General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2509–14, 2003a.
- ANTONSSON, A. et al. Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 7, p. 1881–1886, 2003b.
- BENNETT, M. D. et al. The First Complete Papillomavirus Genome Characterized from a Marsupial Host: a Novel Isolate from *Bettongia penicillata*. **Journal of Virology**, v. 84, n. 10, p. 5448–5453, 2010.
- BENNETTS, L. E. et al. Associations of Anogenital Low-Risk Human Papillomavirus Infection With Cancer and Acquisition of HIV. v. 42, n. 10, p. 541–544, 2015.
- BERCOVICH, J. A. et al. Presence and integration of human papillomavirus type 6 in a tonsillar carcinoma. **Journal of General Virology**, v. 72, n. 10, p. 2569–2572, out. 1991.
- BERNARD, H.-U. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. **Antiviral therapy**, v. 7, n. 4, p. 219–37, dez. 2002.
- BERNARD, H.-U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 1–6, mar. 2005.
- BERNARD, H.-U. et al. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70–79, 2012.
- BERNARD, H. Controls in the papillomavirus cycle. **FEMS Microbiology Immunology**, v. 64, p. 201–205, 1990.
- BERNARD, H. Regulatory elements in the viral genome. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 197–204, 2013.
- BERNARD, H. U.; CHAN, S. Y.; DELIUS, H. Evolution of Papillomaviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 186, p. 33–54, 1994.
- BLOMBERG, M. et al. Genital warts and risk of cancer: A danish study of nearly 50000 patients

with genital warts. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 10, p. 1544–1553, 2012.

BOSHART, M.; ZUR HAUSEN, H. Human Papillomaviruses in Buschke-Lowenstein Tumors : Physical State of the DNA and Identification of a Tandem Duplication in the Noncoding Region of a Human Papillomavirus 6 Subtype. **Journal of virology**, v. 58, n. 3, p. 963–966, 1986.

BOUVARD, V. et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. **The Lancet. Oncology**, v. 10, n. 4, p. 321–2, 2009.

BRAVO, I. G.; DE SANJOSÉ, S.; GOTTSCHLING, M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 432–438, 2010.

BRAY, F. et al. Patterns and Trends in Human Papillomavirus-Related Diseases in Central and Eastern Europe and Central Asia. **Vaccine**, v. 31, n. S7, p. H32–H45, 2013.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BURK, R. D. et al. Classification and nomenclature system for Human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. **Acta Dermatovenereol Alp Panonica Adriat.**, v. 20, n. 3, p. 113–123, 2011.

BURK, R. D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K. Human papillomaviruses: Genetic basis of carcinogenicity. **Public Health Genomics**, v. 12, n. 5–6, p. 281–290, 2009.

BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants. **Virology**, v. 445(0), p. 232–243, 2013.

CARSON, A.; KHAN, S. A. Characterization of transcription factor binding to human papillomavirus type 16 DNA during cellular differentiation. **Journal of virology**, v. 80, n. 9, p. 4356–4362, 2006.

CHAN, D. W. et al. Down-regulation of Sox7 is associated with aberrant activation of Wnt / β -catenin signaling in endometrial cancer. **Oncotarget**, v. 3, n. 12, p. 1546–1556, 2012.

CHANG, S. et al. HOTTIP and HOXA13 are oncogenes associated with gastric cancer

progression. **Oncology Reports**, v. 35, p. 3577–3585, 2016.

CHEN, Z. et al. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. **Journal of virology**, v. 79, n. 11, p. 7014–23, 2005.

CHEN, Z. et al. Evolutionary Dynamics of Variant Genomes of Human Papillomavirus Types 18, 45, and 97. **Journal of Virology**, v. 83, n. 3, p. 1443–1455, 2009.

CHO, N. H. et al. Detection of human papillomavirus in warty carcinoma of the uterine cervix: Comparison of immunohistochemistry, in situ hybridization and in situ polymerase chain reaction methods. **Pathology Research and Practice**, v. 194, n. 10, p. 713–720, 1998.

CHOKUNONGA, E. et al. Trends in the incidence of cancer in the black population of Harare, Zimbabwe 1991-2010. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 3, p. 721–729, 2013.

CHOW, L. T. et al. Human papillomavirus types 6 and 11 mRNAs from genital condylomata acuminata. **Journal of virology**, v. 61, n. 8, p. 2581–8, ago. 1987.

CLIFFORD, G. et al. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 3, p. 26–34, 2006.

CONNOR, M. O.; CHAN, S.; BERNARD, H. Transcription Factor Binding Sites in the Long Control Region of Genital HPVs. In: **Myers G, Bernard HU, Delius H, Baker C, Icenogle J, Halpern A, Wheeler C, editors. Human Papillomaviruses 1995 Compendium, part III-A. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory**, p. 21–40, 1995.

DAHL, J. A. Chop it , ChIP it , check it : The current status of chromatin immunoprecipitation. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 929–43, 2014.

DANIELEWSKI, J. A. et al. Human Papillomavirus Type 6 and 11 Genetic Variants Found in 71 Oral and Anogenital Epithelial Samples from Australia. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. 1–9, 2013.

DE KONING, M. N. C. et al. Betapapillomaviruses frequently persist in the skin of healthy individuals. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 5, p. 1489–1495, 2007.

DE MATOS, R. P. A. et al. Nucleotide and phylogenetic analysis of human papillomavirus types 6 and 11 isolated from recurrent respiratory papillomatosis in Brazil. **Infection, Genetics and**

Evolution, v. 16, p. 282–289, 2013.

DEMERET, C.; YANIV, M.; THIERRY, F. The E2 transcriptional repressor can compensate for Sp1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. **Journal of virology**, v. 68, n. 11, p. 7075–82, 1994.

DESAI, S. et al. Genital warts and cost of care in England. **Sexually Transmitted Infections**, v. 87, n. 6, p. 464–468, 2011.

DILORENZO, T. P.; STEINBERG, B. M. Differential regulation of human papillomavirus type 6 and 11 early promoters in cultured cells derived from laryngeal papillomas. **Journal of virology**, v. 69, n. 11, p. 6865–72, nov. 1995.

DOLLARD, S. C. et al. Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures. **Genes & development**, v. 6, n. 7, p. 1131–42, jul. 1992.

DONNE, A. J. et al. The role of HPV type in Recurrent Respiratory Papillomatosis. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 74, p. 7–14, 2010.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. v. 541, p. 525–541, 2006.

DOORBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. p. 2–23, 2015.

DOORBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in medical virology**, v. 25, n. 1, p. 2–23, 2016.

EGAWA, N.; DOORBAR, J. The low-risk papillomaviruses. **Virus Research**, v. 231, p. 119–127, 2017.

EOH, K. J. et al. Upregulation of homeobox gene is correlated with poor survival outcomes in cervical cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 48, p. 84396–84402, 2017.

FLORES-DÍAZ, E. et al. HPV-6 Molecular Variants Association With the Development of Genital Warts in Men : The HIM Study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, p. 559–565, 2017a.

FLORES-DÍAZ, E. et al. HPV-11 variability, persistence and progression to genital warts in men:

The HIM study. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 9, p. 2339–2342, 2017b.

FORMANA, D. et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. **Vaccine**, v. 30, n. SUPPL.5, p. F12–F23, 2012.

FORNES, O. et al. JASPAR 2020 : update of the open-access database of transcription factor binding profiles ~ c. **Nucleic Acid Research**, v. 48, p. 87–92, 2020.

GARCIA-CARRANCA, A.; THIERRY, F.; YANIV, M. Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. **Journal of virology**, v. 62, n. 11, p. 4321–4330, 1988.

GARCÍA-VALLVÉ, S. et al. Different papillomaviruses have different repertoires of transcription factor binding sites : convergence and divergence in the upstream regulatory region. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, p. 1–14, 2006.

GARLAND, S. M. et al. Natural History of Genital Warts: Analysis of the Placebo Arm of 2 Randomized Phase III Trials of a Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6, 11, 16, and 18) Vaccine. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 6, p. 805–814, 2009.

GEREIN, V. et al. Incidence, age at onset, and potential reasons of malignant transformation in recurrent respiratory papillomatosis patients: 20 Years experience. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 132, n. 3, p. 392–394, 2005.

GIULIANO, A. R. et al. Epidemiology of Human Papillomavirus Infection in Men , Cancers other than Cervical and Benign Conditions. 2008.

GLOSS, B. et al. The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. **The EMBO Journal**, v. 6, n. 12, p. 3735–3743, 1987.

GOLDBERG, I. et al. Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16. **Molecular Cell**, v. 5, n. 3, p. 557–567, 2004.

GOTTSCHLING, M. et al. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 5, p. 1242–1258, 2007.

GUO, L. et al. Sox7 is an independent checkpoint for β -catenin function in prostate and colon epithelial cells. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 9, p. 1421–1430, 2008.

GUSSEKLOO, J. et al. High prevalence of cutaneous warts in elementary school children and the ubiquitous presence of wart-associated human papillomavirus on clinically normal skin. **British Journal of Dermatology**, v. 172, n. 1, p. 196–201, 2014.

HARWOOD, C. A.; PROBY, C. M. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 101–114, 2002.

HAWKINS, M. G. et al. Detection of specific HPV subtypes responsible for the pathogenesis of condylomata acuminata. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 1, 2013.

HAYANO, T. et al. SOX7 is down-regulated in lung cancer. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 32, n. 17, p. 1–11, 2013.

HERBST, L. H. et al. Genomic characterization of two novel reptilian papillomaviruses, Chelonia mydas papillomavirus 1 and Caretta caretta papillomavirus 1. **Virology**, v. 383, n. 1, p. 131–135, 2009.

HOOTS, B. E. et al. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 10, p. 2375–2383, 2009.

IFTNER, T. et al. Transcription of the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 in anogenital condylomata is restricted to undifferentiated cell layers of the epithelium. **Journal of virology**, v. 66, n. 8, p. 4639–46, ago. 1992.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC Handbooks of Cancer Prevention: Volume 10 - Cervix Cancer Screening. **Lyon: IARC Press**, 2005.

JELLEN, M. M. et al. Global Genomic Diversity of Human Papillomavirus 6 Based on 724 Isolates and 190 Complete Genome Sequences. v. 88, n. 13, p. 7307–7316, 2014.

KARLEN, S.; OFFORD, E. A.; BEARD, P. Functional promoters in the genome of human papillomavirus type 6b. **The Journal of general virology**, v. 77 (Pt 1), n. 1, p. 11–6, 1 jan. 1996.

KASHER, M. S.; ROMAN, A. Characterization of human papillomavirus type 6b DNA isolated

from an invasive squamous carcinoma of the vulva. **Virology**, v. 165, n. 1, p. 225–33, jul. 1988.

KITASATO, H. et al. Sequence Rearrangements in the Upstream Regulatory Region of Human Papillomavirus Type 6: are these Involved in Malignant Transition? **Journal of General Virology**, v. 75, n. 5, p. 1157–1162, maio 1994.

KOCJAN, B. J. et al. Prevaccination genomic diversity of human papillomavirus genotype 6 (HPV 6). **Virology**, v. 391, n. 2, p. 274–283, 2009.

LACEY, C. J. N.; LOWNDES, C. M.; SHAH, K. V. Chapter 4 : Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions : HPV-6 / 11 disease. **Vaccine**, v. 24, n. Suppl 3, p. 35–41, 2006.

LAMBERT, S. A. et al. The Human Transcription Factors. **Cell**, v. 172, n. 4, p. 650–665, 2018.

LI, B. et al. Decreased Expression of SOX7 is Correlated with Poor Prognosis in Lung Adenocarcinoma Patients. **Pathology and Oncology Research**, v. 18, p. 1039–1045, 2012.

MACGREGOR, G. R.; CASKEY, C. T. Construction of plasmids that express E.coli beta-galactosidase in mammalian cells. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 6, p. 3142–3142, 1989.

MAKIYAMA, K. et al. Assessment of human papilloma virus infection in adult laryngeal papilloma using a screening test. **Journal of Voice**, v. 27, n. 2, p. 230–235, 2013.

MASUDA, M. et al. Case of rapidly progressing condylomatous squamous cell carcinoma of the uterine cervix associated with low-risk human papillomavirus type 6. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 44, n. 3, p. 583–587, 2018.

MEASSO DO BONFIM, C. et al. Differences in Transcriptional Activity of Human Papillomavirus Type 6 Molecular Variants in Recurrent Respiratory Papillomatosis. **PloS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–12, 2015.

NASSERI, M. et al. A human papilloma virus type 11 transcript encoding an E1--E4 protein. **Virology**, v. 159, n. 2, p. 433–9, ago. 1987.

NESTERUK, K. et al. Forced expression of HOXA13 confers oncogenic hallmarks to esophageal esophageal keratinocytes. **BBA - Molecular Basis of Disease**, 2020.

NORDENVALL, C. et al. Cancer risk among patients with condylomata acuminata. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 4, p. 888–893, 2006.

OFT, M. et al. Expression of the different viral mRNAs of human papilloma virus 6 in a squamous-cell carcinoma of the bladder and the cervix. **International Journal of Cancer**, v. 53, p. 924–931, 1993a.

OFT, M. et al. Expression of the different viral mRNAs of human papilloma virus 6 in a squamous-cell carcinoma of the bladder and the cervix. **International journal of cancer**, v. 53, n. 6, p. 924–31, abr. 1993b.

OKAGAKI, T. et al. Presence of human papillomavirus in verrucous carcinoma (Ackerman) of the vagina. Immunocytochemical, ultrastructural, and DNA hybridization studies. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 108, n. 7, p. 567–70, jul. 1984.

ÖSTÖR, A. G. **Natural history of cervical intraepithelial Neoplasia: A critical review** **International Journal of Gynecological Pathology**, 1993.

PATEL, H. et al. Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 39, p. 1–14, 2013.

PFISTER, H. Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, n. 31, p. 52–56, 2003.

POLJAK, M. et al. Anogenital Hairs Are an Important Reservoir of Alpha-Papillomaviruses in Patients with Genital Warts. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 9, p. 1270–1274, 2009.

RANDO, R. F. et al. Isolation and characterization of a novel human papillomavirus type 6 DNA from an invasive vulvar carcinoma. **Journal of virology**, v. 57, n. 1, p. 353–6, jan. 1986.

RAPP, B. et al. Cell-type-specific separate regulation of the E6 and E7 promoters of human papillomavirus type 6a by the viral transcription factor E2. **Journal of virology**, v. 71, n. 9, p. 6956–66, set. 1997.

RAYMAKERS, A. J. N. et al. Economic and humanistic burden of external genital warts. **Pharmacoeconomics**, v. 30, n. 1, p. 1–16, 2012.

RIBEIRO, A. L.; CAODAGLIO, A. S.; SICHERO, L. Regulation of HPV transcription. **Clinics**, v. 73, n. suppl 1, p. e486s, 2018.

SAHA, S. S. et al. Expression signatures of HOX cluster genes in cervical cancer pathogenesis : Impact of human papillomavirus type 16 oncoprotein E7. **Oncotarget**, v. 8, n. 22, p. 36591–36602, 2017.

SAHM, B. D. B. et al. Targeting the Oncogenic TBX2 Transcription Factor With Chromomycins. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, n. 110, p. 1–9, 2020.

SANTOS-LÓPEZ, G.; MÁRQUEZ-DOMÍNGUEZ, L. Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. **Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 53, n. 244, p. S166–S171, 2015.

SHAMANIN, V. et al. Specific Types of Human Papillomavirus Found in Benign Proliferations and Carcinomas of the Skin in Immunosuppressed Patients. **Cancer Research**, v. 54, n. 17, p. 4610–4613, 1994.

SICHERO, L. et al. Lack of association between human papillomavirus types 6 and 11 genetic variants and cervical abnormalities: The Ludwig-McGill cohort study. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, p. cebp.0114.2019, 2019.

SICHERO, L.; SOBRINHO, S.; VILLA, L. L. Identification of Novel Cellular Transcription Factors that Regulate Early Promoters of Human Papillomavirus Types 18 and 16. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, p. 867–874, 2012.

SIGURGEIRSSON, B.; LINDELOF, B.; EKLUND, G. Condylomata acuminata and risk of cancer. **British Medical Journal**, v. 303, n. 6812, p. 341–344, 1991.

SMOTKIN, D.; PROKOPH, H.; WETTSTEIN, F. O. Oncogenic and Nononcogenic Human Genital Papillomaviruses Generate the E7 mRNA by Different Mechanisms. **Journal of virology**, v. 63, n. 3, p. 1441–1447, 1989.

SOTO, D.; SONG, C.; MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E. Epigenetic Alterations in Human Papillomavirus-Associated Cancers. **Viruses**, v. 9, n. 9, p. 248, set. 2017.

SRODON, M. et al. The Distribution of Low and High-risk HPV Types in Vulvar intraepithelial

neoplasia. **Am J Surg Path**, v. 30, n. 12, p. 1513–1518, 2006.

STANLEY, M.; PINTO, L. A.; TRIMBLE, C. Human papillomavirus vaccines - immune responses. **Vaccine**, v. 30, n. SUPPL.5, p. F83–F87, 2012.

STEGER, G.; REHTANZ, M.; SCHNABEL, C. Identification of a promoter in position 56 within the long control region of human papillomavirus type 18. **Archives of virology**, v. 146, n. 11, p. 2069–84, 2001.

STERLING, J. C. Human papillomaviruses and skin cancer. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. SUPPL., p. 67–71, 2005.

STERLING, J. C.; HANDFIELD-JONES, S.; HUDSON, P. M. Guidelines for the management of cutaneous warts. **British Journal of Dermatology**, v. 144, n. 1, p. 4–11, 2001.

STOLER, M. H. et al. Differentiation-linked human papillomavirus types 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by in situ hybridization with message-specific RNA probes. **Virology**, v. 172, n. 1, p. 331–40, set. 1989.

STOVALL, D. B. et al. The Regulation of SOX7 and Its Tumor Suppressive Role in Breast Cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 183, n. 5, p. 1645–1653, 2013.

STUBENRAUCH, F.; LAIMINS, L. Human papillomavirus life cycle: Active and latent phases. **Seminars in Cancer Biology**, v. 9, n. 6, p. 379–386, 1999.

TERAI, M.; DESALLE, R.; BURK, R. D. Lack of Canonical E6 and E7 Open Reading Frames in Bird Papillomaviruses: **Journal of Virology**, v. 76, n. 19, p. 10020–10023, 2002.

THIERRY, F. et al. Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. **Journal of virology**, v. 66, n. 6, p. 3740–8, jun. 1992.

THIERRY, F.; YANIV, M. The BPV1-E2 trans-acting protein. **The EMBO journal**, v. 6, n. 11, p. 3391–3397, 1987.

VACCARELLA, S. et al. Cervical cancer in Africa, Latin America and the Caribbean and Asia: Regional inequalities and changing trends. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 10, p. 1997–2001, 2017.

- VAN DOORSLAER, K. et al. The Papillomavirus Episteme: A central resource for papillomavirus sequence data and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 571–578, 2013.
- VAN DOORSLAER, K.; MCBRIDE, A. A. Molecular archeological evidence in support of the repeated loss of a papillomavirus gene. **Scientific reports**, v. 6, p. 33028, set. 2016.
- VIARISIO, D.; GISSMANN, L.; TOMMASINO, M. Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models. **Current Opinion in Virology**, v. 26, p. 56–62, 2017a.
- VIARISIO, D.; GISSMANN, L.; TOMMASINO, M. Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models. **Current Opinion in Virology**, v. 26, p. 56–62, 2017b.
- VILLIERS, E. DE et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17–27, 2004.
- WABINGA, H. R. et al. Trends in the incidence of cancer in Kampala, Uganda 1991-2010. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 2, p. 432–439, 2014.
- WOODHALL, S. et al. Estimation of the impact of genital warts on health-related quality of life. **Sexually Transmitted Infections**, v. 84, n. 3, p. 161–166, 2008.
- ZHANG, R. et al. Upregulation of HOXA13 as a potential tumorigenesis and progression promoter of LUSC based on qRT-PCR and bioinformatics. **International Journal of Clininal and Experimental Pathology**, v. 10, n. 10, p. 10650–10665, 2017.
- ZHANG, Y. et al. SOX7, down-regulated in colorectal cancer , induces apoptosis and inhibits proliferation of colorectal cancer cells. **Cancer Letters**, v. 277, n. 1, p. 29–37, 2009.
- ZHAO, W.; CHOW, L. T.; BROKER, T. R. Transcription activities of human papillomavirus type 11 E6 promoter-proximal elements in raft and submerged cultures of foreskin keratinocytes. **Journal of virology**, v. 71, n. 11, p. 8832–40, nov. 1997.

APÊNDICE A

SÚMULA CURRICULAR – AMANDA SCHIERSNER CAODAGLIO

1. Formação

2012 – 2016: Bacharelado em Ciências Biológicas, IB, USP, SP.

2017 – 2020: Mestrado no Programa de Oncologia, FMUSP, USP, SP.

2. Histórico profissional, serviços e distinções acadêmicas e prêmios

2017 – 2019: Bolsista de Mestrado CAPES

Projeto: “Caracterização da Atividade Transcricional de HPV-6”.

2015 – 2016: Bolsista de Iniciação Científica Fapesp (2015/21279-9);

Projeto: “Validação de peptídeos identificados por Phage Display quanto à capacidade de internalização celular em linhagens de glioblastoma humano”.

2014 – 2015: Bolsista de Iniciação Científica CNPq;

Projeto: "Análise funcional da superexpressão de duas isoformas da proteína NRP/B em linhagem de glioblastoma".

- Menção Honrosa na categoria Mestrado – XIV Jornada da Pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, SP, dezembro de 2019.
- Travel grant para participação no “ICGEB DNA Tumor Virus Meeting – 50th Anniversary”, Trieste, Itália, 2019.
- Primeiro lugar na categoria Mestrado – X Jornada da Pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, SP, dezembro de 2018.
- Menção Honrosa na categoria Mestrado – XIV Jornada da Pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, SP, dezembro de 2017.

- Primeiro lugar na categoria Bacharelado na Exposição Acadêmica – 20ª Semana Temática da Biologia USP, São Paulo, SP, outubro de 2017.

3. Lista de até 10 resultados de Pesquisas mais relevante

- Ribeiro AL, Caodaglio AS, Sichero L. **Regulation of HPV transcription**. Clinics. 2018;73(suppl 1):e486s
- Pereira, T. F., Levin, G., DeOcesano-Pereira, C., Caodaglio, A. S., Fujita, A., Tonso, A., & Sogayar, M. C. (2020). **Fluorescence-based method is more accurate than counting-based methods for plotting growth curves of adherent cells**. BMC research notes, 13(1), 1-7.
- Caodaglio AS; Ribeiro AS, Sobrinho JS, Ferreira S, Villa LL, Sichero L. Characterization of transcriptional activity of HPV-6. **Apresentação oral no 32nd International Papillomavirus Conference**. Sydney, Austrália. 2018.
- Caodaglio AS; Ribeiro AS, Sobrinho JS, Ferreira S, Villa LL, Sichero L. Characterization of transcriptional activity of HPV-6. **Apresentação de pôster no 3rd ICGEB Workshop on Human Papillomavirus and associated malignancies: biology, prevention and therapy**. São Paulo, Brasil. 2017.

4. Link para perfil do MyCitations do Google Scholar

<https://scholar.google.com.br/citations?user=T2w9uHMAAAAJ&hl=pt-BR>

5. Outras informações relevantes

5.1. Outras participações em cursos e eventos

- Apresentação de pôster no evento “XI Jornada da Pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo /Instituto do Câncer do Estado de

São Paulo”. Dezembro de 2019, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil.

- Apresentação de pôster no evento “ICGEB DNA Tumour Virus Meeting – 50th Anniversary”. Julho de 2019, ICGEB, Trieste, Itália.
- Ministrou palestra no “V Curso em Oncologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo”. Janeiro de 2019, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Apresentação de pôster no evento “X Jornada da Pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo /Instituto do Câncer do Estado de São Paulo”. Dezembro de 2018, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Participação no evento “Cancer Research: a joint celebration meeting”. Agosto de 2018, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Workshop “Desafios na apresentação de projetos à FAPESP” promovido pela Diretoria Executiva e pela Comissão Científica dos LIMs. junho de 2018, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Workshop “Graphic Recording como ferramenta didática”. Junho de 2018, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Apresentação de pôster no evento “IX Jornada da Pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo /Instituto do Câncer do Estado de São Paulo”. Dezembro de 2017, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Participação no evento “International Meeting in Oncology Research in Celebration of 80 Years of the Brazilian National Cancer Institute (INCA)”. Setembro de 2017, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brasil.

5.2. Organização de cursos e eventos

- “X Jornada da Pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP)”. Dezembro de 2018, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP),

São Paulo, Brasil.

- “V Curso em Oncologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo”. 28 de janeiro a 02 de fevereiro de 2018, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), São Paulo, Brasil.

APÊNCIE B

CÓPIA DO MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO

Characterization of transcriptional activity of HPV-6

Amanda S. Caodaglio,¹ Aline L. Ribeiro², João S. Sobrinho³, Silvaneide Ferreira⁴ and Laura Sichero⁵

¹Amanda S. Caodaglio, master course, amanda.schiersner@gmail.com,

²Aline L. Ribeiro, FMUSP, alinelopes@usp.br,

³João S. Sobrinho, ICESP, simao.sob@gmail.com

⁴Silvaneide Ferreira, ICESP, silvaneide.ferreira@hc.fm.usp.br,

⁵Laura Sichero, FMUSP, lsichero@gmail.com

Abstract – Genital warts (GW) are associated to HPV-6 infection and HPV-6 B1 variants present a higher risk of GWs development in men compared to B3 variants. HPV transcription is regulated by cellular and viral proteins that bind to the LCR, and little was described concerning HPV-6 transcription regulation. Our aims are to identify transcription factors (TFs) that affect HPV-6 transcription and TFs that act distinctly upon B1 and B3 variants transcription; determine which TFs bind to the LCR and the impact of TFs synergistically upon HPV-6 transcription. Using the GFC-Transfection Array (Origene) 78 TFs were found to activate or repress the LCR in at least one of the variants tested. Among these, 10 TFs presented potential binding sites within the LCR according to analysis performed in JASPAR database. Validation assays revealed that SNAI2, E2F1 e ELF5 repress the LCR activity of both variants, while SOX7 affects the LCR of the B3 variant solely. HOXA13 and SP1 activates only the B1 LCR. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays to evaluate in vitro binding of the different TFs to putative binding sites within the LCR, and the analysis of TFs protein levels in different cell lines by western blot are ongoing. The identification of host TFs that differentially interact with the LCR of different HPV-6 variants could explain, at least in part, the differences in risk of developing GWs attributed to these variants.

Keywords: Human papillomavirus, Transcription, Regulation.

I. INTRODUCTION

Human papillomaviruses (HPV) are a diverse group of small viruses that infect mucous and cutaneous epithelia and whose genome consists of a double-stranded circular DNA molecule about 8kb (BENNETTS et al., 2015; BURK; HARARI; CHEN, 2013). Of all cancer cases caused by infections, about one third is attributed to HPV (VIARISIO; GISSMANN; TOMMASINO, 2017). HPVs responsible for the occurrence of cervical cancer cases are called high risk HPV (HR-HPV).

Although low risk HPV (LR-HPV) is considered non-carcinogenic to humans, LR-HPV infections have important clinical implications as they are often associated with low-grade pathologies in different anatomical regions (CLIFFORD et al., 2006; HOOTS et al., 2009; SRODON et al., 2006). HPV-6, together with HPV-11, is responsible for the occurrence of recurrent respiratory papillomatosis (RRP) (DONNE et al., 2010; MAKIYAMA et al., 2013), in addition to 90% of genital wart (GW) cases (GARLAND et al., 2009; HAWKINS et al., 2013).

The LCR, a non-coding region of the HPV genome comprises approximately 10% of the viral genome and is responsible for regulating transcription and replication. It is divided in 3 distinct functional segments with the central

distinct functional segments with the central segment containing most cellular transcription factors binding sites that influence viral transcription (O'CONNOR et al., 1995; SICHERO; SOBRINHO; VILLA, 2012; THIERRY et al., 1992).

Transcription is the first step in the control of gene expression and its regulation limits the expression of early and late viral genes. Moreover, transcriptional regulation limits the repertoire of cell types that can be infected with HPV (BERNARD, 1990, 2013) and may occur by several mechanisms, such as by the binding of various transcription factors (TF) to specific LCR sequences (GARCÍA-VALLVÉ et al., 2006).

Concerning the transcriptional activity of low-risk HPVs, it has been reported that the HPV-6 B1 variant is ten times more transcriptionally active than a B3 variant of the same viral type (MEASSO DO BONFIM et al., 2015). Since a significant association between B1 variants and the development of GWs in men has recently been described, it can be assumed that increased transcriptional efficiency could affect increased expression of viral E1 and E2, which may confer to the B3 variant a greater replication potential (FLORES-DÍAZ et al., 2017).

Over the past decade, array technology has identified more FTs that bind to the viral promoter sequence (SICHERO; SOBRINHO; VILLA, 2012; CASON; KHAN, 2006). Even so, there are few studies that aimed to characterize the transcriptional activity of oncogenic low-risk HPVs. Therefore, the main objective of the present work is to comprehensively characterize the LCR and the early promoter (P90) transcriptional activity of

HPV-6 molecular variants belonging to B1 and B3 sublineages.

II. MATERIAL AND METHODS

a) Cell culture

C33 cells (ATCC No. HTB-31) and HaCat cells (BCRJ 0341) were cultured in DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB) (ThermoFisher, MA, USA). Human tonsillar epithelial cells (HTE), normal oral hTERT immortalized keratinocytes (NOKs) - both kindly provided by Prof. Dr. Paul F. Lambert (McArdle Laboratory for Cancer Research) - and primary human foreskin keratinocytes (PHK) (Clonetics, NJ, USA) were cultured in serum-free Keratinocyte Serum-Free Medium (KSFM) (Life Technologies, CA, USA). FaDu cells (ATCC No. HTB-43) were cultured in M10 medium (Minimum Essential Medium supplemented with 10% fetal bovine serum). All cells were grown in T175cm² flasks at 37 °C and 5% CO₂.

b) Analysis of the transcriptional activity of HPV-6 B1 and B3 variants

It was used the Transcription Factor-Genome-wide-length cDNA transfection ready clone (GFC) -Transfection Array technology (Origene, Maryland, USA) that consists of 704 human cDNA-containing expression plasmids of all categories of TF. The plasmids were resuspended in distilled and deionized water and transformed by heat shock into competent *E.coli*. Plasmid DNA was then purified and sequenced to confirm the proper nucleotide sequence of TFs. 85

The analysis of the transcriptional activity of both HPV-6 molecular variants was performed on large scale using C33 cells. To each well of 384-well plates we added 60ng of each TF expression plasmid, 100ng of the recombinant reporter plasmid (pGL3-LCR-HPV-6-B1-Luc or pGL3-LCR-HPV-6-B3-Luc) previously constructed in our laboratory (MEASSO DO BONFIM et al., 2015), using the Fugene6 transfection reagent (Roche, Indianapolis, USA). Three independent experiments were performed with each molecular variant LCR and each TF.

After 48 hours, the transcriptional activity of the different variants was measured indirectly by the luciferase enzyme activity using the ONE-Glo Luciferase Assay System kit (Promega, Madison, USA), and the luminescence readings were measured in the Victor Light Luminescence Counter (Perkin Elmer, MA, USA).

a) Identification of putative TF binding sites

In order to identify potential binding sites of the selected FTs within the HPV-6 LCR, in silico analyses using JASPAR databases were performed. The entire LCR sequence of both variants was included into the databases and possible binding sites of all FTs indicated by the programs were noted for comparisons.

b) Single validation assays

C33 cells were co-transfected into 96-well plates with 100ng of the recombinant reporter plasmid (pGL3-LCR-HPV-6-B1-Luc or pGL3-LCR-HPV-6-B3-Luc) to increase the amount of cDNA-containing expression vectors corresponding to the TF to be analyzed in order to verify a possible dose dependence of the transactivating or

transrepressive effect (25, 100, and 300ng). Additionally 100ng of the pCMV- β -Gal vector (MACGREGOR; CASKEY, 1989) was used as an internal control of transfection efficiency (and measured indirectly by the activity of the enzyme β -Galactosidase).

III. RESULTS AND DISCUSSION

Among the 704 TFs originally provided in the Transcription Factor - GFC Transfection Array, successful cloning and sequencing was obtained for 535 cDNA plasmids of different TFs. Among these, 78 TFs were identified that activated or repressed viral transcription at least two times more by in at least one of the variants tested, during at least 2 of the 3 experiments performed (Fig. 1). While most of the identified TFs appear to activate the B1 variant, the majority of TFs suppressed or had no effect upon the LCR of the B3 variant.

To evaluate which of these 78 FTs had putative LCR binding sites within the LCR of the HPV variants, in silico analyses using the JASPAR platform were performed. We observed that 10 TFs showed putative binding sites within the LCR of both HPV-6 variants: TFCEP2, LHX2, SNAIL2, E2F1, ELF5, FOXA1, HOXA13, KLF5, SP1 and SOX7, indicating that, at least in these cases, there could be a direct impact upon transcriptional activity. These 10 TFs were selected for further validation assays.

Figure 4. Analysis of transcriptional activity of molecular variants belonging to HPV-6 B1 and B3 sublineages. Transcriptional activity analysis was performed using the Transfection Array (GFC) technology (Origene). C33 cells were transfected with 60ng expression plasmid containing cDNA of different classes of transcription factors (TF). After 48h, these cells were lysed and luminescence measured with the ONE-Glo Luciferase Assay System kit on the Victor Light Luminescence Counter (Perkin Elmer, Massachusetts, USA). 78 TFs activated (green) or inhibited (red) the LCR of at least one of the variants by two-fold in relation to basal LCR activity. The experiment was performed in independent triplicates for each of the variants analyzed. Black rectangles mean that the transcription factor was not activated or did not inhibit the LCR transcriptional activity of a given variant by two-fold.

reading and the value was compared with baseline LCR activity (empty vector), named 1.

Figure 2. Validation of the effects of the impact of overexpression of specific TFs upon the transcriptional activity of molecular variants belonging to HPV-6 sublineages B1 and B3. Increasing amounts (25ng, 100ng and 300ng) of TF expression plasmids were co-transfected into C33 cells along with 100ng of the reporter recombinant plasmid (pGL3-LCR-HPV-6-B1-Luc or pGL3-LCR-HPV-6-B3-Luc) and 100ng of the pCMV-b-Gal vector. After 48h, LCR activity was measured indirectly by luminescence

Among the 10 TFs selected for validation, five had an effect upon the LCR activity of at least one of the variants (Fig. 2). SNAI2, ELF5, E2F1 suppressed the LCR activity of both variants, especially when transfected at higher doses (100 or 300 ng). On the other hand, SOX7 only inhibited the B3 variant's transcriptional activity, although the results obtained when using LXH2 are extremely discreet. Additionally, the HOXA13 transactivating potential appears to be specific to variant B1 (Fig. 2).

It is noteworthy that TFs with tumor suppressor properties were mainly observed to repress the HPV-6 activity, especially of the B3 variant (SOX7 and ELF5) (CHAKRABARTI et al., 2013; ZHANG et al., 2009; ZHOU et al., 2011).

As shown in a previous work of our group, variants of the HPV-6 B1 sublineage are associated with a higher risk of developing genital warts in men compared to B3 variants (FLORES-DÍAZ et al., 2017). A possible explanation for this may be the fact that B1 variants are 10 times more transcriptionally active than B3 variants (MEASSO DO BONFIM et al., 2015), which could lead to higher transcriptional efficiency of E1 and E2 viral proteins and give B1 variants an increased replicative potential. The higher transcriptional activity attributed to the B1 may be explained, at least in parts by our data, since most TFs studied had a higher inhibitory effect upon the B3 LCR as compared to their B1 counterpart, and TFs which activated viral transcription appeared to only influence the B1 variant.

IV. CONCLUSIONS

Additional experiments are underway in order to better understand the transcriptional regulation of HPV-6 variants. ChIP-RT-PCR assays are ongoing to evaluate the *in vivo* binding of selected TFs.

Validation assays to evaluate the synergistic impact of the different TFs upon the LCR activity were already performed and are being analyzed. Moreover, western blots are underway to evaluate the protein levels of the TFs in different cells lines.

A broader understanding of HPV mRNA expression and its regulation could lead to the development of new diagnostic approaches and reveal strategic cellular targets for the development of innovative antiviral therapies (BERNARD, 2002). Although inhibition of transcriptional regulatory factors may be detrimental to normal cells, as it is necessary for host cell homeostasis, these proteins can be inhibited using compounds targeted to specific LCR sequences, thus affecting the viral life cycle.

V. ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge funding agencies Capes and FAPESP, as well the Instituto do Câncer do Estado de São Paulo for supplying all funding and infrastructure needed to perform this work.

VI. REFERENCES

- BENNETTS, L. E. et al. Associations of Anogenital Low-Risk Human Papillomavirus Infection With Cancer and Acquisition of HIV. v. 42, n. 10, p. 541–544, 2015.
- BERNARD, H. Controls in the papillomavirus cycle. **FEMS Microbiology Immunology**, v. 64, p. 201–205, 1990. 88
- BERNARD, H. Regulatory elements in the viral genome. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 197–204,

- BENNETTS, L. E. et al. Associations of Anogenital Low-Risk Human Papillomavirus Infection With Cancer and Acquisition of HIV. *v. 42, n. 10, p. 541–544, 2015.*
- BERNARD, H. Controls in the papillomavirus cycle. **FEMS Microbiology Immunology**, v. 64, p. 201–205, 1990.
- BERNARD, H. Regulatory elements in the viral genome. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 197–204, 2013.
- BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants. **Virology**, v. 445(0), p. 232–243, 2013.
- CARSON, A.; KHAN, S. A. Characterization of Transcription Factor Binding to Human Papillomavirus Type 16 DNA during Cellular Differentiation. **Journal of Virology**, v. 80, n. 9, p. 4356–4362, maio 2006.
- CHAKRABARTI, R. et al. Elf5 inhibits epithelial mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing Snail2/Slug. **Nat Cell Biol.**, v. 14, n. 11, p. 1212–1222, 2013.
- CLIFFORD, G. et al. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 3, p. 26–34, 2006.
- DONNE, A. J. et al. The role of HPV type in Recurrent Respiratory Papillomatosis. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 74, p. 7–14, 2010.
- FLORES-DÍAZ, E. et al. HPV-6 Molecular Variants Association With the Development of Genital Warts in Men: The HIM Study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, p. 559–565, 2017.
- GARCÍA-VALLVÉ, S. et al. Different papillomaviruses have different repertoires of transcription factor binding sites : convergence and divergence in the upstream regulatory region. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, p. 1–14, 2006.
- GARLAND, S. M. et al. Natural History of Genital Warts: Analysis of the Placebo Arm of 2 Randomized Phase III Trials of a Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6, 11, 16, and 18) Vaccine. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 6, p. 805–814, 2009.
- HAWKINS, M. G. et al. Detection of specific HPV subtypes responsible for the pathogenesis of condylomata acuminata. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 1, 2013.
- HOOTS, B. E. et al. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 10, p. 2375–2383, 2009.
- MAKIYAMA, K. et al. Assessment of human papilloma virus infection in adult laryngeal papilloma using a screening test. **Journal of Voice**, v. 27, n. 2, p. 230–235, 2013.
- MEASSO DO BONFIM, C. et al. Differences in Transcriptional Activity of Human Papillomavirus Type 6 Molecular Variants in Recurrent Respiratory Papillomatosis. **PloS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–12, 2015.
- SICHERO, L.; SOBRINHO, S.; VILLA, L. L. Identification of Novel Cellular Transcription Factors that Regulate Early Promoters of Human Papillomavirus Types 18 and 16. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, p. 867–874, 2012.
- SRODON, M. et al. The Distribution of Low and High-risk HPV Types in Vulvar intraepithelial neoplasia. **Am J Surg Path**, v. 30, n. 12, p. 1513–1518, 2006.
- THIERRY, F. et al. Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. **Journal of virology**, v. 66, n. 6, p. 3740–8, jun. 1992.
- VIARISIO, D.; GISSMANN, L.; TOMMASINO, M. Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models. **Current Opinion in Virology**, v. 26, p. 56–62, 2017.
- ZHANG, Y. et al. SOX7 , down-regulated in colorectal cancer , induces apoptosis and inhibits proliferation of colorectal cancer cells. **Cancer Letters**, v. 277, n. 1, p. 29–37, 2009.
- ZHOU, X. et al. SOX7 is involved in aspirin-mediated growth inhibition of human colorectal cancer cells. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 44, p. 4922–4927, 2011.

APÊNCIE C

CÓPIA DA REVISÃO PUBLICADA

Regulation of HPV transcription

Aline Lopes Ribeiro*, Amanda Schiersner Caodaglio, Laura Sichero

Centro de Pesquisa Translacional em Oncologia, Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo (ICESP), Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR.

Ribeiro AL, Caodaglio AS, Sichero L. Regulation of HPV transcription. Clinics. 2018;73(suppl 1):e486s

*Corresponding author. E-mail: alinelopes@usp.br

Human papillomavirus infection is associated with the development of malignant and benign neoplasms. Approximately 40 viral types can infect the anogenital mucosa and are categorized into high- and low-risk oncogenic human papillomavirus, depending on their association with the development of cervical carcinoma. High-risk human papillomavirus 16 and 18 are detected in 55% and 15% of all invasive cervical squamous cell carcinomas worldwide, respectively. Low-risk human papillomavirus 6 and 11 are responsible for 90% of genital warts and are also associated with the development of recurrent respiratory papillomatosis. Human papillomavirus preferentially infects mitotic active cells of the basal layer from both mucosal and cutaneous epithelium through microabrasions. The viral life cycle synchronizes with the epithelial differentiation program, which may be due, in part, to the binding of differentially expressed cellular transcription factors to the long control region throughout the various epithelial layers. This review aimed to summarize the current knowledge regarding the mechanisms by which viral gene expression is regulated and the influence of human papillomavirus heterogeneity upon this phenomenon. A better understanding of the regulatory mechanisms may elucidate the particularities of human papillomavirus-associated pathogenesis and may provide new tools for antiviral therapy.

KEYWORDS: Human papillomavirus (HPV); Transcription; Long Control Region; Differentiation.

INTRODUCTION

Human papillomavirus (HPV) infection is strongly associated with the development of several malignant and benign neoplasms. Over 200 different HPV genotypes have been isolated, thoroughly sequenced and numbered in order of their discovery, among which approximately 40 types can infect the anogenital mucosa (1). These types are also categorized into high- and low-risk oncogenic HPVs based on their association with the development of cervical carcinoma. HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 66 are classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as carcinogenic in humans (type I carcinogens), while HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44 and 54 are grouped as low-risk oncogenic viruses (2).

The association between HPV infection and the development of cervical cancer was first reported in the early 1970s (3). Although most infections are asymptomatic and spontaneously eliminated, persistent infections by high-risk HPVs are responsible for the development of most, if not all, cervical cancers worldwide (4). HPVs 16 and 18 account for approximately 55% and 15% of all invasive cervical squamous cell carcinoma (SCC) worldwide, respectively (5). Furthermore, approximately 85% of anal canal tumors, 50% of vulvar and penile tumors and 70%

of vaginal tumors can be attributed to HPV infection, in addition to 10% to 90% of oropharynx cancers. It is noteworthy that HPV-16 is detected in almost all cancers of these extracervical anatomical sites that are associated with HPV infection (6,7). On the other hand, low-risk HPVs 6 and 11 are responsible for over 90% of genital warts (GWs) in both genders and are also associated with the development of recurrent respiratory papillomatosis (RRP), which is characterized by the repeated formation of benign papillomas in the upper respiratory tract (8,9). Nevertheless, although classified as low-risk, HPV-6 has been identified in several malignancies, including carcinomas of the vagina (10), vulva (11,12), penis (13), tongue (14), cervix (15,16), and tonsils (17).

HPVs are nonenveloped viruses with a circular, double-stranded genome that comprises approximately 8000 base pairs (bp) (18). The viral genome is physically divided into 3 regions: the early (E) and late (L) regions and the long control region (LCR). E1 and E2 proteins play a role in regulating viral DNA transcription and replication (19), whereas E4, E5, E6, and E7 proteins are involved in cell cycle deregulation, immune evasion and recruitment of replication host factors (20). L1 and L2 late proteins comprise the major and secondary capsid proteins, respectively.

HPVs infect the stratified squamous epithelia, both mucosal and cutaneous, and preferentially target mitotically active cells of the basal layer through microtraumas. In basal epithelia cells, HPVs are established as episomes within the nuclei, and expression of early proteins that are necessary for DNA replication occurs (20). As basal cells undergo differentiation, the expression pattern of HPVs is modified. Finally, in more differentiated cells, late gene expression occurs, and new virions are released (21). The switch between HPV promoters activation in the cells of supra basal layers suggests that synchronization of the viral life cycle to the epithelial differentiation

Copyright © 2018 CLINICS – This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium or format, provided the original work is properly cited.

No potential conflict of interest was reported.

Received for publication on March 19, 2018. **Accepted for publication** on June 5, 2018

Commemorative Edition: 10 years of ICESP

DOI: 10.6061/clinics/2018/e486s

Figure 1 - Schematic representation of the LCR and E6 and E7 genes from high- and low-risk HPVs, represented by HPV-16 and HPV-6, respectively. Four E2 binding sites (E2bs) are conserved among mucosal HPVs, with E2bs#1 and E2bs#2 dividing the LCR in three distinct segments: the 5' segment, the central segment and the 3' segment. The 5' segment contains the late transcription termination signal, denominated 'late pA', the central segment functions as an epithelial-specific enhancer, and the 3' segment encloses the ori region. Early promoters are also indicated: HPV-16 (P97) and HPV-6 (P90, P270, P680).

program is due to, at least in part, the binding of a repertoire of differentially expressed cellular transcription factors (TFs) to the LCR throughout the various layers of the epithelium.

This review summarizes the current knowledge regarding the mechanisms of viral gene expression regulation at the transcription level and the influence of HPV heterogeneity upon this phenomenon. Advances in the knowledge of the regulatory networks may shed light on the particularities of HPV-associated pathogenesis that are relevant for disease establishment and may provide new tools for antiviral therapy.

The long control region

The LCR is a noncoding region between the *L1* and *E6* genes that comprises approximately 10% of the viral genome and is physically divided into three distinct segments: the 5' segment, the central segment and the 3' segment.

Most mucosal HPVs present four E2 binding sites (E2bs) distributed along all the three LCR regions. The 5' segment contains the first E2bs, in addition to the transcription termination and polyadenylation sites for late transcripts. The central segment of the LCR is flanked by two E2bs and has been

shown to function as an epithelial-specific transcriptional enhancer (22-24). This segment encloses several motifs that are important either to stimulate or to suppress viral transcriptional activity. These motifs include binding sites to AP1, NF1, TEF1, OCT1, YY1, BRN-3a, NF-IL6, KRF-1, NF-kB, FOXA1, and GATA3, among several others (25-28). Thus, the activation/repression of HPV early promoters involves synergism between these proteins, which vary in affinity for the different cis-elements within the LCR of the different HPV types and variants. Finally, the 3' segment of the LCR contains two E2bs in addition to an E1 binding site (E1bs) overlapping the origin of replication.

P97 and P105 are the main early promoters of HPVs 16 and 18, respectively, and are also the most well studied. For both high-risk HPVs, transcripts initiated in E6 are differentially edited, codifying all early genes (29) (Figure 1). Additionally, for both viral types a part of the E6 mRNA is spliced out for efficient translation of E7 (30).

In contrast, in low-risk HPVs 6 and 11, two early promoters have been identified, P90 and P270, that enable the individual regulation of *E6* and *E7* genes, respectively, although the regulation of both promoters is controlled by cis-elements within the LCR (30-35). It is noteworthy the

presence of a third early promoter in HPVs 6 and 11, P680, that encodes the fusion protein E1⁺E4 (36). It has been reported that P90, P270 and P680 are differentially regulated, indicating that the independent regulation of early proteins is important to the viral life cycle (32,34,37-39). For example, the binding of E2 to the most distal E2bs stimulates P270, whereas E2 binding to both proximal sites inhibits the P90 E6 promoter (38). Furthermore, the P680 promoter was shown to be used in a differentiation-specific manner both *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, whereas E7 mRNA was the most abundant transcript in a cervical carcinoma sample, in a benign genital wart, E1⁺E4 transcripts were the most prevalent (15).

Transcriptional regulation of HPVs

Transcription is the first step of gene expression control, followed by regulation of mRNA processing and other post-transcriptional events. Transcriptional regulation not only restricts the expression of early and late genes to when they are needed but also limits the range of cell types that HPVs are able to infect, avoids the premature expression of immunogenic viral proteins, and modulates virus biology in response to hormones and growth factors (40-42). HPV transcription is mostly controlled by the E2 viral protein in addition to host cell TFs that bind to specific sequences within the LCR which vary substantially among different viral types and variants (43). HPV gene expression control also involves epigenetic changes, such as nucleosome remodeling and DNA methylation (44).

Approximately 90 bp downstream of the E1 binding site is where the transcription start site is located. A segment of approximately 45 bp within these 90 bp contains a SP1 binding site overlapping the E2bs#3 and a TATA box overlapping E2bs#4. The overlap of both E2bs with these cis-elements occurs in such a way that occupancy by E2 proteins displaces TFIID and the SP1 factor (45-49). In turn, the binding of SP1 and TFIID to the LCR sterically inhibits E2 binding, activating early promoters (46,49). In all mucosal HPVs, the spacing of the SP1, TATA, and E2 binding sites at E6/E7 promoters are conserved (28).

E2 is the most important viral transcriptional regulator in HPV early expression and therefore has a high impact on E6 and E7 protein levels (25,50). In preneoplastic and malignant neoplastic lesions, the viral DNA often integrates into the cell genome (51), and integration seems to occur mostly at random (52). However, viral integration usually results in interruption of the E2 gene, abolishing E2-negative transcriptional regulation and resulting in constitutive expression of E6 and E7 proteins (25).

In addition to binding directly to its specific sequence, E2 also influences viral transcription by recruiting cellular factors to the viral genome. One of the best-characterized host interactors of E2 is the bromodomain-containing protein 4 (Brd4), a transcription cofactor and chromatin regulator (53). Both E2-mediated activation and repression of the early promoter require interaction with Brd4 (54,55). A recent study revealed that a phosphorylated region of Brd4 interacts selectively with high-risk E2 proteins. The study showed that the blockage of phospho-Brd4 activity alleviates E2-mediated inhibition of HPV-18 promoter activity (56). Another study demonstrated that Brd4 is capable of directly activating HPV-18 transcription during early stages of infection in an E2-independent manner, indicating that Brd4 plays a central role in the dynamics of viral expression (57).

Another important virally expressed transcriptional regulator is the E8⁺E2 protein, which is a product of splicing (58). It was demonstrated that E8⁺E2 proteins in HPVs 16, 18, and 31 are potent repressors of viral transcription, and the conserved E8 component of E8⁺E2 is capable of recruiting cellular corepressors to inhibit transcription of the viral major early promoter in such a way that is more efficient than the recruitment by the E2 component (59-61). Host cell NCoR/SMRT complexes have been reported to act as corepressors of E8⁺E2 proteins in HPVs 1, 8, 16 and 31 (62). This complex encloses GPS2, HDAC3, NCoR, SMRT and TBL1 and TBLR1 proteins and is typically involved in transcriptional repression of cellular genes.

Concerning cellular TFs that bind directly to the LCR, there is a large list of well-characterized regulators (including YY1, AP1, NF1, OCT1, SP1, and CDP), many of which conservatively bind to the central segment of the LCR of several HPV types that infect the mucosa. These regulators have been demonstrated to be relevant not only to HPV epitheliotropism but also to host cell differentiation-dependent regulation of viral infection (25). It was recently reported that the cellular CCTC-binding factor (CTCF) has a conserved binding site within the E2 open reading frame of high-risk HPVs, in addition to a cluster of cis-elements in the late gene region of the genomes of HPVs 16, 18, 31, 11, and 6. CTCF is recruited during epithelial differentiation to regulate both the transcription of E6 and E7 and transcript processing (63).

García-Vallvé and col. (2006) performed an *in silico* analysis to search for putative cis-elements within the LCR of 61 papillomavirus (PVs) types infecting 20 different hosts (43). Overall this study indicated that the number and nature of TF binding sites within the LCR can be much broader than described to date, some of which are predicted to be present in most PVs, whereas others cis-elements seems to be restricted to specific PVs. Curiously, in this study, YY1 putative binding sites in the LCR of HPVs 18 and 6 were not found, although the impact of this TF upon the transcriptional activity of both viral types was already demonstrated (64,65). It is noteworthy, however, that the identification of a putative cis-element alone does not implicate that this nucleotide sequence will always be bound by its cognate TF. For instance, many cis-elements within the various LCRs are juxtaposed or even overlapped with others. We must also take into consideration the existence of degenerate and/or low affinity sites that could increase the number of probable binding sites for a given protein. Furthermore, some TF binding sites are very similar, such as the recognition sequences for TEF-1, TEF-2 and YY1, and these sites may be differently occupied depending on the availability of each of these proteins (28).

Additionally, the HPV LCR embraces hormone-responsive elements, including glucocorticoid response element (GREs) and progesterone responsive elements (PREs). Complexes formed by steroid hormones and receptor proteins interact with these specific regulatory sequences and either upregulate or downregulate the transcription of viral early genes (66,67). The administration of exogenous estrogen induces HPV-18 LCR activity in both squamous and glandular cells of the cervix and vagina, leading to an increased E6/E7 expression and to a higher susceptibility of neoplastic transformation (68). Likewise, a study regarding smoking-related effects upon the LCR activity revealed that tobacco smoke was able to activate the HPV-16 P97 promoter in a dose-dependent manner in tumor lung cells. However, in nontumor lung cells, the same effect

depended on the ectopic expression of HPV-16 E6 and E7 oncogenes (69).

Chromatin remodeling also plays a pivotal role in regulating HPV transcription. The HPV-16 genome contains nucleosomes in specific positions, one at the center of the viral enhancer and another overlapping the replication origin and the E6 promoter (44). Both nucleosomes repress the activity of the early promoter, which is released by the addition of SP1 and AP1 proteins (70). The influence of nucleosomes upon viral early and late transcription events was also reported in HPV-31: nucleosomes at both promoter regions were activated through histone modifications during differentiation (71).

In addition to the remodeling of nucleosomes, DNA methylation also participates in the epigenetic regulation of HPV gene expression. Host cell methyltransferases methylate HPV DNA, and viral DNA methylation profiles have been related to important features of the viral life cycle (72). Among these features, several studies have focused on the analysis of E2bs methylation, and taken together, the data reveal that differential methylation of the different E2bs has an impact on the activation of viral E6 and E7 expression in cervical lesions (73-75). Additionally, analysis of the methylation status of CpG dinucleotides within TF binding sites in the LCR of HPV-16 indicated that these epigenetic alterations are linked to squamous epithelial differentiation (76).

While most studies regarding HPV transcriptional control rely on early promoter activity, little is known about the mechanisms regulating late promoters. The levels of a variety of cellular TFs, including c-MYB, NF1, PAX5, NFAT, STAT5, C/EBP β , among others, increase upon epithelial differentiation; however, the functional relevance and how these various factors contribute to transcription regulation remains unclear (77,78). Recent findings indicate that transcript elongation is also a critical step for viral late gene upregulation. It was demonstrated that cyclin dependent kinase 9 (CDK9), CDK8 and Brd4 are recruited to activate the HPV-16 late promoter under differentiation conditions and to assist Pol II complex activity until transcription is accomplished (79). The viral oncoprotein E7 might also activate the HPV-16 late promoter, indicating that the virus, *per se*, also plays an active role in regulating its own expression (80).

The study of HPV regulatory elements progressed rapidly for approximately 15 years, beginning in the early 1980s, but interest declined dramatically, which was possibly associated with limitations of the available methodologies. However, the understanding of HPV transcriptional regulation is far from achieving maturity. In the last decade the development of array technologies made possible the identification of several additional TFs that impact HPV transcriptional activity. Competition assays using an array comprising 345 consensus binding sites for different TFs identified factors that specifically bind to the HPV-16 LCR in differentiated and undifferentiated cells (77). It is noteworthy that the methodology used was able to confirm several TFs already described to influence the expression of HPVs, although most of the associations reported were still unpublished.

In our laboratory a powerful approach was used to analyze the effect of 704 TFs upon the transcriptional activity of HPVs 16 and 18 using a large-scale transfection assay (26). Twenty-eight TFs that stimulated and 36 that repressed the LCR were identified, most of which had not yet been described. Although many of the TFs appear to act by indirect mechanisms, binding sites on the viral LCR for a

subset of these modulators were identified. Among these, FOXA1 had the greatest effect upon HPV-16 and HPV-18 transcriptional activities, and this was a direct effect, as we were able to show *in vivo* binding of FOXA1 to the LCR in both viral types. Moreover, the differential expression patterns of FOXA1 indicate that this protein may be important to HPV-associated carcinogenesis: we observed that FOXA1 is expressed at higher levels in immortalized and HPV-transformed cell lines than it is in normal cells (26), and FOXA1 was further shown to be strongly expressed in basal epithelial cells, preinvasive lesions, and cervical and head and neck carcinomas (81). Sex determining region Y (SRY)-box 2 (SOX2) has also been recently proposed as a transcriptional repressor of the HPV-16 LCR; SOX2 binds to three putative binding sites identified in the enhancer sequence of the LCR through direct interactions and leads to the inhibition of E6 and E7 expression (82).

Impact of HPV nucleotide heterogeneity upon LCR transcriptional activity

HPV taxonomy is based on the variability of the L1 gene sequence, and viral genomes are classified as new types when these have less than 90% of identity with any other type. Additionally, genome heterogeneity of 1.0-10.0% and 0.5%-1.0% define HPV variant lineages and sublineages, respectively (83). HPV DNA variability studies have been used as an important tool for the analysis of viral evolution. Additionally, it has been observed that specific HPV variants are differentially associated with disease outcome. Since HPV variants show approximately 5% of divergence within the LCR, the impact of HPV nucleotide heterogeneity upon transcriptional activity has been analyzed since nucleotide divergence could influence TF affinity for their recognition sites, thus influencing E6/E7 levels and consequently the carcinogenesis induced by these viruses. In fact, we reported that the HPV-18 P105 promoter is 12 times more transcriptionally active than the HPV-16 P97 promoter (84). These results corroborate previous observations showing that although HPV-18 is 10 times more efficient than HPV-16 in the transformation of human keratinocytes, E6/E7 proteins of both viral types immortalizes these cells with similar efficiency when expressed from a heterologous promoter (85).

Since the early 90s it is known that nucleotide alterations within the LCR among variants of HPV-16 overlap cis-elements (86). Next, it was reported that whereas variants from the A1-A3 sublineages have similar transcriptional activity, variants from the D sublineage attain higher activity, which may support augmented E6 and E7 levels and finally confer enhanced oncogenic potential to specific variants (87). These observations are in line with epidemiological data that indicate that HPV-16 variants from the D lineage are associated with an increased risk of HPV persistence and cervical disease development (88-95). Differences in transcriptional activity were attributed to the E6-proximal end of the LCR, even though it was not possible to implicate the observed differences to a single nucleotide alteration (96). It is also important to note that TF recognition sequences could be created or abolished between HPV variants due to nucleotide changes in the LCR. The expression of viral E2 and E1 replicating proteins has also been influenced by the heterogeneity in the LCR sequence inherent of HPV-16 variants, which has affected the viral replication efficiency as well (97).

BRN3, a long-known cellular transcription factor, binds directly to a specific motif of the HPV LCR, strongly

Figure 2 - Differential promoter activity among different HPV variants. (A) Variants from the HPV-18 Asian-Amerindian branch presented a higher early promoter activity than variants of the European branch. (B) For HPV-6, a variant of the B1 sublineage was ten times more transcriptionally active than was a variant from the B3 sublineage. Adapted from Sichero et al., 2005 (84) and Measso do Bonfim et al., 2015 (105).

stimulating its activity (98,99). BRN3 and nicotine from smoking were shown to have a synergistic effect upon the LCR in a variant-specific manner (100). The BRN3/nicotine response increases the transcription HPV-16 *E6/E7* genes and was shown to be related to higher grades of cervical intraepithelial neoplasia and cancer.

Although it was observed that the LCR sequence of HPVs 18 and 58 is more conserved than the LCR sequence of HPV-16, there are significant differences in the early promoter activity among molecular variants of both viral types (84,101). For instance, we observed that Asian-Amerindian variants achieved higher transcriptional activity than variants from the European branch (84) (Figure 2A).

Genome variability of low-risk HPVs 6 and 11 has also been evaluated, and molecular variants of both viral types were phylogenetic grouped (102-104). It was reported that a variant from the HPV-6 B1 sublineage is ten times more transcriptionally active than a B3 variant is (105) (Figure 2B). Since a significant association between variants of the B1 sublineage and the development of GWs was recently described, it is possible to hypothesize that the increased transcriptional efficiency could impact the increased expression of viral E1 and E2, which can confer B1 variants to have an increased replication potential (106). Moreover, the results support a crucial role of the ELF1 protein in the lower transcriptional activity observed for the B3 variant (105). A correlation between the transcriptional activity of specific HPV-11 variants and the clinical aggressiveness of RRP has also been reported (107). Additionally, it was reported that duplication in the early viral promoter sequence of HPV-11 was associated with a higher degree of disease severity (108).

A broader comprehension of HPV mRNA expression and its regulation could lead to the development of novel diagnostic approaches and reveal strategic cellular targets for the development of innovative antiviral therapies (25). Even though inhibition of transcriptional regulatory factors could be harmful to normal cells once it is required for host cell homeostasis, these proteins could be inhibited using compounds targeting specific LCR sequences, thus affecting viral life cycle. Therefore, a molecule that could specifically bind to cis-responsive elements indispensable for *E6* and *E7* transcription of different viral types and variants could interfere with the transformation process that is dependent on the constitutive expression of both oncoproteins.

A recent approach based on TF research relied on the identification of molecular signatures associated with HPV positivity and the prognosis of head and neck cancers outcome. In this context, differential expression of key transcription factors, such as AP1, activator of transcription 3 (STAT3) and NF- κ B, was reported between HPV-positive and HPV-negative cancers (109-111). More specifically, in HPV-positive squamous cell carcinomas of the oral cavity, higher levels of AP1 and NF- κ B in addition to a lack of STAT3 was observed, and this pattern was suggested to be useful for discriminating tumors with a better prognosis (110). Therefore, the study of TF expression patterns may also provide useful prognostic biomarkers as well as novel insights to the molecular aspects of HPV-driven carcinogenesis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Ribeiro AL, Caodaglio AS, and Sichero L critically discussed and wrote the manuscript.

REFERENCES

1. Van Doorslaer K, Bernard HU, Chen Z, de Villiers EM, zur Hausen H, Burk RD. Papillomaviruses: evolution, Linnaean taxonomy and current nomenclature. *Trends Microbiol.* 2011;19(2):49-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2010.11.004>.
2. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 2009;10(4):321-2. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70096-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70096-8).
3. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer.* 1974;13(5):650-6. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.2910130509>.
4. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010;202(12):1789-99. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiq232>.
5. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-9. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F).
6. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):467-75. <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0551>.
7. Serrano B, Brotons M, Bosch FX, Bruni L. Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;47:14-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.006>.
8. Buchinsky FJ, Donfack J, Derkay CS, Choi SS, CConley SF, CMyer CM 3rd, et al. Age of child, more than HPV type, is associated with clinical

- course in recurrent respiratory papillomatosis. *PLoS One*. 2008;3(5):e2263. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002263>.
9. Larson DA, Derkay CS. Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. *APMIS*. 2010;118(6-7):450-4. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02619.x>.
10. Okagaki T, Clark BA, Zachow KR, Twigg LB, Ostrow RS, Pass F, et al. Presence of human papillomavirus in verrucous carcinoma (Ackerman) of the vagina. *Immunocytochemical, ultrastructural, and DNA hybridization studies*. *Arch Pathol Lab Med*. 1984;108(7):567-70.
11. Rando RF, Groff DE, Chirikjian JG, Lancaster WD. Isolation and characterization of a novel human papillomavirus type 6 DNA from an invasive vulvar carcinoma. *J Virol*. 1986;57(1):353-6.
12. Kasher MS, Roman A. Characterization of human papillomavirus type 6b DNA isolated from an invasive squamous carcinoma of the vulva. *Virology*. 1988;165(1):225-33. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90676-9](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(88)90676-9).
13. Alemany L, Cubilla A, Halc G, Kasamatsu E, Quirós B, Masferrer E, et al. Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. *Eur Urol*. 2016;69(5):953-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2015.12.007>.
14. Kitasato H, Dellius H, zur Hausen H, Sorger K, Rösl F, de Villiers EM. Sequence rearrangements in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 6: are these involved in malignant transition? *J Gen Virol*. 1994;75(Pt 5):1157-62. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-75-5-1157>.
15. Oft M, Böhm S, Wilczynski SP, Ifner T. Expression of the different viral mRNAs of human papilloma virus 6 in a squamous-cell carcinoma of the bladder and the cervix. *Int J Cancer*. 1993;53(6):924-31. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.2910530610>.
16. Wilczynski SP, Oft M, Cook N, Liao SY, Ifner T. Human papillomavirus type 6 in squamous cell carcinoma of the bladder and cervix. *Hum Pathol*. 1993;24(1):96-102. [http://dx.doi.org/10.1016/0046-8177\(93\)90068-R](http://dx.doi.org/10.1016/0046-8177(93)90068-R).
17. Bercovich JA, Centeno CR, Aguilar OG, Grinstein S, Kahn T. Presence and integration of human papillomavirus type 6 in a tonsillar carcinoma. *J Gen Virol*. 1991;72(Pt 10):2569-72. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-72-10-2569>.
18. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*. 2005;32(Suppl 1):S1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.021>.
19. Van Doorslaer K, McBride AA. Molecular archeological evidence in support of the repeated loss of a papillomavirus gene. *Sci Rep*. 2016;6:33028. <http://dx.doi.org/10.1038/srep33028>.
20. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjc C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. 2015;25(Suppl 1):2-23. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.1822>.
21. Ozbun MA, Meyers C. Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol*. 1997;71(7):5161-72.
22. Chin MT, Broker TR, Chow LT. Identification of a novel constitutive enhancer element and an associated binding protein: implications for human papillomavirus type 11 enhancer regulation. *J Virol*. 1989;63(7):2967-76.
23. Cid A, Auewarakul P, Garcia-Carranca A, Ovseiovich R, Gaisert H, Gissmann L. Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J Virol*. 1993;67(11):6742-52.
24. Cripe TP, Alderborn A, Anderson RD, Parkkinen S, Bergman P, Haugen TH, et al. Transcriptional activation of the human papillomavirus-16 P97 promoter by an 88-nucleotide enhancer containing distinct cell-dependent and AP-1-responsive modules. *New Biol*. 1990;2(5):450-63.
25. Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther*. 2002;7(4):219-37.
26. Slichero L, Sobrinho JS, Villa LL. Identification of novel cellular transcription factors that regulate early promoters of human papillomavirus types 18 and 16. *J Infect Dis*. 2012;206(6):867-74. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis430>.
27. Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, Howley P. Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J Virol*. 1992;66(6):3740-8.
28. O'Connor M, Chan SY, Bernard HU. Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. In: Myers G, Bernard HU, Dellius H, Baker C, Icenogle J, Halpern A, Wheeler C, editors. *Human Papillomaviruses 1995 Compendium, part III-A*. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory; 1995. p. 21-40.
29. Steger G, Rehtanz M, Schnabel C. Identification of a promoter in position 56 within the long control region of human papillomavirus type 18. *Arch Virol*. 2001;146(11):2069-84. <http://dx.doi.org/10.1007/s007050170021>.
30. Smotkin D, Prokoph H, Wettstein FO. Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol*. 1989;63(3):1441-7.
31. Chow LT, Nasser M, Wolinsky SM, Broker TR. Human papillomavirus types 6 and 11 mRNAs from genital condylomata acuminata. *J Virol*. 1987;61(8):2581-8.
32. DiLorenzo TP, Steinberg BM. Differential regulation of human papillomavirus type 6 and 11 early promoters in cultured cells derived from laryngeal papillomas. *J Virol*. 1995;69(11):6865-72.
33. Karlen S, Oford EA, Beard P. Functional promoters in the genome of human papillomavirus type 6b. *J Gen Virol*. 1996;77(Pt 1):11-6. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-77-1-11>.
34. Stoler MH, Wolinsky SM, Whitbeck A, Broker TR, Chow LT. Differentiation-linked human papillomavirus types 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by in situ hybridization with message-specific RNA probes. *Virology*. 1989;172(1):331-40. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90135-9](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(89)90135-9).
35. Zhao W, Chow LT, Broker TR. Transcription activities of human papillomavirus type 11 E6 promoter-proximal elements in raft and submerged cultures of foreskin keratinocytes. *J Virol*. 1997;71(11):8832-40.
36. Nasser M, Hirochika R, Broker TR, Chow LT. A human papilloma virus type 11 transcript encoding an E1-E4 protein. *Virology*. 1987;159(2):433-9. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90482-X](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(87)90482-X).
37. Dollard SC, Wilson JL, Demeter LM, Bonnez W, Reichman RC, Broker TR, et al. Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures. *Off Genes Dev*. 1992;6(7):1131-42. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.6.7.1131>.
38. Rapp B, Pawellek A, Kraetzer F, Schaefer M, May C, Purdie K, et al. Cell-type-specific separate regulation of the E6 and E7 promoters of human papillomavirus type 6a by the viral transcription factor E2. *J Virol*. 1997;71(9):6956-66.
39. Ifner T, Oft M, Böhm S, Wilczynski SP, Pfister H. Transcription of the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 in anogenital condylomata is restricted to undifferentiated cell layers of the epithelium. *J Virol*. 1992;66(8):4639-46.
40. Taniguchi A, Kikuchi K, Nagata K, Yasumoto S. A cell-type-specific transcription enhancer of type 16 human papillomavirus (HPV 16)-P97 promoter is defined with HPV-associated cellular events in human epithelial cell lines. *Virology*. 1993;195(2):500-10. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1993.1401>.
41. Bernard HU. Controls in the papillomavirus life cycle. *FEMS Microbiol Immunol*. 1990;2(4):201-5. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb03520.x>.
42. Bernard HU. Regulatory elements in the viral genome. *Virology*. 2013;445(1-2):197-204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.viro.2013.04.035>.
43. García-Vallvé S, Iglesias-Rozas JR, Alonso A, Bravo IG. Different papillomaviruses have different repertoires of transcription factor binding sites: convergence and divergence in the upstream regulatory region. *BMC Evol Biol*. 2006;6:20. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-6-20>.
44. Soto D, Song C, McLaughlin-Drubin ME. Epigenetic Alterations in Human Papillomavirus-Associated Cancers. *Viruses*. 2017;9(9). pii: E248. <http://dx.doi.org/10.3390/v9090248>.
45. Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J*. 1994;13(22):5451-9.
46. Demeret C, Yaniv M, Thierry F. The E2 transcriptional repressor can compensate for Sp1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *J Virol*. 1994;68(11):7075-82.
47. Dostatni N, Lambert PF, Sousa R, Ham J, Howley PM, Yaniv M. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev*. 1991;5(9):1657-71. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.5.9.1657>.
48. Gloss B, Bernard HU, Seedorf K, Klock G. The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J*. 1987;6(12):3735-43.
49. Tan SH, Leong LE, Walker PA, Bernard HU. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J Virol*. 1994;68(10):6411-20.
50. Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M. The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol*. 1989;63(10):4317-24.
51. Cullen AP, Reid R, Campion M, Lörincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol*. 1991;65(2):606-12.
52. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*. 2004;64(11):3878-84. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0009>.
53. Ifner T, Haedicke-Jarbouli J, Wu SY, Chiang CM. Involvement of Brd4 in different steps of the papillomavirus life cycle. *Virus Res*. 2017;231:76-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.006>.
54. McPhillips MC, Oliveira JG, Spindler JE, Mitra R, McBride AA. Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *J Virol*. 2006;80(19):9530-43. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01105-06>.

55. Smith JA, White EA, Sowa ME, Powell ML, Ottinger M, Harper JW, et al. Genome-wide siRNA screen identifies SMCX, EP400, and Brd4 as E2-dependent regulators of human papillomavirus oncogene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(8):3752-7, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0914818107>.
56. Wu SY, Nin DS, Lee AY, Simanski S, Kodadek T, Chiang CM. BRD4 Phosphorylation Regulates HPV E2-Mediated Viral Transcription, Origin Replication, and Cellular MMP-9 Expression. *Cell Rep*. 2016;16(6):1733-48, <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.001>.
57. McKinney CC, Kim MJ, Chen D, McBride AA. Brd4 Activates Early Viral Transcription upon Human Papillomavirus 18 Infection of Primary Keratinocytes. *MBio*. 2016;7(6):e01644-16, <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01644-16>.
58. Stubenrauch F, Hummel M, Iftner T, Laimins LA. The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J Virol*. 2000;74(3):1178-86, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.74.3.1178-1186.2000>.
59. Lace MJ, Anson JR, Thomas GS, Turek LP, Haugen TH. The E8-E2 gene product of human papillomavirus type 16 represses early transcription and replication but is dispensable for viral plasmid persistence in keratinocytes. *J Virol*. 2008;82(21):10841-53, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01481-08>.
60. Stubenrauch F, Zobel T, Iftner T. The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol*. 2001;75(9):4139-49, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.9.4139-4149.2001>.
61. Dreer M, van de Poel S, Stubenrauch F. Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8⁺E2 protein. *Virus Res*. 2017;231:96-102, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.005>.
62. Dreer M, Fertey J, van de Poel S, Straub E, Madiung J, Macek B, et al. Interaction of NCOR/SMRT Repressor Complexes with Papillomavirus E8⁺E2C Proteins Inhibits Viral Replication. *PLoS Pathog*. 2016;12(4):e005556, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005556>.
63. Paris C, Pentland I, Groves I, Roberts DC, Powis SJ, Coleman N, et al. CCCTC-binding factor recruitment to the early region of the human papillomavirus 18 genome regulates viral oncogene expression. *J Virol*. 2015;89(9):4770-85, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00097-15>.
64. Ai W, Narahari J, Roman A, Yin yang 1 negatively regulates the differentiation-specific E1 promoter of human papillomavirus type 6. *J Virol*. 2000;74(11):5198-205, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.74.11.5198-5205.2000>.
65. Bauknecht T, Angel P, Royer HD, zur Hausen H. Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J*. 1992;11(12):4607-17.
66. Chan WK, Klock G, Bernard HU. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol*. 1989;63(8):3261-9.
67. Mitrani-Rosenbaum S, Tsvieli R, Tur-Kaspa R. Oestrogen stimulates differential transcription of human papillomavirus type 16 in SiHa cervical carcinoma cells. *J Gen Virol*. 1989;70(Pt 8):2227-32, <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-70-8-2227>.
68. Park JS, Rhyu JW, Kim CJ, Kim HS, Lee SY, Kwon YI, et al. Neoplastic change of squamo-columnar junction in uterine cervix and vaginal epithelium by exogenous estrogen in hpv-18 URR E6/E7 transgenic mice. *Gynecol Oncol*. 2003;89(3):360-8, [http://dx.doi.org/10.1016/S0090-8258\(02\)00106-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0090-8258(02)00106-3).
69. Peña N, Carrillo D, Muñoz JP, Chnaiderman J, Urzúa U, León O, et al. Tobacco smoke activates human papillomavirus 16 p97 promoter and cooperates with high-risk E6/E7 for oxidative DNA damage in lung cells. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123029, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123029>.
70. Stükel W, Bernard HU. The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. *J Virol*. 1999;73(3):1918-30.
71. Wooldridge TR, Laimins LA. Regulation of human papillomavirus type 31 gene expression during the differentiation-dependent life cycle through histone modifications and transcription factor binding. *Virology*. 2008;374(2):371-80, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2007.12.011>.
72. Fernandez AF, Esteller M. Viral epigenomes in human tumorigenesis. *Oncogene*. 2010;29(10):1405-20, <http://dx.doi.org/10.1038/ncr2009.517>.
73. Kim K, Garner-Hamrick PA, Fisher C, Lee D, Lambert PF. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol*. 2003;77(23):12450-9, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.77.23.12450-12459.2003>.
74. Chaiwongkot A, Vinokurova S, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kleeboew P, et al. Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *Int J Cancer*. 2013;132(9):2087-94, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.27906>.
75. Leung TW, Liu SS, Leung RC, Chu MM, Cheung AN, Ngan HY. HPV 16 E2 binding sites 1 and 2 become more methylated than E2 binding site 4 during cervical carcinogenesis. *J Med Virol*. 2015;87(6):1022-33, <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.24129>.
76. Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PLoS One*. 2011;6(9):e24451, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024451>.
77. Carson A, Khan SA. Characterization of transcription factor binding to human papillomavirus type 16 DNA during cellular differentiation. *J Virol*. 2006;80(9):4356-62, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.80.9.4356-4362.2006>.
78. Gunasekharan V, Haché G, Laimins L. Differentiation-dependent changes in levels of C/EBP β repressors and activators regulate human papillomavirus type 31 late gene expression. *J Virol*. 2012;86(9):5393-8, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.07239-11>.
79. Songock WK, Scott ML, Bodily JM. Regulation of the human papillomavirus type 16 late promoter by transcriptional elongation. *Virology*. 2017;507:179-91, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2017.04.021>.
80. Bodily JM, Henningan C, Wrobel GA, Rodriguez CM. Regulation of the human papillomavirus type 16 late promoter by E7 and the cell cycle. *Virology*. 2013;443(1):11-9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.033>.
81. Karpathiou G, Da Cruz V, Casteillo F, Mobarki M, Dumollard JM, Chaleur C, et al. FOXA1 in HPV associated carcinomas: Its expression in carcinomas of the head and neck and of the uterine cervix. *Exp Mol Pathol*. 2017;102(2):230-6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.02.010>.
82. Martínez-Ramírez I, Del-Castillo-Falconi V, Mitre-Aguilar IB, Amador-Molina A, Carrillo-García A, Langley E, et al. SOX2 as a New Regulator of HPV16 Transcription. *Viruses*. 2017;9(7):pii:E175, <http://dx.doi.org/10.3390/v9070175>.
83. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>.
84. Sichero L, Franco EL, Villa LL. Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J Infect Dis*. 2005;191(5):739-42, <http://dx.doi.org/10.1086/427825>.
85. Romanczuk H, Villa LL, Schlegel R, Howley PM. The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18. *J Virol*. 1991;65(5):2739-44.
86. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*. 1997;71(3):2463-72.
87. Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*. 1999;80(Pt 4):1035-43, <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-80-4-1035>.
88. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(17):1325-30, <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/93.17.1325>.
89. Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME, et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer*. 2001;84(9):1219-26, <http://dx.doi.org/10.1054/bjoc.2001.1779>.
90. Junes-Gill K, Sichero L, Maciag PC, Mello W, Noronha V, Villa LL. Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil. *J Med Virol*. 2008;80(9):1639-45, <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21238>.
91. Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, Hildesheim A, et al. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res*. 2010;70(8):3159-69, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4179>.
92. Sichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer*. 2007;120(8):1763-8, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.22481>.
93. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 12):2959-68, <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-2959>.
94. Xi LF, Koutsky LA, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Winer RL, et al. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(1):4-10, <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0670>.
95. Zuna RE, Tuller E, Wentzensen N, Mathews C, Allen RA, Shanesmith R, et al. HPV16 variant lineage, clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer. *Infect Agent Cancer*. 2011;6:19, <http://dx.doi.org/10.1186/1750-9378-6-19>.
96. Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 8):1975-81.
97. Hubert WG. Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the

- viral life cycle. *J Virol.* 2005;79(10):5914-22, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.10.5914-5922.2005>.
98. Lillycrop KA, Budrahan VS, Lakin ND, Terrenghi G, Wood JN, Polak JM, et al. A novel POU family transcription factor is closely related to Bm-3 but has a distinct expression pattern in neuronal cells. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(19):5093-6, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/20.19.5093>.
99. Ndisang D, Budhram-Mahadeo V, Latchman DS. The Bm-3a transcription factor plays a critical role in regulating human papilloma virus gene expression and determining the growth characteristics of cervical cancer cells. *J Biol Chem.* 1999; 274(40):28521-7, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.40.28521>.
100. Ndisang D, Khan A, Lorenzato F, Sindos M, Singer A, Latchman DS. The cellular transcription factor Bm-3a and the smoking-related substance nicotine interact to regulate the activity of the HPV URR in the cervix. *Oncogene.* 2010;29(18):2701-11, <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.33>.
101. Raiol T, de Amorim RM, Galante P, Martins CR, Villa LL, Sichero L. HPV-58 molecular variants exhibit different transcriptional activity. *Intervirology.* 2011;54(3):146-50, <http://dx.doi.org/10.1159/000320199>.
102. Burk RD, Chen Z, Harari A, Smith BC, Koçan BJ, Maver PJ, et al. Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. *Acta Dermatovenereol Alp Panonica Adriat.* 2011;20(3):113-23.
103. Jelen MM, Chen Z, Koçan BJ, Burt FJ, Chan PK, Chouhy D, et al. Global genomic diversity of human papillomavirus 6 based on 724 isolates and 190 complete genome sequences. *J Virol.* 2014;88(13):7307-16, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00621-14>.
104. Jelen MM, Chen Z, Koçan BJ, Hošnjak L, Burt FJ, Chan PKS, et al. Global Genomic Diversity of Human Papillomavirus 11 Based on 433 Isolates and 78 Complete Genome Sequences. *J Virol.* 2016;90(11):5503-13, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.03149-15>.
105. Measso do Bonfim C, Simão Sobrinho J, Lacerda Nogueira R, Salgado Kupper D, Cardoso Pereira Valera F, Lacerda Nogueira M, et al. Differences in Transcriptional Activity of Human Papillomavirus Type 6 Molecular Variants in Recurrent Respiratory Papillomatosis. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132325, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0132325>.
106. Flores-Díaz E, Sereday KA, Ferreira S, Sirak B, Sobrinho JS, Baggio ML, et al. HPV-11 variability, persistence and progression to genital warts in men: the HIM study. *J Gen Virol.* 2017;98(9):2339-42, <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.000896>.
107. Gáll T, Kis A, Tatár TZ, Kardos G, Gergely L, Szarka K. Genomic differences in the background of different severity in juvenile-onset respiratory papillomatosis associated with human papillomavirus type 11. *Med Microbiol Immunol.* 2013;202(5):353-63, <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-013-0297-y>.
108. Yuan CH, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. *Viruses.* 2012;4(12):3831-50, <http://dx.doi.org/10.3390/v4123831>.
109. Gaykalova DA, Manola JB, Ozawa H, Zizkova V, Morton K, Bishop JA, et al. NF-κB and stat3 transcription factor signatures differentiate HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2015;137(8):1879-89, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29558>.
110. Verma G, Vishnoi K, Tyagi A, Jadli M, Singh T, Goel A, et al. Characterization of key transcription factors as molecular signatures of HPV-positive and HPV-negative oral cancers. *Cancer Med.* 2017;6(3):591-604, <http://dx.doi.org/10.1002/cam4.983>.
111. Zhang W, Wu X, Hu L, Ma Y, Xiu Z, Huang B, et al. Overexpression of Human Papillomavirus Type 16 Oncoproteins Enhances Epithelial-Mesenchymal Transition via STAT3 Signaling Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Oncol Res.* 2017;25(5):843-52, <http://dx.doi.org/10.3727/096504016X14813880882288>.