

ALINE LOPES RIBEIRO

**Análise da atividade transcricional de HPV-18 durante a diferenciação
celular**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Programa de Oncologia

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

São Paulo

2022

ALINE LOPES RIBEIRO

**Análise da atividade transcricional de HPV-18 durante a diferenciação
celular**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Programa de Oncologia

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

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ribeiro, Aline Lopes
Análise da atividade transcricional de HPV-18
durante a diferenciação celular / Aline Lopes
Ribeiro. -- São Paulo, 2022.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientadora: Laura Cristina Sichero Vettorazzo.

Descritores: 1.Papillomavirus humano 18
2.Diferenciação celular 3.Estágios do ciclo de vida
4.Expressão gênica 5.Fatores de transcrição
6.Queratinócitos 7.Transcrição viral

USP/FM/DBD-068/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À minha mãe, que com paciência e amor, me apoiou durante todo este caminho.

Aos pesquisadores que se dedicam com empenho e resiliência aos seus propósitos de contribuir para o progresso da ciência.

ΕΠΪΓΡΑΦΕ

*"If I have seen further, it is by standing upon
the shoulders of giants"*

Isaac Newton, 1675

AGRADECIMENTOS

Foram muitos desafios durante esta jornada e todos foram superados graças ao apoio de muitos.

Agradeço à minha família que me deu o suporte e estímulo a sempre continuar. Em especial, à minha mãe, que em todos os momentos buscou compreender a importância da dedicação com meus estudos e minha carreira. À minha tia Mara, minha luz e guia, a quem devo tudo que sou. À minha tia-irmã Fernanda, que sempre transmite sua admiração pelo meu trabalho e, assim, me faz acreditar mais em mim também.

Agradeço ao Rafael Lopes pela grande prova de apoio e respeito aos meus sonhos durante períodos tão difíceis como os que passamos. Te agradeço pela nossa história e tudo que temos a construir juntos.

À minha orientadora, Laura Sicheo, pela sua extraordinária capacidade de compreender as individualidades de cada aluno, estimular que crescamos em nossas carreiras de maneira totalmente altruísta e por investir em nossas ideias. Sua dedicação com o grupo e com a pesquisa é única e sou muito grata por ter tido a oportunidade de conviver com você. Agradeço imensamente todas as discussões científicas e não científicas e por acreditar em mim.

À Dra Luísa pelo grande privilégio de acompanhar tão de perto sua genialidade e sua humildade em receber com tanto carinho a todos na grande família HPV. Aos colegas do grupo HPV, em especial, a Rafaella que contribuiu com muita dedicação com os ensaios de imuno-histoquímica.

Sou muito grata pelas amizades que ganhei durante esses anos. À minha sis, Valéria, por ter feito taaaanto por mim incondicionalmente e por ser uma pessoa tão pura e incrível. Me ajudou não só neste trabalho, mas em tantos outros aspectos da minha vida. À Amanda, por ser a melhor companheira de congressos, pela sua amizade, por trazer um brilho e alegria a nossa rotina. À Emily por sempre estar disposta a ajudar e pelos momentos divertidos que tivemos. À Milena, por ser tão doce e agradável a sua presença no lab.

Ao João Simão por seu coração tão generoso, que sempre nos ajuda prontamente no que for. Se importa se estamos estressadas, se temos algum problema pessoal e até se preocupa se almoçamos. Ele faz o ambiente ser muito mais leve e divertido sempre. À Neide Ferreira, pelo seu trabalho tão primoroso com o laboratório e por ouvir tantos desabafos.

Ao Dr. Massimo Tommasino e seu grupo ICB por cada dia que pude conviver e ter essa incrível experiência. Agradeço por ter conhecido esse que é um dos maiores nomes da pesquisa em HPV do mundo e poder apreciar de perto seu brilhantismo como cientista, sua generosidade e grandeza. Agradeço também a todos os colegas que conheci na IARC, em especial, ao Neimar.

À Allini Maфра que foi minha família durante quase dois anos. Me acolheu e me ofereceu toda sua amizade, carinho e apoio. Foi a melhor companhia de momentos tão inesquecíveis. Graças a você superei tantos desafios durante este período.

Agradeço a todos os colegas, orientadores e funcionários do CTO que tive o prazer de conhecer e que compõe essa importante engrenagem em prol do avanço na pesquisa em câncer. Às queridas secretárias da pós-graduação em Oncologia que tanto nos auxiliam durante todo esse processo, Débora, Raquel e Luciene.

A todos os profissionais do ICESP que, não somente contribuem para manter a incrível estrutura que nos possibilita conduzir nossos trabalhos, mas também foram fundamentais quando precisei do recurso na posição de filha de uma paciente. Deixo meu depoimento em agradecimento ao atendimento excelente que minha mãe recebeu durante seu tratamento.

À FAPESP, fundação de amparo a pesquisa, pelo apoio financeiro que possibilitou tantos avanços na minha carreira e na minha maturidade científica.

Aos membros da banca por terem aceitado ler e discutir este trabalho e por fazer parte desta importante etapa da minha formação profissional.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	
1. RESUMO	14
2. ABSTRACT	15
3. INTRODUÇÃO	
3.1. HPV E CÂNCER	16
3.2. ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO HPV E CICLO DE VIDA	17
3.3. ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DOS HPVS	19
4. OBJETIVOS	23
5. METODOLOGIA	24
6. RESULTADOS	33
7. DISCUSSÃO	62
8. CONCLUSÕES	
CAPÍTULO II	
1. ABSTRACT	74
2. INTRODUCTION	
2.1. CLINICAL RELEVANCE OF BETA-HPVS	75
2.2. EVER 1/ 2 AND THEIR ROLE IN HPV-INFECTED KERATINOCYTES	76
2.3. SIGNIFICANCE	77
3. AIMS	79
4. METHODOLOGY	80
5. RESULTS	83
6. DISCUSSION	89
CAPÍTULO III	
1. ABSTRACT	93
2. INTRODUCTION	94
3. METHODOLOGY	97
4. RESULTS	102
5. DISCUSSION	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXO I	130
SÚMULA CURRICULAR	131
MANUSCRITO	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADR-1	Alcohol dehydrogenase II synthesis regulator 1
AFP-1	Alpha-fetoprotein 1
AP-1	Activator protein 1
AP-3	Activator protein 3
ARE	Antioxidant responsive element
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
bp	Pares de bases
cBCC	Cutaneous basal cell carcinoma
cDNA	DNA complementar
CEA	Carcinoembryonic antigen
ChIP	Imunoprecipitação de cromatina
cSCC	Cutaneous squamous cell carcinomas
Ct	Cycle threshold
CTCF	CCCTC-binding factor
DAB	Diaminobenzidina
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EGF	Epidermal growth factor
EGR	Early growth response
EGR-1	Early growth response 1
EMSA	Ensaio do retardo da mobilidade eletroforética
EPB	Bovine pituitary extract
ER	Endoplasmic reticulum
EV	Epidermodysplasia verruciformis
EVpt4	EV patient cell line 4
EVpt5	EV patient cell line 5
FOXI1	Forkhead box protein I1
FT, TF	Fator(es) de transcrição
GAPDH	Gene que codifica a gliceraldeído desidrogenase
GATA-1	GATA binding protein 1
GATA-1/2	GATA binding protein 1/2
GATA-2	GATA binding protein 2
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor 1
HK 38E6E7	Human foreskin keratinocytes immortalized with HPV-38 E6 and E7
HK 18E6/E7	Human foreskin keratinocytes immortalized with HPV-18 E6 and E7
HMG	High mobility group
HOXD-8/9/10	Homeobox D 8/9/10
HPV	Papilomavírus humano
hTERT HK	Human keratinocytes expressing the hTERT gene
IARC	International Agency for Research on Cancer
IARC	International agency for research on cancer

IB	Immunoblotting
ISRE	Interferon-sensitive response element
KSFM	Keratinocyte serum-free medium
LCR	Região longa de controle
MAF	Musculoaponeurotic fibrosarcoma gene
MARE	Maf Recognition Elements
MBP-1	c-myc promoter binding protein 1
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NF-E2	Nuclear Factor Erythroid 2
ORF	Fase aberta de leitura
p53	Proteína supressora de tumor p53
PAX-4	Paired box 4
PAX-6	Paired box 6
PAX-8	Paired box 8
PBS	Solução salina de tampão de fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PHK	Queratinócitos primários humanos
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Sp-1	Specificity Protein 1
TBP	TATA-binding protein
TEF1	Transcriptional enhancer factor 1
TFIID	transcription factor polymerase II D
Thy-1BP	Thy-1 binding protein
UA	unidades arbitrarias
WT1	Wilms' Tumor 1
XBP-1	X-box binding protein 1
ZnT-1	Zinc transporter-1 protein

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

CAPÍTULO I	
Tabela 1: Iniciadores utilizados para análise do ChIP	27
Tabela 2: Iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real	28
Tabela 3: Sítios putativos de ligação na LCR de HPV-18 dos fatores de transcrição	44
Figura 1: Genoma e ciclo de vida viral	19
Figura 2. Modelo de diferenciação das células HaCaT: alterações morfológicas.	34
Figura 3. Modelo de diferenciação das células HaCaT: painel de marcadores de diferenciação celular.	35
Figura 4. Avaliação da eficiência de extração das proteínas nucleares das células HaCaT diferenciadas e não diferenciadas.	36
Figura 5. Ensaio de interação proteína/DNA.	38
Figura 6. Diagrama de Venn representando os fatores de transcrição expressos em células HaCaT diferenciadas e não diferenciadas.	39
Figura 7. Análise comparativa dos níveis dos fatores de transcrição detectados nas células não diferenciadas e diferenciadas.	40
Figura 8. Interface do banco de dados TRANSFAC.	41
Figura 9. Fluxograma das etapas até a escolha dos FTs.	43
Figura 10. Localizações dos sítios putativos de ligação dos FTs à sequência nucleotídica da LCR de HPV-18.	45
Figura 11. Confirmação da ligação dos fatores de transcrição à LCR de HPV-18.	47
Figura 12. Verificação da superexpressão dos FTs.	49
Figura 13. Impacto dos FTs sobre a atividade transcricional do promotor precoce do HPV-18.	50
Figura 14. Atividade basal do promotor precoce de HPV-18 em células HaCaT não diferenciadas e diferenciadas.	52
Figura 15. Impacto da expressão dos FTs sobre atividade transcricional de HPV-18 em células HaCaT não diferenciadas e diferenciadas.	53
Figura 16. Efeito da expressão ectópica dos FTs na expressão dos oncogenes E6 e E7 nas linhagens transformadas.	55
Figura 17. Nível de expressão basal dos FTs em diferentes linhagens celulares.	57
Figura 18. Investigação dos níveis de mRNA dos FTs em relação a presença ou ausência das oncoproteínas.	58
Figura 19. Avaliação da expressão dos FTs ao longo das camadas do epitélio estratificado.	60

Figura 20. Avaliação do padrão de metilação do promotor precoce de HPV-18 durante a diferenciação.	61
CAPÍTULO 2	
Table 1: Target sequence information for CRISPR/EVER1 and CRISPR/EVER2	80
Table 2: qPCR primers sequence information	81
Figure 1. The EVER-complex knockdown and overexpression.	84
Figure 2. CIB1 expression in keratinocytes with knockdown or overexpression of EVER1 or EVER2.	85
Figure 3. Effect of EVER1/2 upon HPV-38 transcriptional activity.	86
Figure 4. HPV-5, 38, and 49 transcriptional activities in EV patient's cell lines.	87
Figure 5. HPV-5, 38, and 49 transcriptional activities in hTERT HKs and hTERT EVpt4 cells after UV irradiation.	88
CAPÍTULO 3	
Table 1: Primers used for deletion constructs	97
Table 2: Primers used for probes design	100
Figure 1. Ectopically expressed c-Jun and p53 strongly activate the HPV-38 promoter.	102
Figure 2. Ectopically expressed c-Jun and p53 activates HPV-38 promoter, but not HPV-5 and 49 promoters	103
Figure 3. Deletion from the region between nt7194 and nt7252 led to a significant decrease in the activation by c-Jun and p53.	105
Figure 4. c-Jun and p53 binding to the LCR is enriched in 38HKs.	106
Figure 5. c-Jun and p53 specific binding within the HPV-38 LCR.	107
Figure 6. c-Jun and p53 share common binding sites within the HPV-38 LCR.	109

CAPÍTULO I

Análise da atividade transcricional de HPV-18 durante a diferenciação celular

1. RESUMO

Ribeiro AL. *Análise da atividade transcricional de HPV-18 durante a diferenciação celular* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

O ciclo de vida do papilomavírus humano (HPV) está intimamente ligado ao programa de diferenciação dos queratinócitos. O repertório de fatores de transcrição (FTs) expressos na célula hospedeira tem um papel crucial na coordenação da expressão gênica viral nas diferentes camadas do epitélio escamoso estratificado. Por sua vez, a expressão de oncogenes virais modifica o ambiente celular culminando, em última análise, na transformação tumorigênica da célula. O objetivo principal desse estudo foi investigar o papel de diferentes FTs durante o ciclo de vida viral, de modo a melhor elucidar as interações entre a célula hospedeira e o vírus. Inicialmente, comparamos o nível de 345 FTs em queratinócitos não diferenciados e diferenciados. Foram encontrados níveis diferenciais de 30 FTs. Em seguida, levando-se em consideração que os FTs capazes de se ligar diretamente à região longa de controle (LCR) têm uma influência potencialmente mais preponderante sobre a regulação da transcrição viral, procurou-se sítios de ligação putativos para os 30 FTs na LCR de HPV-18 utilizando ferramentas *in silico*. Em seguida, a confirmação da ligação de FTs selecionados foi realizada com ensaios qPCR-ChIP. Assim, foi possível identificar a ligação de quatro FTs à LCR: HMGB1, PAX-6, FOXI1 e NF-E2. Prosseguiu-se com uma abordagem funcional que revelou que a co-transfecção transitória de cada um desses quatro FTs com um construto de pGL3-18LCR foi capaz de influenciar na atividade transcricional do promotor precoce do HPV-18 de maneira dose-dependente. Além disso, foi observada uma regulação diferencial desses FTs sobre a atividade do promotor de acordo com estado de diferenciação dos queratinócitos. Finalmente, foi demonstrado que a expressão das oncoproteínas do HPV-18 leva ao aumento dos níveis desses fatores. Além disso, a expressão dos FTs se mostrou variável de acordo com a transformação celular. Portanto, identificou-se quatro novos FTs celulares que podem ser potencialmente relevantes para a regulação da transcrição do HPV durante a diferenciação e transformação maligna. Expandir esse conhecimento contribui para melhor compreender a biologia e a patogênese das doenças associadas ao HPV-18.

Descritores: Papilomavírus humano 18; Diferenciação celular; Estágios do ciclo de vida; Expressão gênica; Fatores de transcrição; Genes virais; Queratinócitos; Transcrição viral.

2. ABSTRACT

Ribeiro AL. *Analysis of HPV-18 transcriptional activity during cell differentiation* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.’

The human papillomavirus (HPV) life cycle is tightly linked to the keratinocyte’s differentiation program. The repertoire of transcription factors (TFs) expressed in the host cell has a crucial role in coordinating viral gene expression throughout different layers of the stratified squamous epithelium. In turn, the expression of viral oncogenes modifies the cellular environment culminating ultimately in cell tumorigenic transformation. The main purpose of this study was to better understand the functional role of the host TFs composition in assisting the virus to complete the life cycle during infection. First, we compared the level of 345 TFs in undifferentiated and differentiated keratinocytes and found the differential expression of 30 TFs. Since TFs that have binding sites within the viral long control region (LCR) have a potentially stronger influence on viral transcriptional regulation, we search for putative binding sites for the 30 TFs within HPV-18 LCR with in silico tools and then confirmed the binding of selected TFs with qPCR-ChiP assays. Therefore, we identified four novel TFs binding sites within the LCR: HMGB1, PAX-6, FOXI1 e NF-E2. Further, the functional approach revealed that the transient co-transfection of each of these four TFs with a construct of pGL3-18LCR was able to impact the HPV-18 early promoter in a dose-dependent manner. In addition, we observed a differential regulation upon the promoter activity regarding the differentiation state of the keratinocytes. Finally, it was demonstrated that the HPV-18 oncoproteins expression leads to an increase in the levels of these factors. Additionally, their expression is variable according to the cell transformation. Therefore, we identified four new cellular TFs that may be potentially relevant for the regulation of HPV transcription during differentiation and malignant transformation. Expanding this knowledge contributes to a better understanding of the biology and pathogenesis of diseases associated with HPV-18.

Descriptors: Human papillomavirus 18; Cell differentiation; Life cycle stages; Gene expression.; Transcription factors; Genes, viral; Keratinocytes; Viral transcription.

3. INTRODUÇÃO

3.1. HPV e câncer

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns, com uma estimativa de 291 milhões de mulheres HPV-positivas em todo o mundo em 2007 (DE SANJOSÉ et al., 2007). Entre as mulheres com citologia do colo do útero normal, a prevalência de HPV encontrada no mundo foi de 9,9% em 2019 (BRUNI et al., 2019). No Brasil, o recente estudo “POP-Brasil-Estudo Epidemiológico sobre a Prevalência Nacional de Infecção pelo HPV” revelou uma prevalência de 53% do HPV em pessoas com idade entre 16 e 25 anos e vida sexual ativa (WENDLAND et al., 2020).

A maioria das infecções por HPV não causa sintomas e é eliminada dentro de 12 a 24 meses após o contato com o vírus. Apenas uma pequena fração, cerca de 10-20% das infecções persistem, levando à progressão da doença (SCHIFFMAN et al., 2007). O HPV é diagnosticado em mais de 90% de todos os cânceres do colo do útero e em uma proporção significativa de cânceres anogenitais (vulva, vagina, pênis e ânus) e de cabeça e pescoço, principalmente da orofaringe (KOMBE KOMBE et al., 2020; SERRANO et al., 2018). A infecção pelo HPV também está associada ao desenvolvimento de outras lesões cutâneas e mucosas, como verrugas e papilomas benignos (EGAWA; DOORBAR, 2017). Estima-se que o HPV esteja associado ao desenvolvimento de aproximadamente 4,5% (640.000) do total de novos casos de câncer por ano (PLUMMER et al., 2016).

Até o momento, mais de 200 tipos de HPVs tiveram seus genomas isolados e completamente descritos (VAN DOORSLAER et al., 2011). Aproximadamente, 40 tipos de HPVs são capazes de infectar a mucosa anogenital, podendo ser classificados em HPVs de alto e baixo risco oncogênico com base na sua associação com o desenvolvimento de câncer do colo do útero (BOUVARD et al., 2009).

Dentre os 13 tipos de HPVs de alto risco, os clinicamente mais relevantes são o HPV-16 e HPV-18, cujas prevalências somadas abrangem cerca de 70% dos tumores do colo uterino. O HPV-18 é o segundo mais prevalente, responsável por aproximadamente 12%

dos carcinomas de células escamosas e 35% dos adenocarcinomas do colo do útero (WALBOOMERS et al., 1999). Embora ainda em debate, foi sugerido que a infecção por HPV-18 possa estar associada com uma forma mais agressiva da neoplasia intra-epitelial cervical, adenocarcinoma e carcinoma adenoescamoso, além de maior taxa de integração do genoma, e maior probabilidade de recorrência do tumor e metástase no linfonodo (ARENDS et al., 1993; revisado por IARC, 2012).

3.2. Organização do genoma do HPV e ciclo de vida

Os HPVs são vírus relativamente pequenos (~55 nm de diâmetro), não envelopados, e com o genoma circular de fita dupla com aproximadamente 8.000 pares de bases (bp). Brevemente, o genoma viral é dividido fisicamente em 3 regiões: precoce, tardia e LCR. A região precoce tem como função regular a transcrição e replicação do DNA (*E1*, *E2*), assim como ativar vias essenciais para que ocorra ciclo de vida produtivo e para a transformação (*E5*, *E6* e *E7*); já os genes *L1* e *L2* da região tardia, transcrevem as proteínas principal e secundária do capsídeo, respectivamente (revisado por IARC, 2012). A região não codificante entre os genes *L1* e *E6*, é denominada de LCR (*Long Control Region*) e abrange aproximadamente 10% do genoma viral (**figura 1a**).

O ciclo de vida do HPV é dependente do processo de diferenciação terminal das suas célula-alvo no epitélio – os queratinócitos. O ciclo começa com a infecção das células do compartimento basal indiferenciado do epitélio por meio de microtraumas. Em um epitélio estratificado normal, apenas as células basais inferiores do epitélio proliferam. Essas células podem se dividir simetricamente, produzindo mais células basais; ou assimetricamente, em que uma das células-filhas deixa a camada basal e inicia o processo de diferenciação. Neste caso, as células-filhas adquirem propriedades mais especializadas e se diferenciam conforme atingem as camadas mais superficiais, até finalmente serem liberadas na superfície como parte do processo de renovação tecidual (WATT, 1989). Os HPVs exploram esse programa de diferenciação para auxiliar a replicação do seu genoma com mínima ativação da resposta imune do hospedeiro, promovendo maior produtividade do vírus (STANLEY, 2008).

Após a infecção inicial das células basais, o promotor precoce torna-se ativo e culmina na expressão da helicase viral E1 e na expressão de E2. Essas proteínas, então, facilitam o estabelecimento da replicação gerando rapidamente os epissomos virais para 50-100 cópias por célula (FRATTINI; LIM; LAIMINS, 1996; OZBUN; MEYERS, 1997). Nessas células indiferenciadas, os genomas virais são mantidos em baixo número de cópias. Contudo, à medida que essas células se diferenciam, a fase produtiva do ciclo de vida viral é induzida e leva à ativação do promotor tardio. Assim, ocorre a expressão de genes virais tardios (*E4*, *E5*, *L1*, *L2*), bem como a expressão de altos níveis de E1 e E2, que amplificam o genoma viral para milhares de cópias por célula (OZBUN; MEYERS, 1998; RAVNAN et al., 1992). A montagem e liberação das partículas virais são restritas à camada mais superficial do epitélio, assegurando que as proteínas imunogênicas do capsídeo L1 e L2 sejam expressas apenas em células suprabasais altamente diferenciadas (PINIDIS et al., 2016) (**figura 1b**).

As células das camadas basais também expressam as oncoproteínas E6 e E7. Enquanto as células epiteliais normais interrompem o ciclo celular após a diferenciação, essas proteínas virais desregulam os pontos de verificação e conduzem as células em diferenciação de volta ao ciclo celular (VATS et al., 2021). Os principais alvos de E6 e E7 são as proteínas codificadas pelos genes supressores de tumores p53 e pRb, respectivamente. E7 promove a degradação de pRb, levando a atividade aberrante da família de fatores de transcrição (FT) E2F que, por sua vez, promove a reentrada do ciclo celular na fase S. Em células não infectadas, a reativação não programada do ciclo celular leva ao aumento da atividade de p53, que pode resultar na parada do ciclo celular ou em apoptose. No entanto, E6 impede esses dois desfechos direcionando p53 para degradação (WISE-DRAPER; WELLS, 2008). Assim, a combinação desses eventos desregula amplamente a proliferação celular, a maquinaria apoptótica, além de retardar o programa de diferenciação do queratinócito infectado, criando um ambiente favorável para a replicação do DNA viral. Sendo assim, a desregulação de diversas redes do controle de importantes processos celulares durante uma infecção persistente pode culminar no desenvolvimento tumoral (MITTAL; BANKS, 2017).

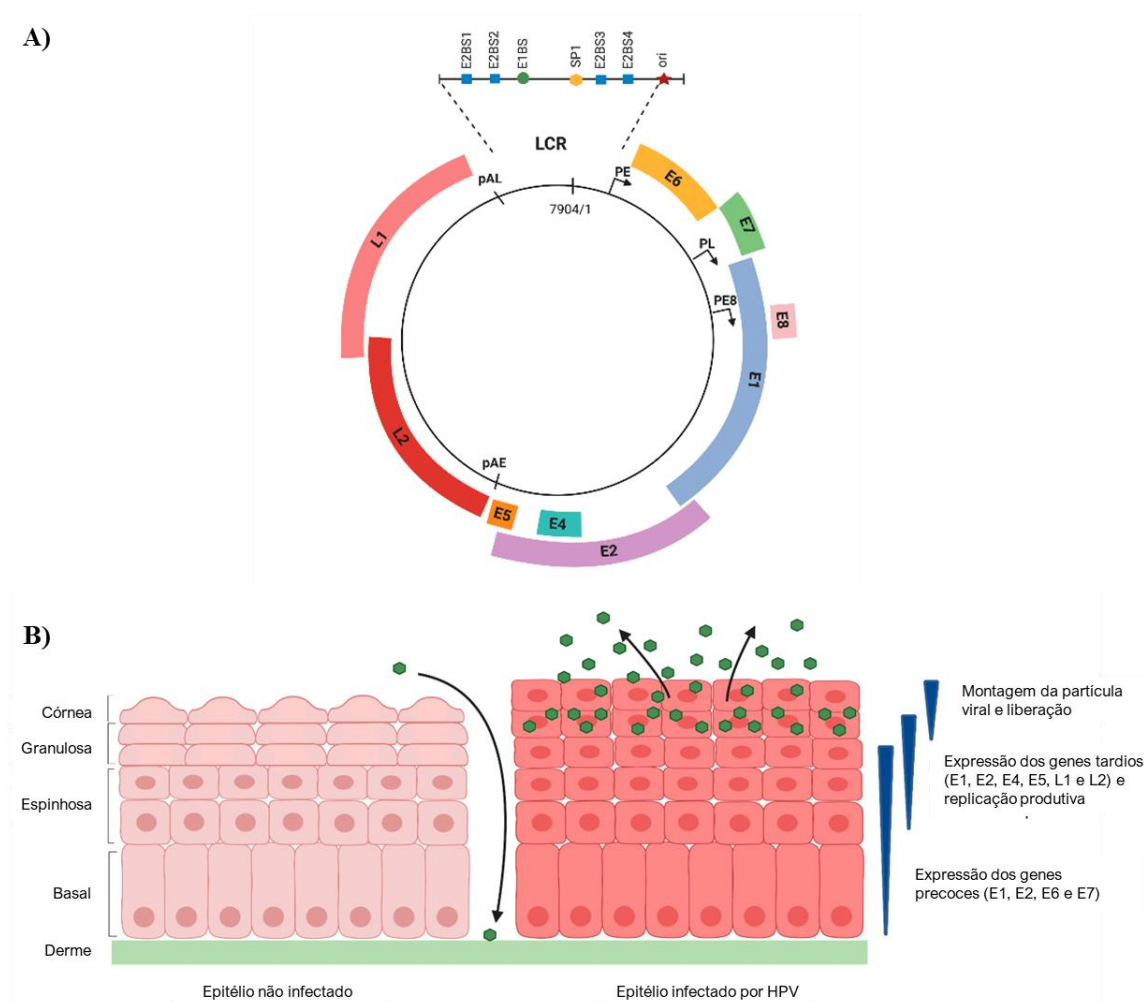


Figura 1. Genoma e ciclo de vida viral (A) Organização do genoma dos HPVs de alto risco. **(B)** Sequência da expressão gênica viral ao longo das camadas de diferenciação dos queratinócitos no epitélio estratificado do hospedeiro. PE: Promotor precoce e PL: promotor tardio. Adaptado de (CID-ARREGUI, 2009).

3.3. Atividade transcricional dos HPVs

A sincronização entre o ciclo de vida do HPV e o programa de diferenciação do epitélio estratificado hospedeiro depende de uma complexa coordenação entre a ativação da expressão gênica precoce e tardia do vírus. O promotor precoce, denominado P105 no HPV-18, regula a expressão das proteínas precoces, incluindo as oncoproteínas E6 e E7 (WANG et al., 2011). Apesar dos avanços na compreensão do ciclo de vida do HPV,

ainda há uma clara necessidade de melhor compreender como ocorre a importante interação entre o HPV e as proteínas da célula hospedeira.

A regulação da expressão do genoma do HPV é complexa e controlada por fatores de transcrição virais e celulares. Esses fatores, se ligam em sequências específicas da LCR e controlam a atividade dos promotores virais (GARCÍA-VALLVÉ et al., 2006). Um importante FT viral, a proteína E2, é responsável pela regulação intra-genômica da transcrição, podendo ter um papel importante na ativação e supressão da mesma (revisado por BERNARD, 2002; THIERRY et al., 1987). Existem quatro sítios de ligação a E2 nos HPVs genitais em posições conservadas; dois destes sítios estão a cerca de 50 pb a montante da posição de início da transcrição, e os outros dois sítios estão a 150 e 550 pb a montante do início da transcrição (revisado por BERNARD, 2002). O terceiro sítio de ligação a E2 se sobrepõe à sequência de reconhecimento da proteína celular SP1, e o quarto sítio à TATA *box*, e desta forma compete por ligação à sequência na LCR com o FT celular TFIID (fator de transcrição II D), um dos fatores de transcrição que constituem o complexo de iniciação da RNA-polimerase II (TAN et al., 1994). A ocupação diferencial destes sítios regula os níveis de expressão de E6/E7, o que propicia a transformação celular.

Ademais, fatores da maquinaria de transcrição da célula também são capazes de se ligar na região central da LCR, regulando a transcrição dos genes precoces a partir do promotor localizado na extremidade 3' terminal da LCR determinando um único transcrito policistrônico iniciado em E6 (revisado por Bernard, 2002). Os promotores P97 e P105 são os principais promotores precoces de HPV-16 e HPV-18, respectivamente, além de serem os mais bem estudados. Os transcritos que se iniciam em E6 são diferencialmente editados codificando, assim, todas as fases abertas de leitura (ORFs) (STEGER; REHTANZ; SCHNABEL, 2001).

Uma vez que os FTs se ligam aos elementos cis-reguladores na LCR, eles atuam modulando a transcrição dos genes virais, o que é determinante para limitar os tipos de células que o vírus pode infectar, bem como acoplar a expressão dos genes precoces e tardios com o programa de diferenciação do epitélio escamoso, modular a biologia do vírus em resposta aos hormônios e fatores de crescimento, afetar os níveis de expressão

gênica viral através de um controle de retro-alimentação finamente regulado, além de integrar a expressão gênica e replicação viral.

O estudo dos elementos reguladores dos papilomavírus progrediu rapidamente por cerca de 15 anos, iniciando no final dos anos 80, contudo o interesse diminuiu drasticamente na última década. Em consequência, a compreensão dos fenômenos fundamentais da regulação, tais como epitélio-especificidade e a sincronização do ciclo de vida viral ao programa de diferenciação do epitélio estratificado estão longe da maturidade.

Na última década, a tecnologia de arranjos permitiu identificar mais FTs que se ligam à sequência promotora viral. CARSON & KHAN, 2006a 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. Cabe ressaltar que a metodologia empregada foi capaz de identificar diferentes FTs já descritos influenciar a expressão de HPVs, porém a maior parte das associações observadas foi inédita.

No nosso laboratório, uma abordagem abrangente analisou os efeitos funcionais de 704 diferentes FTs 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 sugeridos atuar sobre a LCR viral. Embora muitos destes FTs identificados pareçam agir por mecanismos indiretos, e não pela ligação direta à LCR viral, foram identificados sítios de ligação na LCR viral para um subconjunto destes moduladores potencialmente muito importantes da transcrição de HPV. Embora os estudos conduzidos por nós e por CARSON & KHAN, 2006a não sejam capazes de explicar os detalhes da regulação transcricional de HPV-16 e HPV-18, ambos claramente sugerem que muitos mecanismos mais complexos estão envolvidos do que os sugeridos pelas pesquisas anteriores à década de 1990 e que tinham como alvo menos de uma dúzia de FTs específicos (CARSON; KHAN, 2006b; SICHERO; SOBRINHO; VILLA, 2012). Ainda mais, até o momento muito pouco é conhecido sobre a influência de FTs específicos envolvidos no acoplamento do ciclo de vida viral ao programa de diferenciação do epitélio hospedeiro.

Em vista do exposto, elucidar a regulação da expressão dos genes precoces de HPV-18 no contexto das diferentes fases do ciclo de vida viral é fundamental para melhor compreender a biologia, patogênese, diagnóstico e manejo clínico das doenças associadas a este tipo viral.

4. OBJETIVOS

- Comparar o nível de 345 FTs em queratinócitos não diferenciados e diferenciados.
- Analisar *in silico* quais dos FTs diferencialmente presentes entre as duas condições testadas possuem sítios consenso na LCR de HPV-18.
- Confirmar *in vitro* se os FTs selecionados se ligam à LCR de HPV-18.
- Avaliar funcionalmente o impacto desses FTs na atividade transcricional do promotor precoce de HPV-18.
- Investigar o efeito dos FTs na atividade transcricional do promotor precoce de HPV-18 em células não diferenciadas e diferenciadas.
- Determinar a expressão dos FTs em diferentes linhagens de células HPV-18 positivas.
- Estudar o impacto da superexpressão dos FTs na expressão dos oncogenes *E6* e *E7*.
- Verificar se a expressão dos FTs é impactada pela presença das oncoproteínas *E6* e *E7*.
- Avaliar a expressão dos FTs em queratinócitos em diferentes estágios da diferenciação utilizando culturas organótípicas.
- Analisar o padrão de metilação da região proximal ao promotor precoce de HPV-18 durante a diferenciação.

5. METODOLOGIA

5.1. Cultivo celular

As células HaCaT proveniente do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) não-diferenciadas foram cultivadas em KSFM (*Keratinocyte Serum Free Medium*, Life Technologies, Califórnia, EUA) suplementado com EGF (fator de crescimento epidermal) e EPB (extrato de pituitária bovino). A fim de obter as células HaCaT no estado diferenciado, foi adicionada ao meio de cultivo uma solução de cloreto de cálcio (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) suficiente para obter a concentração final de 2,8 mM e o cultivo foi mantido nessas condições por até 5 dias.

O meio KSFM suplementado com EGF e EPB também foi utilizado para o cultivo da linhagem de células FK18, derivada de queratinócitos de prepúcio imortalizados com o genoma completo de HPV-18 (BARBOSA; SCHLEGEL, 1989); no cultivo da linhagem tumoral SW756, proveniente de carcinoma de células escamosas de colo uterino HPV-18 positiva (*American Type Culture Collection* – ATCC, Virgínia, EUA); e no cultivo das células PHK, queratinócitos humanos primários oriundos de prepúcio de recém-nascido (Clonetics, Nova Jersey, EUA).

A linhagem de células HF18NCO ou 18NCO, obtida a partir de queratinócitos humanos imortalizados com o genoma completo HPV-18, foi gentilmente cedida pelo Prof. Richard Schlegel, Centro Médico da Universidade de Georgetown, Washington, DC (BARBOSA; SCHLEGEL, 1989), e foi cultivada em meio “3 + 1”, consistindo de 3 partes, KSFM suplementado com EGF e EPB e 1 parte de DMEM (*Dulbecco’s Modified Eagle Medium*, Gibco/ThermoFisher, Massachusetts, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino.

As células HeLa, isoladas de adenocarcinoma de colo de útero HPV-18 positivo (*American Type Culture Collection* – ATCC, Virgínia, EUA), foram cultivadas em meio MEM (*Minimum Essential Media*, Gibco/ThermoFisher, Massachusetts, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino.

As células C-33A (derivadas de carcinoma de colo do útero HPV negativo) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (*American Type Culture Collection* – ATCC, Virgínia, EUA).

O cultivo de todas as células acima mencionadas foi realizado em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37 °C.

5.2.Extração de proteína total e *Western Blotting*

As células foram cultivadas em placas de 10 cm de diâmetro até 80% da confluência. Após duas lavagens sucessivas com PBS 1x, adicionou-se 300 µl de tampão de lise RIPA (Tris-HCl 20 mM, pH=7,4; NaCl 150 mM; deoxicolato de sódio 1%; SDS 0,1%; NP-40 1%) acrescido dos coquetéis de inibidores de proteases e fosfatases (Roche, Indianápolis, EUA). Com o auxílio de *cell scraper*, foram removidos os lisados celulares, colocados em tubos, e mantidos em gelo por 15 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e estocado a -80°C até o momento do uso. A concentração de proteínas em cada lisado foi determinada utilizando o *Pierce BCA Protein Assay kit* (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Posteriormente, 40-60 µg dos extratos proteicos foram fracionados em SDS/PAGE 12%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno, GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra), utilizando tampão de transferência 1X (25 mM Tris; 192 mM glicina). Após a transferência, a membrana foi incubada por 2 h com leite 5% para o bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida, a membrana foi incubada por 12 h com um dos seguintes anticorpos primários: anti-citoqueratina-1 (ab 193652, Abcam, Massachusetts, EUA, diluição 1/500); anti-citoqueratina-10 (ab76318, Abcam, Massachusetts, EUA, diluição 1/1000); anti-involucrina (ab53112, Abcam, Massachusetts, EUA, diluição 1/300); anti-TBP (ab818, Abcam, Massachusetts, EUA, diluição 1/1000), anti-HMGB1 (ab18256, Abcam, Massachusetts, EUA, diluição 1/1000); anti-PAX-6 (ab5790, Abcam, Massachusetts, EUA, diluição 1/1000); anti-FOXI1 (ab20454, Abcam, Massachusetts, EUA, diluição 1/1000); anti-NF-E2 (ab140598, Abcam, Massachusetts, EUA, diluição 1/1000). A seguir, a membrana foi

lavada 3x com TBS-T (tampão Tris-salina com tween 20 a 0,1%) e incubada por 1 h com o respectivo anticorpo secundário anti-coelho (NA934, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) na concentração de 1:2.000 ou anti-camundongo (A9044, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) na concentração de 1:2.000. Os sinais foram revelados utilizando o *Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra) no equipamento ImageQuantLAS4.000 (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra). Para a normalização dos níveis proteicos totais, as membranas foram adicionalmente incubadas com anticorpo anti- α -tubulina (ab56676, Abcam, Massachusetts, EUA, diluição 1/5.000) por 2 horas.

5.3. Extração de proteínas nucleares e ensaio de interação proteína/DNA

Foram extraídas as proteínas nucleares utilizando-se o *Panomics nuclear extraction kit* (Panomic, Califórnia, EUA) de acordo com instruções do fabricante. O extrato nuclear das células HaCaT cultivadas em meio KSFM sem adição de cloreto de cálcio e das células cultivadas durante 5 dias em KSFM com adição de 2,8 mM de cloreto cálcio foram utilizadas para o ensaio de interação proteína/DNA.

Os níveis de 345 FTs foram avaliados nestes extratos nucleares utilizando-se o *TransSignal protein/DNA combo array* (MA1215, Panomic, Califórnia, EUA). Esta tecnologia permite determinar o perfil de expressão desses múltiplos FTs simultaneamente. Neste *array*, foram avaliados FTs já bem caracterizados e envolvidos em uma variedade de processos biológicos, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose. O procedimento consiste em três etapas principais: (1) um conjunto de oligonucleotídeos biotinizados é incubado com o extrato de proteínas nucleares a fim de permitir a formação dos complexos DNA/proteína; (2) os complexos formados são separados dos oligonucleotídeos não ligados; (3) a membrana contendo as sequências consenso de ligação dos FTs imobilizadas é incubada com as sondas selecionadas após desfazer os complexos para que ocorra a hibridização com as sequências complementares (**ANEXO I**). O experimento foi realizado de acordo com instruções do fabricante, e as membranas foram reveladas e analisadas utilizando-se o *software* ImageQuant™ TL 8.1 (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra).

5.4. Análise *in silico* das sequências putativas de ligação dos FTs à LCR

O banco de dados TRANSFAC foi utilizado a fim de verificar possíveis interações dos FTs identificados anteriormente como diferencialmente presentes nas células não diferenciadas e diferenciadas com a LCR de HPV-18. Procurou-se pelas sequências consenso desses FTs na LCR do genoma protótipo de HPV-18 seguindo as instruções disponibilizadas pelos desenvolvedores (Matys et al., 2006).

5.5. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)

Foi utilizado o *MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) para os ensaios de imunoprecipitação de cromatina das células 18NCO utilizando os anticorpos: anti-NF-E2 (ab14598); anti-PAX-6 (ab5790); anti-FOXI1 (ab20454); anti-HMGB1 (ab18256); e o anticorpo para controle negativo fornecido pelo *kit* contra IgG. O ensaio foi realizado seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram fixadas adicionando formaldeído 16% livre de metanol (Polyscience, Niles, USA) ao meio de cultura. Após a ruptura das células, a fragmentação da cromatina foi realizada por sonicação de 15 pulsos de 30 segundos utilizando a Cuba Ultrassônica (Cristófoli, Paraná, Brasil). O tamanho dos fragmentos produzidos foi verificado pela eletroforese em gel de agarose 2% corado GelRed (Biotium, San Francisco, EUA). Aproximadamente, 10^5 células foram incubadas com 0,8 µg de cada um dos anticorpos por 12-15 horas a 4 °C com agitação moderada.

O DNA recuperado foi submetido à reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) usando iniciadores específicos que flanqueiam as possíveis regiões de ligação dos TFs à LCR (**tabela 1**).

Tabela 1: Iniciadores utilizados para análise do ChIP

Segmento	Iniciador (Posição)		Sequência (5' -> 3')
I	7169/7188	<i>senso</i>	GTTGTGTTTGTATGTCCTGT

	7352/7369	<i>antisense</i>	AACAAGCAACACCCATAC
II	7337/7356	<i>sense</i>	GTATTTGTGTTTGTGGTATG
	7517/7536	<i>antisense</i>	GATTAAAGGTTGCAATAGTG
III	7423/7442	<i>sense</i>	CCATTTTATCCTACAATCCT
	7601/7620	<i>antisense</i>	GGAAAATGACTAATACCAGG
IV	7733/7753	<i>sense</i>	GGCTTGTACAACACTTTTCAT
	787/808	<i>antisense</i>	CTCACATCTTTTATATACACCG

5.6. Transfecção dos FTs nas linhagens HeLa e SW756 e quantificação de expressão gênica por PCR em tempo real

As células HeLa e SW756 foram semeadas em placas de 6 poços na confluência de 9×10^5 células por poço. Em cada poço, as células foram transfectadas com 2,5 μg dos plasmídeos de expressão contendo o cDNA dos FTs selecionados (pCMV-HMGB1, pCMV-PAX-6, pCMV-FOXI1, e p-CMV-NF-E2 L2 e L3) ou do plasmídeo controle (pCMV- ϕ). Após 48 horas, o RNA total foi extraído por Trizol (Life Technologies, Califórnia, EUA), conforme instruções do fabricante. A concentração de RNA total foi quantificada por espectrofotometria a 260 nm. A qualidade do RNA foi verificada pela razão de D.O. (Densidade Óptica) 260 nm/280 nm (idealmente entre 1,7 e 2,0). Os RNAs foram utilizados nas reações subsequentes de PCR, monitoradas pelo método de incorporação de Sybr Green seguindo as instruções do fabricante (*GoTaq 1-Step RT-qPCR System*, Promega, Madison, EUA). A especificidade da reação foi confirmada através da análise da curva de dissociação dos produtos. A expressão dos gene-alvo específicos foi normalizada pela expressão do gene constitutivo (GAPDH). As reações foram realizadas no termociclador *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Tabela 2: Iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real

gene alvo		Sequência (5' -> 3')
HPV-18 E6	<i>senso</i>	CGATTTTCAACATAGCTGGGC
	<i>antisenso</i>	GAGTCGTTTCCTGTCGTGCTC
HPV-18 E7	<i>senso</i>	ATGTATGGACCTAAGGCAACATTGCAAGAC
	<i>antisenso</i>	GTCTTGCAATGTTGCCTTAGGTCCATACAT
HMGB1	<i>senso</i>	GCTGTGCAAAGGTTGAGAGC
	<i>antisenso</i>	CGGGTACACAGGACACACAA
PAX-6	<i>senso</i>	TGTCCAACGGATGTGTGAGT
	<i>antisenso</i>	TTCCCAAGCAAAGATGGAC
FOX11	<i>senso</i>	CAAGAAGGTGCCCCGCGACGAGGAC
	<i>antisenso</i>	CTGATTTTCTCTTCCTTTTCCTGC
NF-E2 L2	<i>senso</i>	ACGGTCCACAGCTCATCATG
	<i>antisenso</i>	TTCCGTCGCTGACTGAAGTC
NF-E2 L3	<i>senso</i>	GATGTGCGAGCGAGGAGAAT
	<i>antisenso</i>	TTCTGGGCTGACACCCTTTC
GAPDH	<i>senso</i>	AAGGTGGTGAAGCAGGCCGT
	<i>antisenso</i>	GAGGAGTGGGTGTCGCTGTT

5.7. Ensaio de luciferase utilizando as células HaCaT

As células HaCaT foram semeadas em placas de 6 poços na concentração de 3×10^5 células por poço. Utilizou-se o vetor recombinante previamente construído pGL3-Basic (Promega, Madison, EUA) contendo a sequência completa da LCR de HPV-18 a montante do gene da luciferase entre os sítios de restrição de *HindIII* e *KpnI* no plasmídeo, denominado neste relatório como pGL3-LCR HPV-18-Luc (SICHERO; FRANCO; VILLA, 2005). Para a transfecção, foi utilizado 1 μ g deste vetor recombinante, juntamente com 1 μ g do vetor pCMV- β -Gal, utilizado como controle interno da eficiência da transfecção, e 500 ng do vetor pCMV ϕ , pCMV-HGBM1, pCMV-PAX-6, pCMV-FOX11 e pCMV-NF-E2 L2 e L3. O reagente *Fugene 6* (Promega

Madison, EUA) foi utilizado na proporção 3 μ l para cada 1 μ g de plasmídeo, seguindo instruções do fabricante. Passadas 48 horas da transfecção, a proteína total foi extraída e a medida da atividade transcricional foi medida indiretamente pela atividade da enzima luciferase utilizando-se o *Promega Luciferase Assay System* (E1501, Promega Madison, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, as leituras de luminescência foram medidas no equipamento *Victor Light Luminescence Counter* (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA). Essa quantificação foi normalizada pela atividade da β -galactosidase, mensurada empregando-se o *Promega β -Galactosidase Enzyme Assay System* (E200, Promega Madison, EUA), e pela quantidade de proteína total avaliada pelo método de Bradford.

5.8. Ensaio de luciferase utilizando as células C-33A

A fim de analisar o impacto dos fatores de transcrição selecionados previamente sobre a atividade transcricional de P105 de HPV-18, as células C-33A foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 3×10^4 células por poço. Em cada poço, as células foram co-transfectadas com 100 ng do vetor recombinante pGL3-LCR HPV-18-Luc e 100 ng do vetor pCMV- β -Gal, sendo este último utilizado como controle interno da eficiência da transfecção; além de quantidades crescentes (25, 100 e 300 ng) de plasmídeos de expressão contendo o cDNA dos FTs selecionados (pCMV-HMGB1, pCMV-PAX-6, pCMV-FOXI1, e p-CMV-NF-E2 L2 e L3) ou do plasmídeo controle (pCMV- ϕ). Após 48 horas, o RNA total foi extraído por Trizol para confirmação da superexpressão (item 4.7), e a proteína total foi extraída utilizando-se *lysis buffer* (Promega, Madison, EUA), e foram medidos os níveis de luciferase e β -galactosidase nos extratos proteicos empregando-se o *Promega Luciferase Assay system* (Promega Madison, EUA) e o *Promega-Galactosidase enzyme assay system* (Promega Madison, EUA), respectivamente. Os níveis relativos de luciferase foram normalizados pela atividade de β -galactosidase mensurada.

5.9. Imuno-histoquímica

Visando avaliar o padrão de expressão dos FTs ao longo das camadas do epitélio estratificado, utilizou-se o modelo de cultura organotípica ou *raft* que permite a estratificação em camadas e o estudo da diferenciação celular de maneira mais fidedigna à observada nos tecidos epiteliais. Culturas organotípica derivadas de queratinócitos primários (PHK) ou imortalizados com HPV-18 foram preparadas em estudo prévio do nosso grupo (HK 18E6/E7) (NUNES et al., 2021).

Após desparafinização em xileno e reidratação em álcool, a recuperação do antígeno foi realizada em tampão citrato 10 mM fervente, pH 6,0 a 100°C por 10 minutos. As amostras foram incubadas com anti-HMGB1 (ab18256, Abcam, Massachusetts, EUA, diluição 1/2.000); anti-PAX-6 (ab5790, Abcam, Massachusetts, EUA, diluição 1/400); ou anti-NF-E2 (ab140598, Abcam, Massachusetts, EUA, diluição 1/400) em diluente de anticorpos por 18 horas a 4°C. A imuno-histoquímica para HMGB1, PAX-6 e NF-E2 foi realizada utilizando o *Polymer Detection System (Novolink™ Max Polymer Detection Systems, Leica Biosystems, Newcastle, UK)*, de acordo com as instruções do fabricante. As reações positivas foram visualizadas com um coquetel contendo anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho conjugados com peroxidase na presença de DAB, resultando em um precipitado marrom. Culturas organotípicas derivados de PHK foram usados como controles experimentais e foram incubadas na ausência ou na presença dos anticorpos testados.

5.10. Quantificação da metilação do DNA por pirosequenciamento

As células HaCaT no estado não diferenciado e diferenciado foram transfectadas com o vetor pGL3 contendo a LCR de HPV-18. O DNA dessas células foi extraído e tratado com Bissulfito de sódio utilizando o *kit EpiTect Bissulfite* (cat. 59104, Qiagen, Hilden, Alemanha). Após o tratamento, a região de interesse foi amplificada por PCR. A reação de PCR foi realizada com 0,2 mM de cada dNTP, 6 pmol de cada iniciador, 1U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies, Califórnia, EUA) e 1×PCR buffer (67 mM Tris pH 8,8, 6,7 mM MgSO₄, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄ e 10 mM de 2-mercaptoetanol). As condições de PCR consistiram em 95°C durante 6 min, seguido 45 ciclos de 95°C durante 1 minuto, anelamento durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto, e

o passo final de extensão de 72°C por 5min. A presença de produtos amplificados foi verificada em géis de agarose ultrapura a 2% (Life Technologies, Califórnia, EUA) corado com GelRed (Biotium, San Francisco, EUA.).

Os produtos de PCR foram submetidos ao pirosequenciamento na plataforma PyroMark Q24 (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo um protocolo padrão (FILHO et al., 2017). Resumidamente, esferas magnéticas de estreptavidina, tampão de ligação PyroMark (Qiagen, Hilden, Alemanha) e produtos de PCR foram misturados e incubados numa plataforma de agitação. Utilizou-se *Biotage Q24 Vac Prep* para separar, desnaturar e lavar os produtos de PCR, os quais foram subsequentemente adicionados a uma placa contendo tampão para anelamento e os iniciadores. O anelamento dos iniciadores foi realizado por uma incubação a 80°C durante 2 minutos, esperando chegar até a temperatura ambiente antes de iniciar a reação de pirosequenciamento. Nesta etapa, foram utilizados *PyroGold*, enzima e seu substrato e nucleotídeos. Os pirogramas foram gerados e analisados com o PyroMark Q24, v.2.0.6 (Qiagen, Hilden, Alemanha). O DNA extraído de células HeLa foi utilizado como controle.

5.11. Forma de análise dos resultados

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Comparações entre grupos experimentais foram feitas por Teste t-Student. Os níveis de significância estatística para cada experimento (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$; ns, não significativo) estão indicados nas figuras correspondentes. Todas as análises estatísticas e gráficos foram gerados utilizando o Software GraphPad Prism 9.

5.12. Avaliação pelo comitê de ética em pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP) n°476/16.

6. RESULTADOS

6.1. Estabelecimento do modelo de diferenciação dos queratinócitos

As células HaCaT são mais comumente cultivadas em meio DMEM, cuja composição inclui cálcio em uma concentração de 1.8 mM, que somada ao suplemento de soro fetal bovino atinge concentrações ainda maiores (FUJISAKI et al., 2018). Para garantir a baixa concentração de cálcio, adaptou-se o cultivo dessas células em meio de queratinócitos sem soro (KSFM, do inglês *Keratinocyte serum-free medium*). Passadas 4 semanas de cultivo em KSFM, tempo necessário para reversão do estado diferenciado, as células HaCaT foram, então, consideradas aptas para a condução dos experimentos.

Para indução da diferenciação das células, o meio de cultivo foi acrescido de cálcio em uma concentração final de 2,8 mM. Na **figura 2**, observa-se os registros fotográficos realizados ao microscópio óptico ao longo de 5 dias em células cultivadas em KSFM com e sem a adição do cálcio. As células mantidas em meio sem adição de cálcio se mantêm em sua forma mais cubóide sem apresentar muitas junções célula a célula ao longo dos dias mesmo em maior confluência. Por outro lado, as células mantidas em alta concentração de cálcio, se aproximam e se tornam mais agrupadas e compactadas, sugerindo o aumento as junções celulares, além de apresentarem áreas com multicamadas.

Para verificar se ocorreu a alteração no padrão de expressão de marcadores epiteliais, avaliou-se a expressão de proteínas estruturais essenciais para o processo de diferenciação: citoqueratina-1, citoqueratina-10; e a proteína catalítica involucrina (ECKERT; RORKE, 1989). Elas são expressas nas camadas mais superficiais do epitélio e, portanto, esperava-se observar o aumento dos níveis dessas proteínas passados 5 dias do acréscimo do cálcio ao meio de cultivo. Em concordância, a **figura 3** mostra que os níveis dessas proteínas aumentam nas células cultivadas em meio suplementado com cálcio em comparação àquelas cultivadas em meio sem adição de cálcio.

Sendo assim, os registros de alteração morfológica e o aumento da expressão dos marcadores de diferenciação confirmam que as células HaCaT, após 5 dias de cultivo em alta concentração de cálcio, se encontram em um estado mais diferenciado.

O próximo passo foi extrair as proteínas nucleares das células HaCaT não-diferenciadas e diferenciadas a fim de, posteriormente, avaliar os níveis de 345 fatores de transcrição expressos nas duas condições.

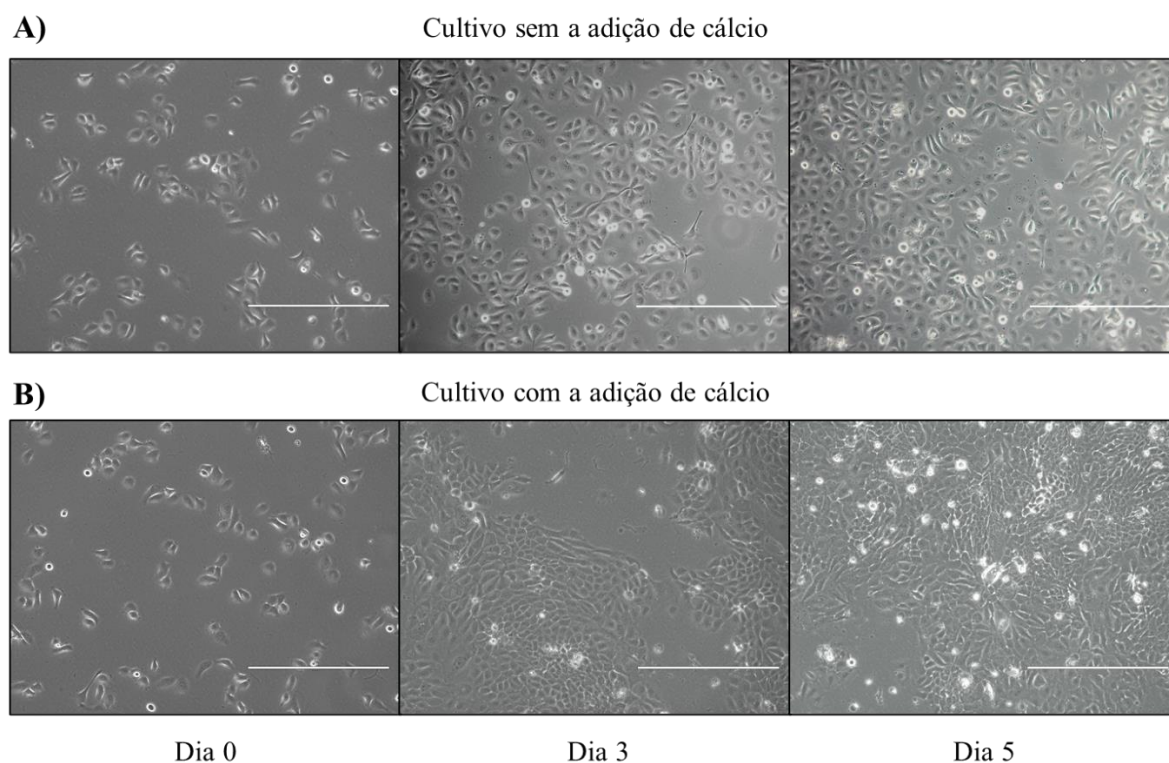


Figura 2. Modelo de diferenciação das células HaCaT: alterações morfológicas. As células HaCaT foram cultivadas em meio KSFM **(A)** sem a adição de cálcio e **(B)** com a adição de cálcio. O registro foi realizado com microscopia de contraste de fase (aumento de 100x) das células em ambas as condições durante 5 dias e mostram as alterações morfológicas. Os dias 0, 3 e 5 indicam o número de dias passados após a adição de cálcio. A barra de escala corresponde a 400 μ m.

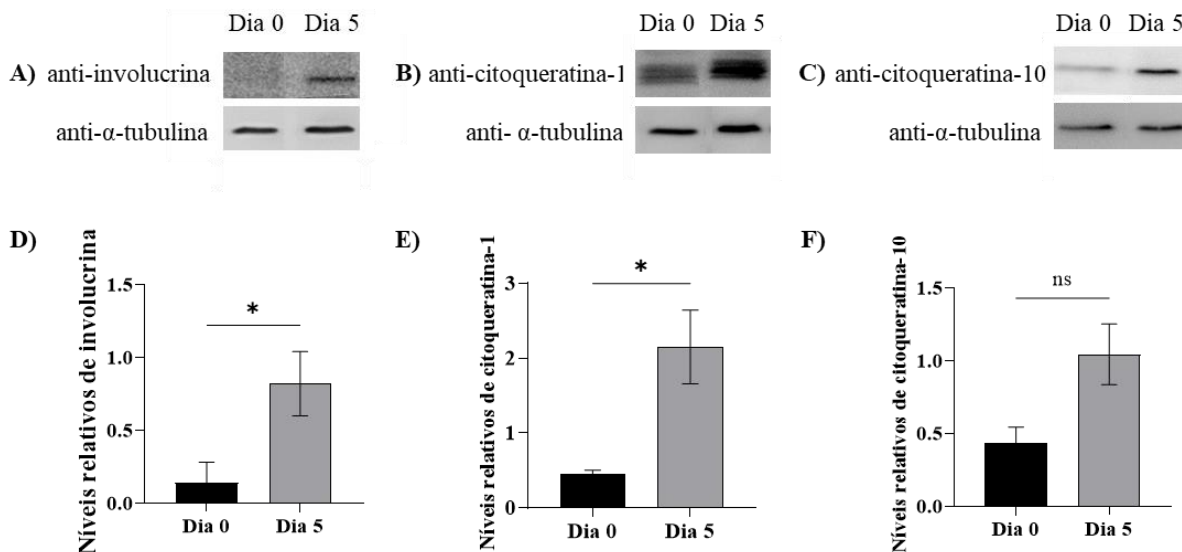


Figura 3. Modelo de diferenciação das células HaCaT: painel de marcadores de diferenciação celular. Células HaCaT indiferenciadas foram cultivadas em baixo nível de cálcio (dia 0) e em meio contendo alta concentração de cálcio por 5 dias (dia 5). (A) As proteínas totais foram extraídas e fracionadas em SDS-PAGE e o nível das proteínas alvo foi analisado por *Western blotting* utilizando os anticorpos anti-involucrina, anti-citoqueratina-1 e anti-citoqueratina-10. (B) Foi realizada quantificação das bandas empregando-se o software ImageQuant™ TL 8.1 (GE Healthcare). Dados normalizado pela expressão do gene endógeno α -tubulina ou GAPDH. A média e desvio padrão são baseados em pelo menos 2 experimentos independentes. Significância estatística: ns, não significativo, * $p < 0.05$.

6.2. Avaliação dos níveis de expressão de 345 FTs nos queratinócitos não-diferenciados e diferenciados

Após a extração das proteínas nucleares, foi necessário realizar um controle de qualidade destas para garantir que não houve contaminação com proteínas citoplasmáticas. Na **figura 4**, certificou-se da ausência de proteína citoplasmática (α -tubulina) nos extratos nucleares já que não foi detectada tubulina, uma proteína

citoplasmática, nos extratos nucleares. Por outro lado, a proteína TBP (*TATA-binding protein*) que é detectada normalmente no núcleo foi detectada nessas células.

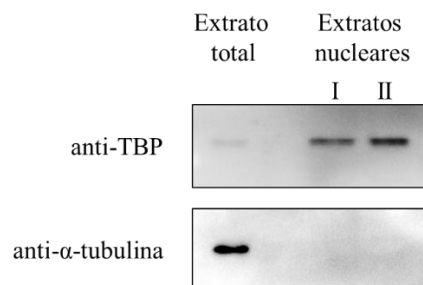


Figura 4. Avaliação da eficiência de extração das proteínas nucleares das células HaCaT diferenciadas e não diferenciadas. Células HaCaT indiferenciadas foram cultivadas por 5 dias em meio contendo alta concentração de cálcio a fim de induzir a diferenciação celular. Os extratos nucleares das células (I) não diferenciadas e (II) diferenciadas foram extraídos e foram utilizados anticorpos anti-TBP e anti- α -tubulina após fracionamento do extrato em SDS-PAGE.

A seguir, o *TransSignal Protein/DNA combo array* foi utilizado para o rastreamento (*screening*) dos níveis de 345 FTs com relevância biológica e bem descritos na literatura. Essencialmente, esta técnica consiste na detecção de interações proteína/DNA por meio da hibridização das sondas capturadas após ligação com as proteínas contidas no extrato proteico com os oligonucleotídeos com sequências complementares imobilizados em uma membrana. Cada ponto da membrana corresponde às sequências consenso de ligação para um FT. A fim de encontrar fatores de transcrição potencialmente relevantes para o processo de diferenciação dos queratinócitos, duas membranas foram incubadas independentemente com os extratos de proteínas nucleares obtidos de células HaCaT não diferenciadas ou diferenciadas.

A **figura 5** mostra os sinais detectados em ambas as condições, bem como os controles da reação. Ao todo, foram detectados 26 FTs presentes no extrato das células HaCaT não diferenciadas e 21 FTs no extrato das células HaCaT diferenciadas. Destas, 18 proteínas estão presentes em ambos os extratos, 9 estão exclusivamente presentes no

extrato células HaCaT não diferenciadas e 3 estão exclusivamente presentes no extrato das células HaCaT diferenciadas (**figura 6**).

Foi, então, realizada uma análise comparativa dos níveis desses FTs detectados no extrato nuclear das células não diferenciadas e diferenciadas (**figura 7**). O *fold-change* indica o aumento ou diminuição da detecção de cada FT após a diferenciação e está representado na escala logarítmica. Observa-se que os níveis da maioria dos FTs diminuem com a diferenciação. Os fatores PAX-6, AP-1, PAX-8 e NF-E2 mostraram os menores valores de *fold-change* e são exclusivamente expressos nas células não diferenciadas. Apenas 8 fatores aumentaram seus níveis conforme a diferenciação, entre eles, destaca-se HIF-1, FOXI1, SP-1, apenas presentes nas células diferenciadas.

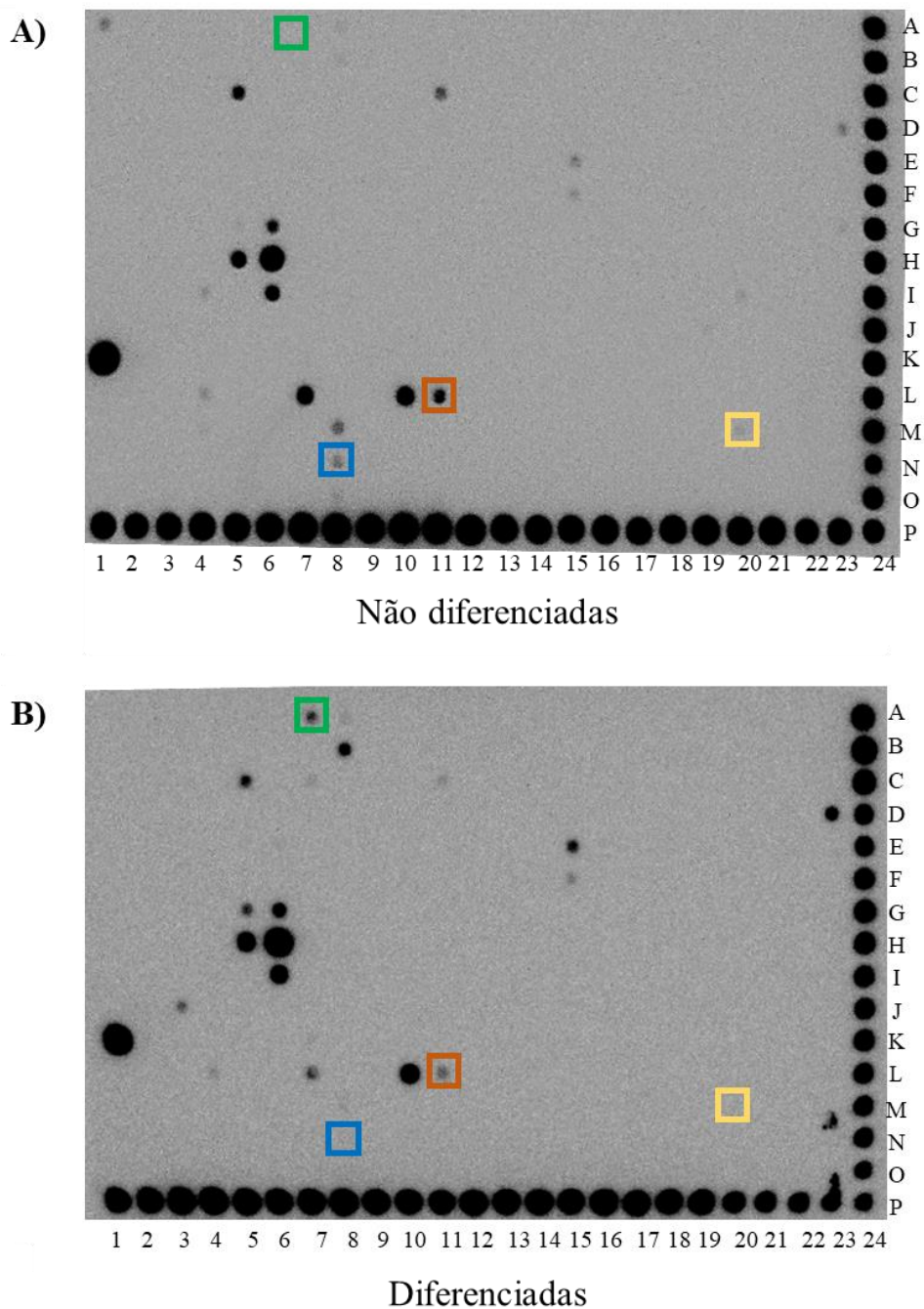


Figura 5. Ensaio de interação proteína/DNA. As membranas do *TransSignal protein/DNA combo array* (Panomic, Califórnia, EUA) foram incubadas com as sondas selecionadas após incubação com os extratos nucleares de células HaCaT (A) não diferenciadas ou (B) diferenciadas e foram reveladas por quimioluminescência utilizando

substratos de peroxidase. Os quadrados destacam os fatores escolhidos para prosseguir o estudo: FOXI1 (verde), HMG (laranja), NF-E2 (amarelo), PAX-6 (azul).

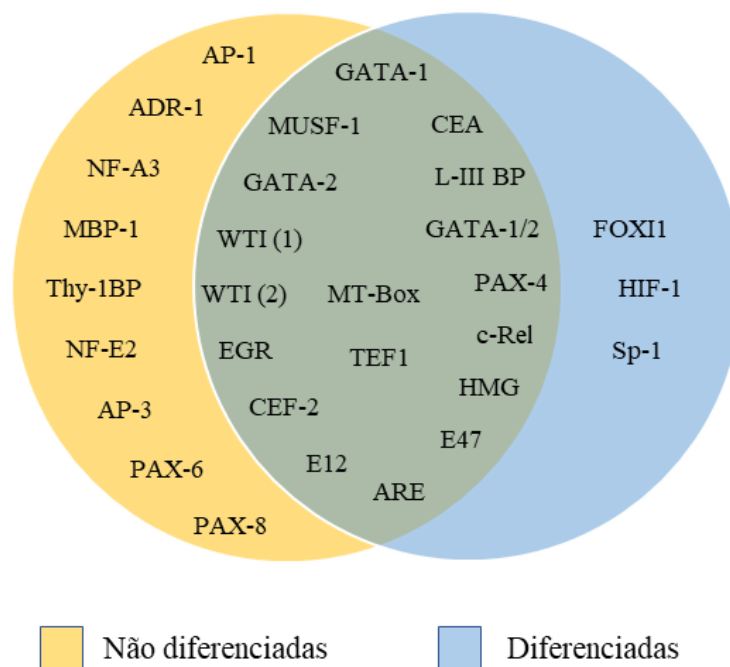


Figura 6. Diagrama de Venn representando os fatores de transcrição expressos em células HaCaT diferenciadas e não diferenciadas. A região amarela mostra os FTs exclusivamente expressos nas células não diferenciadas e a região amarela mostra os FTs exclusivamente expressos nas células diferenciadas. Por fim, a área de intersecção mostra aqueles expressos em ambas as duas condições.

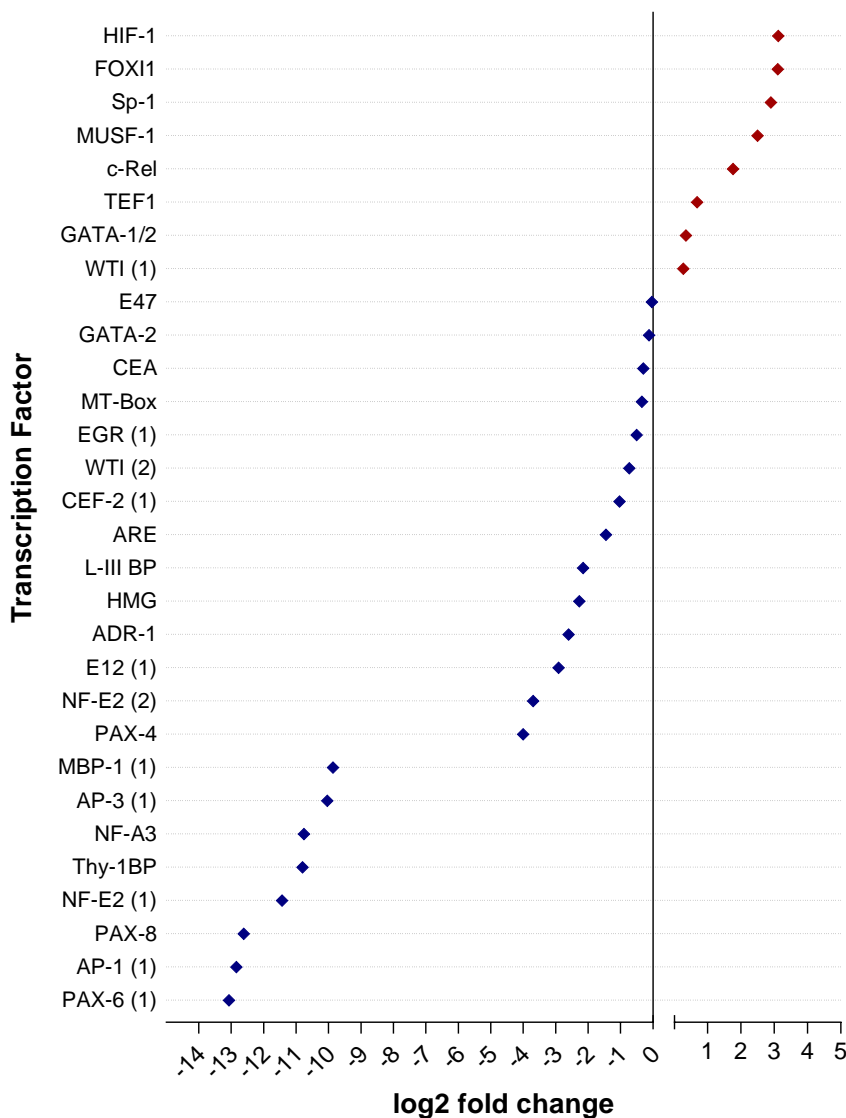


Figura 7. Análise comparativa dos níveis dos fatores de transcrição detectados nas células não diferenciadas e diferenciadas. As intensidades dos pontos detectados nas membranas do *TransSignal protein/DNA combo array* (Panomic, Califórnia, EUA) foram quantificadas empregando-se o software ImageQuant™ TL 8.1 (GE Healthcare). O *fold-change* foi calculado considerando os valores da condição diferenciada/ não diferenciada e está apresentado na escala logarítmica. Os pontos em azul indicam os FTs cujos níveis estão diminuídos com a diferenciação, enquanto os pontos vermelhos indicam os FTs cujos níveis estão aumentados com a diferenciação.

6.3. Análise *in silico* dos sítios putativos de ligação dos fatores de transcrição

Dentre os FTs detectados como diferencialmente presentes nos extratos nucleares das células não diferenciadas e diferenciadas, buscou-se identificar quais poderiam possivelmente interagir diretamente com a LCR de HPV-18. Para tanto, foi realizado um estudo *in silico* utilizando-se os bancos de dados TRANSFAC (<http://genexplain.com/transfac/>) e JASPAR (<https://jaspar.genereg.net/>) para confirmação (CASTRO-MONDRAGON et al., 2022; MATYS et al., 2006).

A sequência da LCR de HPV-18 (genoma referência, GenBank ID: X05015) foi fornecida ao *software* e os fatores com elementos responsivos concordantes são apresentados com sua sequência consenso, a sequência do sítio putativo de ligação à LCR, localização e o valor de *core score*, que quantifica a concordância entre a sequência consenso e aquela encontrada na LCR (**figura 8**).

Dos 30 FTs detectados no ensaio de interação proteína/DNA, foi possível identificar sítios putativos de ligação aos seguintes: AP-1, AP-3, NF-E2, PAX-4, PAX-6, PAX-8, EGR, c-Rel, E47, GATA-1, GATA-2, FOXI1; HMG, E12, MT-Box.

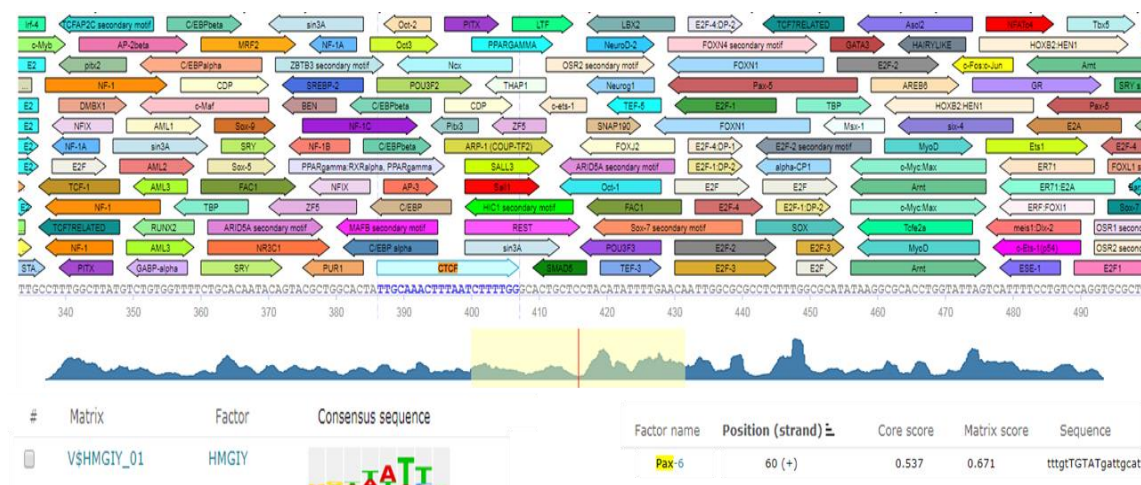


Figura 8. Interface do banco de dados TRANSFAC (<http://genexplain.com/transfac/>).

Esta análise indicou sítios putativos de ligação de uma ampla gama de FTs à LCR de

HPV-18. Os seguintes dados de cada FT são fornecidos: sequência consenso, a sequência do sítio putativo de ligação à LCR, localização e o *core score*.

A partir dessa análise, o próximo passo foi selecionar FTs de maior interesse para prosseguir no estudo. Essa escolha foi realizada de acordo com os seguintes critérios:

- a) aqueles possuíam níveis diferenciais entre as células não diferenciadas e diferenciadas. Buscou-se escolher FTs presentes exclusivamente nas células não diferenciadas, FTs presentes exclusivamente nas células diferenciadas, e um representante presente em ambas as condições.
- b) aqueles cujos sítios putativos de ligação à LCR de HPV-18 foram identificados pelo TRANFAC considerando-se o *core score* resultante.
- c) aqueles que possuíam anticorpos validados para a técnica de ChIP (imunoprecipitação de cromatina) disponíveis comercialmente, sendo essa a próxima etapa para confirmação da ligação desses FTs à LCR.
- d) Aqueles que estavam disponíveis na biblioteca de plasmídeos de cDNA de 550 FTs (Origene) disponível no laboratório.

Em síntese, a **figura 9** ilustra as etapas realizadas até a escolha dos fatores. Uma vez definidas as condições para obtenção das células HaCaT não diferenciadas e diferenciadas, o ensaio de interação de proteína revelou FTs potencialmente importantes para o processo de diferenciação. Dentre esses FTs identificados, buscou-se aqueles que poderiam estar interagindo diretamente com a LCR de HPV-18 e, por conseguinte, poderiam estar atuando sobre a regulação da atividade transcricional. Para tanto, realizou-se o estudo *in silico* explorando os sítios de ligação putativos desses FTs na LCR. Finalmente, levando-se em consideração os critérios supracitados, foram escolhidos os seguintes FTs: HMG, PAX-6, FOXI1 e NF-E2.

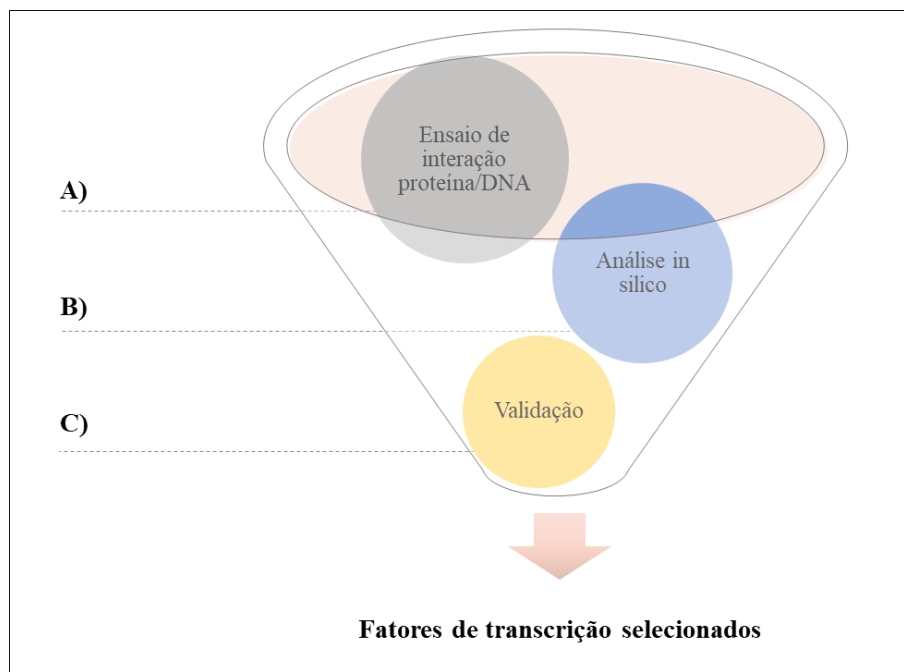


Figura 9. Fluxograma das etapas até a escolha dos FTs. (A) O ensaio de interação de proteína foi realizado com as células HaCaT não diferenciadas e diferenciadas indicando FTs potencialmente relevantes durante o processo de diferenciação de queratinócitos. A análise comparativa indicou FTs diferencialmente presentes nas duas condições. (B) Em seguida, realizou-se a análise *in silico* para encontrar FTs que poderiam estar interagindo diretamente com a LCR de HPV-18. (C) Por fim, somando os critérios metodológicos para a posterior validação por ChIP e estudo da atividade transcricional, completou-se a escolha dos FTs selecionados.

As informações resultantes da análise *in silico* desses FTs selecionados estão reunidas na **tabela 3**, que mostra os sítios putativos de ligação dos FT à LCR, sua posição, e o *core score*.

Tabela 3: Sítios putativos de ligação na LCR de HPV-18 dos fatores de transcrição

<i>Fator de transcrição</i>	<i>Sítio putativo de ligação</i>	<i>Posição inicial</i>	<i>TRANSFAC Core Score</i>
<i>HMG</i>	ATATTgtcctgtatt	7378 (+)	1,000
	cctcccATTTTgctgt	7441 (+)	0,960
	taaatAAAATatggt	7277 (-)	0,960
<i>NF-E2</i>	taTGACTaagctgtgc	7791 (+)	1,000
	atgacTAAGCt	7792 (-)	0,759
<i>PAX-6</i>	tggcgCGCCTctttggcgc	7571 (+)	0,957
	gtacgcTGGCActa	7509 (+)	0,861
	cgcaccTGGTAtta	7598 (+)	0,861
<i>FOXII</i>	ttgTGTTTgtatg	7171 (+)	1,000
	ctgTGTTTgtggt	7186 (+)	1,000
	ttgTGTTTgttgt	7192 (+)	1,000
	ttgTGTTTgtggt	7342 (+)	1,000

6.4. Verificação da ligação dos FTs à LCR

Após a análise *in silico* foi necessário confirmar a ligação dos fatores selecionados à LCR de HPV-18. Nesta etapa, empregou-se a técnica ChIP na qual foram utilizados anticorpos específicos para os fatores: HMGB1, PAX-6, FOXI1 e NF-E2. O HMGB1 foi o membro escolhido da família HMG uma vez atua amplamente na regulação da transcrição por meio da sua interação ao DNA.

Em sequência, foram realizadas PCRs quantitativas em tempo real a fim de detectar os fragmentos enriquecidos na imunoprecipitação. As localizações dos sítios putativos de ligação dos fatores supramencionados de maior *core score* foram consideradas para escolha da disposição de quatro pares de iniciadores (**figura 10**).

Segmento I

7137 TATGTGTGTG TGTATATATA TATACATCTA TTGTTGTTGTTT IGTATGTCCTT **FOXP1** **FOXP1** **FOXP1** **FOXP1**
 7237 TGTATGTTGT AIGTTACTAT ATTGTTGGT AITGGCATT AAATAAATAA TGTTTTGGG TCTGTGTGT TAIGTGTGG CGCCCTAGTG AGTAACAACCT
 7337 GTATTGTTGT TTGTGGTATG GGTGTTGCTT GTTGGGCTAT ATATTGTCTT

Segmento II

FOXP1 **HMG**
 7337 GTATTGTTGT TTGTGGTATG GGTGTTGCTT GTTGGGCTAT ATATTGTCTT GTATTCAAG TTATAAACT GCACACCTTA CAGCATCCAT TTATCTTAC
HMG
 7437 AATCCCTCCAT TTGGCTGTGC AACCGAATTC GGTGGCTTTT GGCTTATGTC TGTGTTTTC TGCACAATAC AGTACCGCTGG CACTAATTGCA ACCTTAAATC

Segmento III

7587 GTATTCAAG TTATAAACT GCACACCTTA CAGCATCCAT TTATCTTAC AATCCTCCAT TTGGCTGTGC AACCGAATTC GGTGGCTTT GGCTTATGTC
PAX6
 7487 TGTGTTTTC TGCACAATAC AGTACCGCTGG CACTAATTGCA ACCTTAAATC TTTTGGGCAC TGCCTCTACA TATTTTGAAC AATTGGCGCG CCTCTTTGGC
PAX6 **HMG**
 7587 GCATACAGAG CGCACCTGGT ATTAGTCAAT TTCCCTGTCCA GGTGGCTAC AACCAATTGCT TGCATACTA TATCCACTCC CTAAGTATA AACTGCTTT

Segmento IV

7687 TAGGCACATA TTTTAGTTTCT TTTTACTTA AGCTAATTGC ATACTTGGCTTGTACAACCTA CTTTCAATGTC CAACATTCTG TCTAACCTTA ACATGAACCTA
NEF2
 7787 TAAITATGACT AAGTGTGCA TACATAGTTT ATGCAACCGA AATAGGTTGGGAGCAGACATA CTATACTTTT CATTAACT TTTAACAATT GTAGTATATA
 30 AAAAAAGGAG TAACCGAAAA CGGTGGGAC CGAAAAAGGT GTATATAAAAAAGATGTGAGAA ACACACCACA ATACT

Figura 10. Localizações dos sítios putativos de ligação dos FTs à sequência nucleotídica da LCR de HPV-18. A sequência da LCR de HPV-18 foi dividida em 4 segmentos (I, II, III e IV) para realizar a análise do CHIP. As sequências destacadas em cinza, laranja, azul e amarelo indicam a região amplificada em cada segmento. Os sítios

putativos de ligação de cada fator preditos na análise *in silico* estão ilustrados ao longo da sequência.

A **figura 11** mostra o resultado do ChIP-qPCR demonstrado pelo percentual de *input*, ou seja, pela estimativa do incremento de um determinado fragmento em relação ao seu total na amostra não enriquecida pelo anticorpo. Os dados foram comparados ao controle negativo de ensaio, que consistiu na imunoprecipitação realizada com o anticorpo contra IgG. De maneira geral, pode-se constatar a ligação de todos os fatores escolhidos ao longo da LCR de HPV-18.

A fim de examinar mais especificamente onde esses FTs estariam interagindo com a LCR correlacionou-se os resultados obtidos com ChIP-qPCR (**figura 11**) com as predições dos sítios de ligação ao longo da LCR de HPV-18 (**figura 10**). Com isso, observou-se que, apesar do fator HMGB1 ter apresentado 3 sítios de ligação putativos com maiores *core scores* compreendidos nos segmentos II e III, o reconhecimento deste fator com um maior percentual de *input* ocorreu no segmento IV (21,95%). O fator NF-E2 também apresentou uma ligação maior no segmento IV e no seguimento II (21,95% e 9,14%, respectivamente). De acordo com a análise *in silico*, havia sido predito um sítio de ligação deste fator na LCR com alto *core score* apenas no segmento IV. O regulador da transcrição PAX-6 parece interagir mais com os segmentos IV e III (8,11% e 5,07%, respectivamente), indicando uma possível interação em um dos três sítios preditos no segmento III. Da mesma forma, FOXI1 exibiu a maior porcentagem de *input* nos segmentos III e IV (2,26% e 2,20%, respectivamente), embora a predição houvesse indicado nos segmentos I e II.

Portanto, é possível que esses fatores avaliados se liguem diretamente em outros sítios de ligação com menor *core score*. A possibilidade existe ainda que estes FTS estejam associados à LCR indiretamente através da ligação a outras proteínas ligadas a LCR. Ademais, é importante ressaltar que ensaios complementares ao ChIP, como Ensaio do Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA) e ensaios de mutagênese, agregariam na conclusão da posição mais precisa do sítio de ligação desses fatores à LCR de HPV-18.

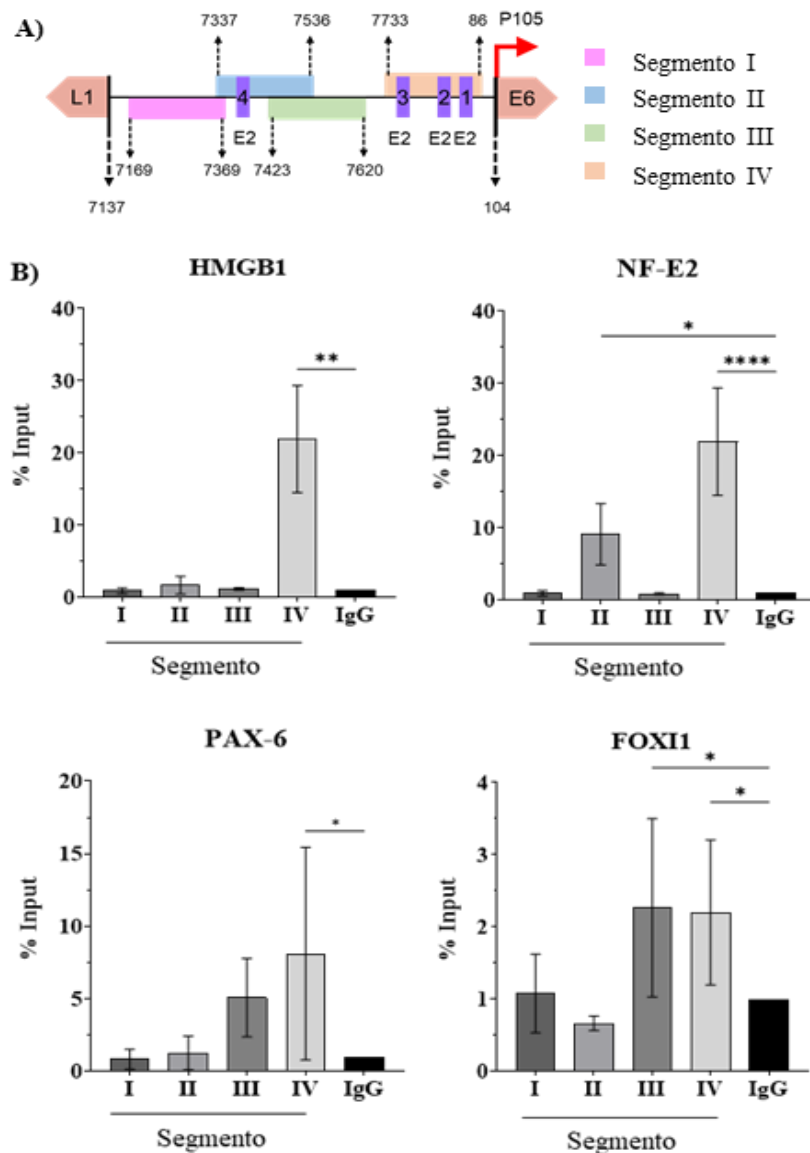


Figura 11. Confirmação da ligação dos fatores de transcrição à LCR de HPV-18. A ligação dos fatores de transcrição à LCR de HPV-18 foi avaliada por ChIP seguido de PCR quantitativo em tempo real. **A)** Representação dos segmentos abrangidos pelos iniciadores utilizados. **B)** PCR quantitativa em tempo real realizada para a análise do ChIP. Os dados são mostrados por meio da porcentagem do input (% Input), definida como: $2^{(Ct\ input - Ct\ alvo)} \times 100\%$ e são relativos ao controle negativo (IgG). Os valores estão representados pela média \pm desvio padrão baseados em pelo menos 2 experimentos independentes. Significância estatística: ns, não significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, **** $p < 0,00005$.

6.5. Avaliação do impacto dos FTs selecionados na atividade transcricional

A seguir, objetivou-se avaliar por uma abordagem funcional a interação dos FTs com a LCR de HPV-18. Nesta etapa, além de HMGB1, PAX-6 e FOXI1, foram investigados dois membros da família NF-E2, são eles: NF-E2 L2 e NF-E2 L3. Basicamente, a abordagem utilizada consistiu em avaliar o impacto da expressão exógena desses fatores na atividade do promotor precoce de HPV-18.

Neste ensaio, utilizou-se um vetor recombinante previamente construído contendo a sequência da LCR de HPV-18 à montante do gene repórter *luc* que codifica a enzima luciferase. Com isso, pôde-se obter uma medida indireta da atividade do promotor precoce de HPV-18, o P105, mensurando-se a atividade da enzima luciferase. Assim, células C-33A, provenientes de câncer de colo do útero HPV negativas, foram co-transfectadas com o plasmídeo pGL3-LCR HPV-18-Luc e com quantidades crescentes (25, 100 e 300 ng) do plasmídeo pCMV contendo a sequência para expressão de um dos fatores: HMGB1, PAX-6, FOXI1, NF-E2 L2 e NF-E2 L3; ou ainda, quantidades equivalentes do vetor pCMV vazio (pCMV ϕ).

Primeiramente, o nível de superexpressão dos fatores foi avaliado por PCR em tempo real em cada condição. Os resultados encontram-se na **figura 12** e constata-se o aumento da expressão de todos os fatores nas células que receberam os vetores de expressão em relação as células transfectadas com o vetor vazio, e indicam que o aumento da expressão é proporcional à quantidade de plasmídeo transfectada.

Após essa verificação, a luminescência no extrato proteico celular foi mensurada e normalizada pela atividade basal do promotor P105 na presença de quantidades equivalentes do vetor controle (pCMV ϕ) (**figura 13**).

A expressão exógena de HMGB1 em quantidades crescentes demonstrou que esse fator é capaz de inibir a atividade do promotor precoce de HPV-18 de maneira dose-dependente (**figura 13a**). O próximo fator analisado, PAX-6, ativou a atividade transcricional na quantidade de 25 ng. Entretanto, quando em quantidades maiores passou a reprimir o promotor (**figura 13b**). Já o fator FOXI1 apresentou o efeito de aumentar a atividade transcricional do HPV-18 em todas as quantidades testadas. O fator NF-E2 L2,

por sua vez, reduziu a atividade do promotor precoce com maior impacto após acréscimo de 300 ng deste fator. Por fim, as quantidades crescentes de NF-E2 L3 parecem diminuir a atividade do promotor P105

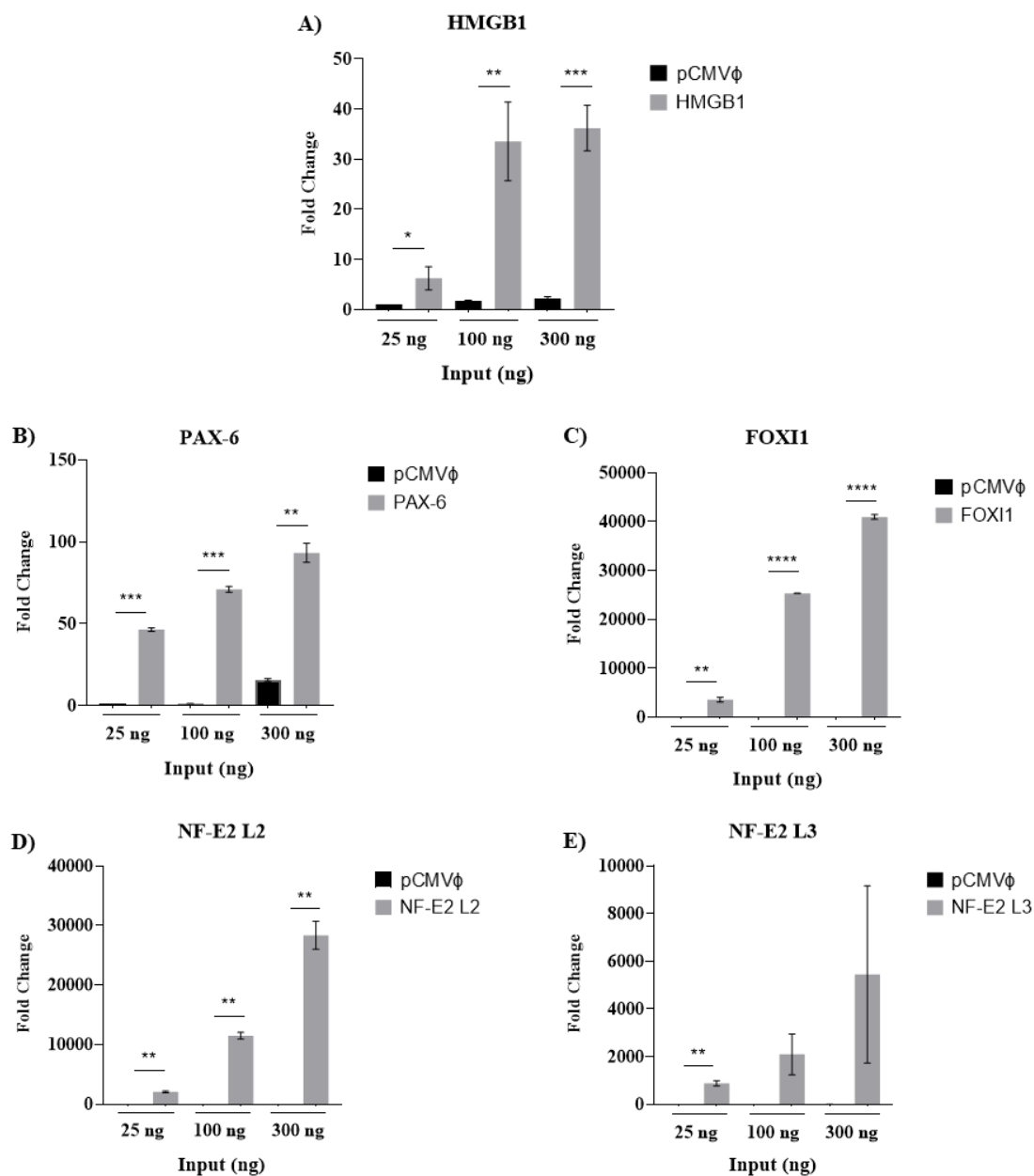


Figura 12. Avaliação da superexpressão dos FTs. As células C-33A foram co-transfectadas com plasmídeo de expressão do respectivo fator de transcrição em quantidades crescentes (25, 100 e 300 ng) e com 100 ng de vetor recombinante pGL3-

LCR-HPV-18-Luc e 100 ng do vetor pCMV- β -Gal. Como controle, as células C-33A foram co-transfectadas com o vetor pCMV vazio (pCMV ϕ) em vez do plasmídeo de expressão. Após a extração do RNA total, a expressão de cada fator foi avaliada por PCR em tempo real. Os dados estão representados pela média e desvio padrão de um experimento representativo conduzido em triplicata. Foram realizados pelos 3 experimentos independentes. Significância estatística: ns, não significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,00005$.

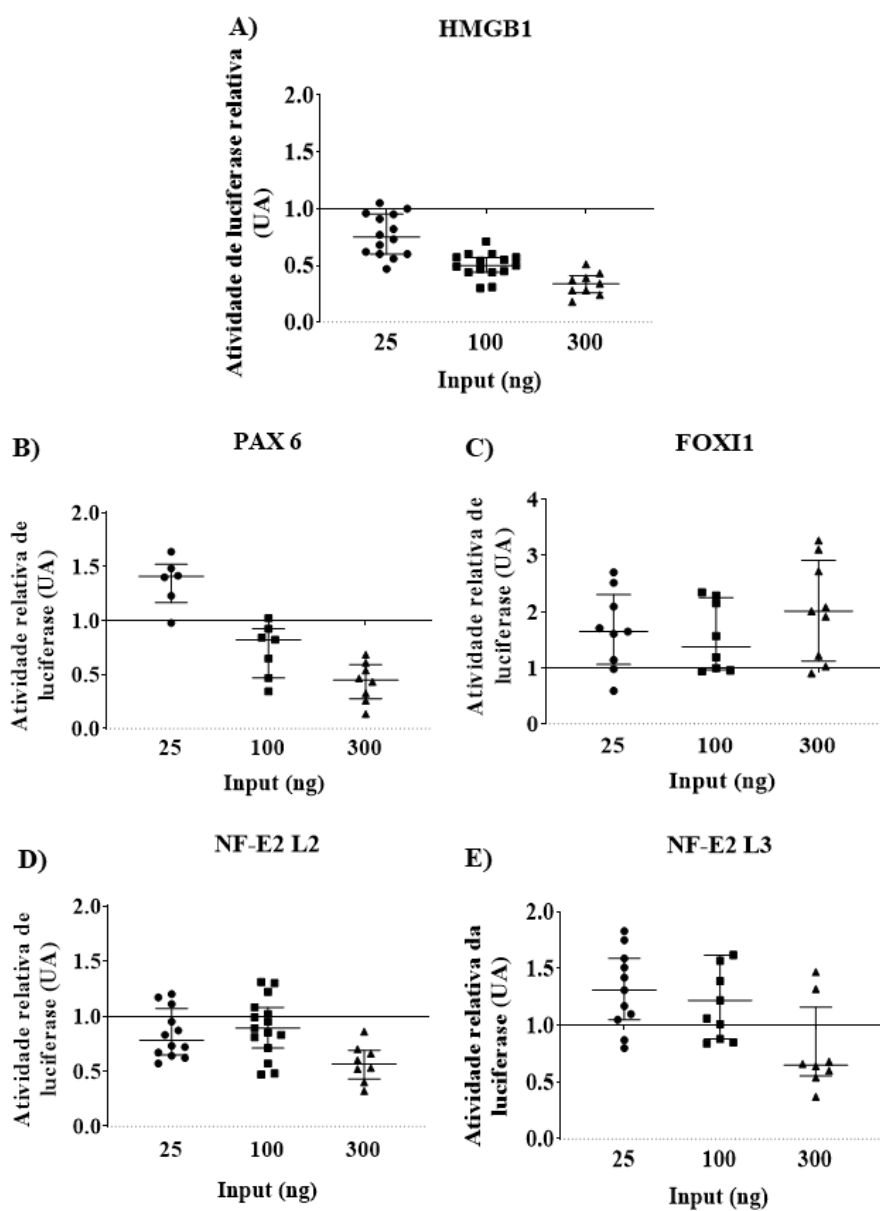


Figura 13. Impacto dos FTs sobre a atividade transcricional do promotor precoce do HPV-18. As células C-33A foram co-transfectadas com plasmídeo de expressão do respectivo fator de transcrição em quantidades crescentes (25, 100 e 300 ng) e com 100 ng de vetor recombinante pGL3-LCR-HPV-18-Luc e 100 ng do vetor pCMV- β -Gal. Os dados estão representados pela mediana e intervalo interquartil. A medida da atividade transcricional foi normalizada com a atividade basal do HPV-18-LCR co-transfectado com vetor pCMV vazio, definido como referência (valor 1). Foram realizados pelos menos 8 experimentos independentes em que as amostras foram transfectadas em triplicatas.

6.6. Determinação o impacto da expressão dos fatores de transcrição no contexto da diferenciação dos queratinócitos

Inicialmente, a atividade transcricional basal do HPV-18 foi avaliada em células HaCaT não diferenciadas e diferenciadas. Como esperado, observou-se que a atividade do promotor precoce é significativamente reduzida durante diferenciação (**figura 14**).

A fim de determinar o impacto da expressão desses fatores no contexto da diferenciação dos queratinócitos, utilizou-se células HaCaT cultivadas em baixa concentração de cálcio (dia 0) e a alta concentração de cálcio durante 5 dias (dia 5). Essas células foram transfectadas com os plasmídeos de expressão de HMGB1, PAX-6, FOXI1, NF-E2 L2 ou NF-E2 L3, juntamente com os plasmídeos pGL3-LCR HPV-18-Luc e pCMV- β -Gal (normalizador da transfecção). Assim como nos resultados da figura 12, os dados de luminescência das células com a expressão exógena dos fatores foram normalizados pela luminescência das células transfectadas com quantidade equivalente do vetor pCMV vazio.

Na **figura 15**, é possível observar que nas células não diferenciadas o HMGB1 exerce uma inibição sobre a atividade relativa de luciferase, isto é, atua inibindo o promotor P105, enquanto nas células diferenciadas essa repressão é atenuada. O mesmo acontece com o fator PAX-6, embora em menor intensidade. O FOXI1, por sua vez, é capaz de ativar a atividade transcricional de HPV-18 nas células não diferenciadas e ainda com maior efeito nas células diferenciadas. Ambos os membros da família NF-E2

atuaram similarmente aumentando a atividade do promotor na condição dia 0 e, ao contrário, reprimindo no dia 5.

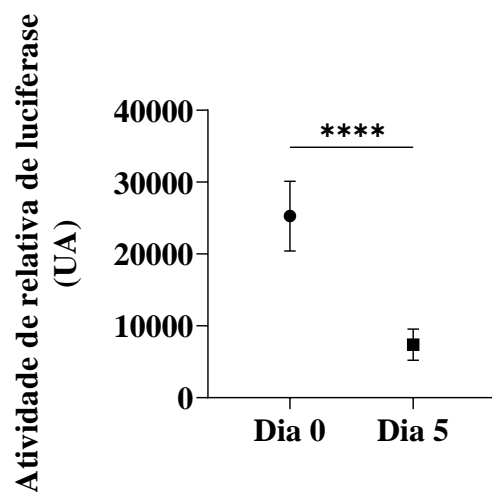


Figura 14. Atividade basal do promotor precoce de HPV-18 em células HaCaT não diferenciadas e diferenciadas. As células HaCaT não diferenciadas (dia 0) ou diferenciadas (dia 5) foram co-transfectadas com vetor recombinante pGL3-LCR HPV-18-Luc e vetor pCMV- β -Gal. A luminescência foi mensurada e normalizada pelos valores de do ensaio de atividade de β -galactosidase. Os valores estão representados pela média de desvio padrão de 3 experimentos independentes em que as co-transfecções foram realizadas em triplicata. Significância estatística: ****p<0,00005.

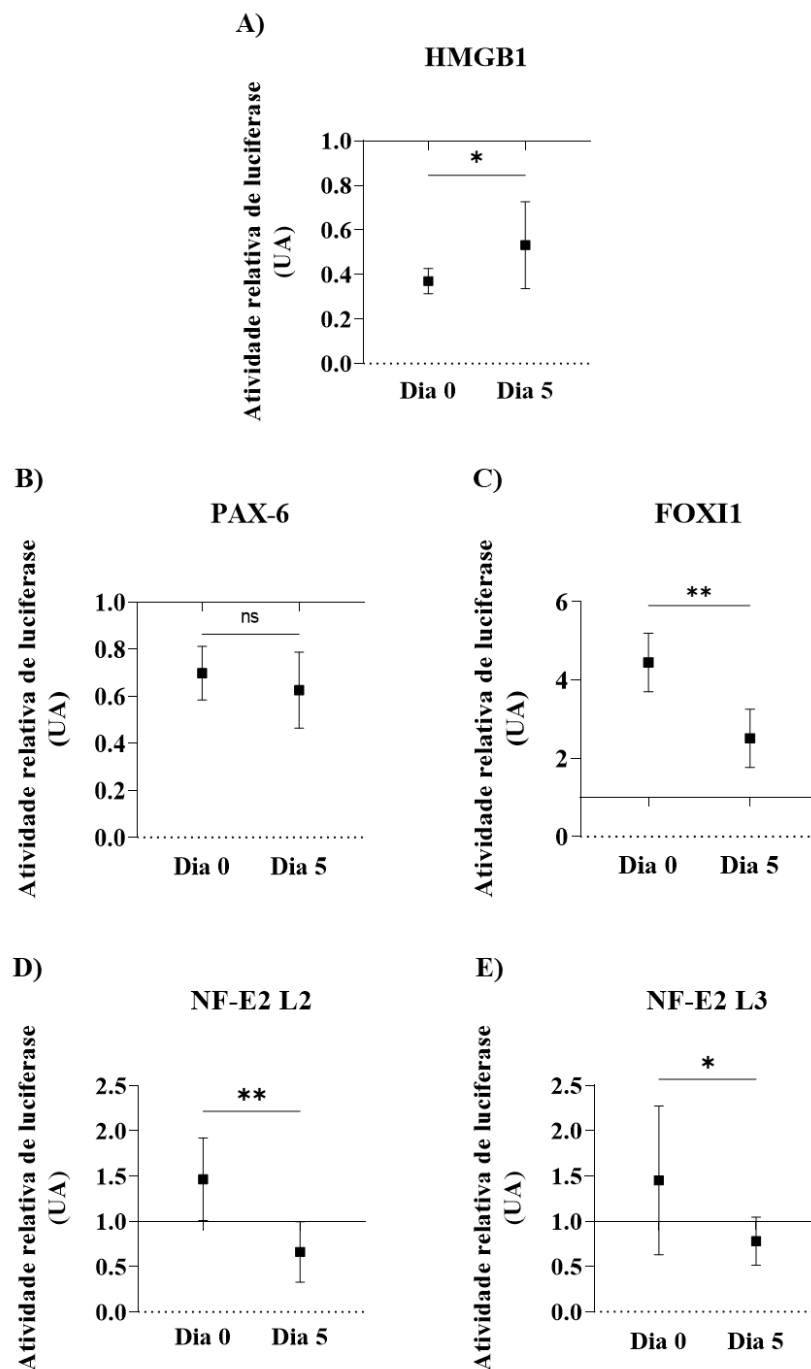


Figura 15. Impacto da expressão dos FTs sobre atividade transcricional de HPV-18 em células HaCaT não diferenciadas e diferenciadas. As células HaCaT não diferenciadas (dia 0) e diferenciadas (dia 5) foram co-transfectadas com plasmídeo de expressão FTs , com vetor recombinante pGL3-LCR HPV-18-Luc e o vetor pCMV- β -Gal. Os valores estão representados pela média e desvio padrão de 3 experimentos

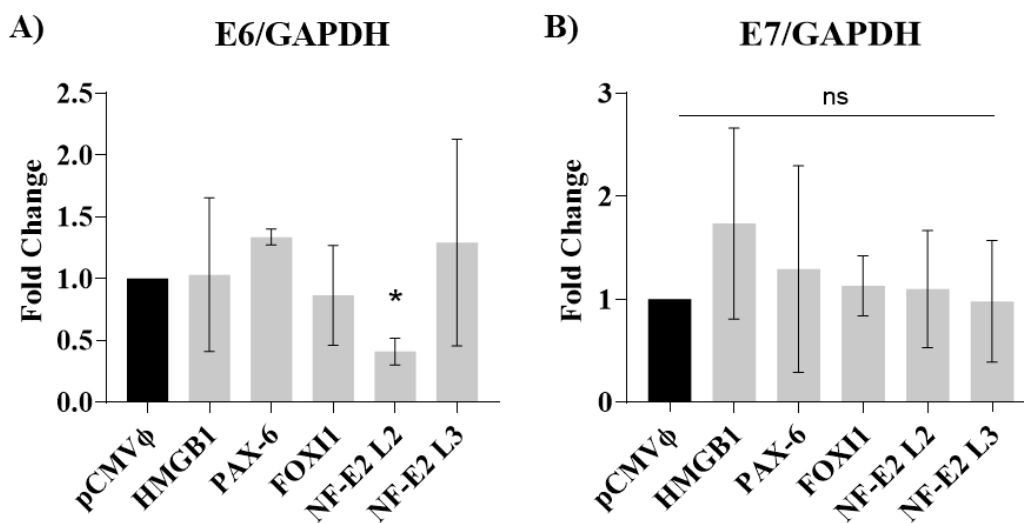
independentes em triplicata. Significância estatística: ns, não significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

6.7. Impacto dos FTs na Expressão de E6/E7

P105 do HPV-18 é o principal promotor na regulação da expressão dos genes precoces. Entre os genes virais precoces, os oncogenes são de grande relevância para o desfecho da infecção. Em vista do impacto da expressão ectópica dos FTs na atividade do promotor P105 (**figuras 13-15**), buscou-se avaliar a expressão de E6 e E7 após a superexpressão de cada um dos FTs em células transformadas HPV-18 positivas, HeLa e SW756.

Na **figura 16**, nota-se que o fator NF-E2 L2 foi capaz diminuir significativamente a expressão de *E6* nas duas linhagens testadas. Os demais FTs, apesar de ser possível observar algumas tendências, nenhum alterou de forma estatisticamente significativa a expressão de *E6* e *E7*. Comparando-se ambas as linhagens, a superexpressão de PAX-6 parece resultar um aumento no nível de mRNA de *E6*.

HeLa



SW756

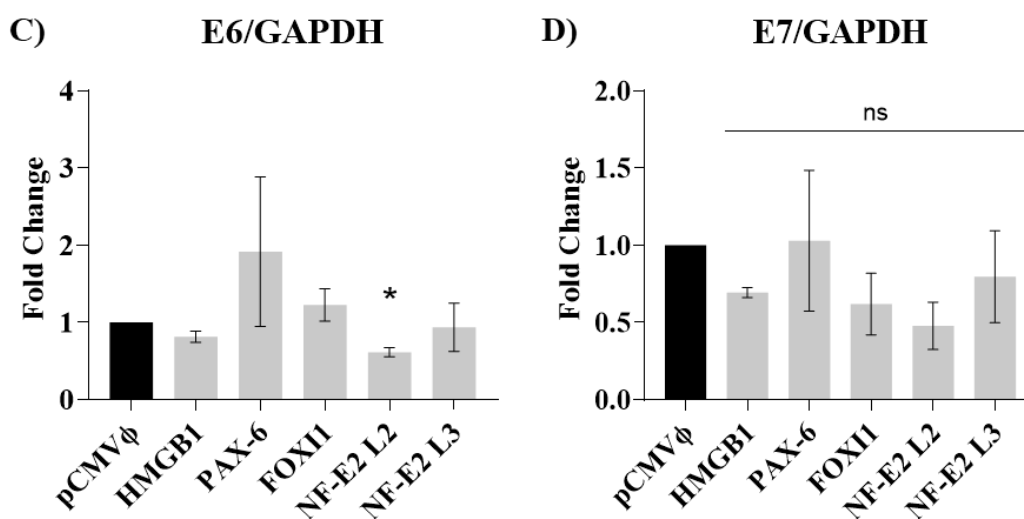


Figura 16. Efeito da expressão ectópica dos FTs na expressão dos oncogenes E6 e E7 nas linhagens transformadas. Após a transfecção das células HeLa e SW756 com cada um dos FTs, o RNA total foi extraído. A expressão de E6 e E7 de HPV-18 foi mensurada por PCR em tempo real e normalizada pelos níveis de GAPDH. Os valores estão representados pela média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. Significância estatística: ns, não significativo, * $p < 0,05$.

6.8. Expressão basal dos FTs nas diferentes linhagens com HPV-18

Nesta etapa, visou-se comparar os níveis de expressão dos FTs em linhagens de células primárias, células imortalizadas e células transformadas por HPV-18. Para tanto, utilizou-se: (1) queratinócitos humanos primários (PHK) como referência; (2) 18NCO e (3) FK18, ambas derivadas queratinócitos humanos imortalizados com genoma completo de HPV-18; (4) SW756, proveniente de carcinoma de células escamosas de colo uterino HPV-18 positivo; (5) HeLa, isoladas de adenocarcinoma de colo de útero HPV-18 positivo. A expressão dos FTs foi avaliada no extrato de proteína total das 5 linhagens por *western blotting* (**figura 17**).

Observa-se que HMGB1 é mais expresso nas linhagens HPV-18 positivas, 18NCO, FK18, SW756 e HeLa, do que nos queratinócitos primários, PHKs. De forma contrária, o fator PAX-6 somente foi detectado nos PHKs e, em menor intensidade, nas células imortalizadas, 18NCO. O FOXI1, por sua vez, apresentou-se com maior expressão nas linhagens tumorais, SW756 e HeLa, em comparação com as demais linhagens testadas. Da mesma forma, NF-E2 também está superexpresso nas linhagens transformadas em relação as linhagens apenas imortalizadas ou controle. Ademais, nota-se que todas as linhagens HPV-18 positivas exibiram a expressão de NF-E2, enquanto a linhagem primária não parece expressar.

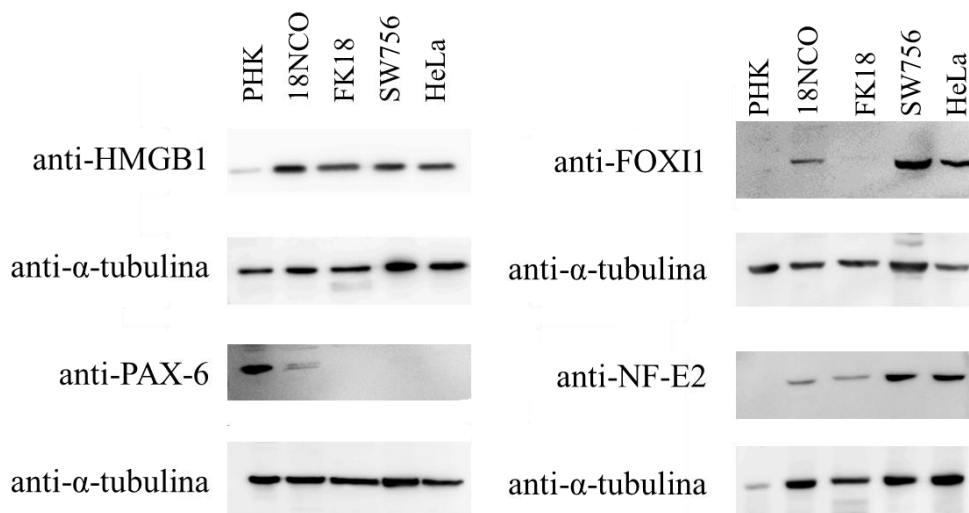


Figura 17. Nível de expressão dos FTs em diferentes linhagens celulares. As proteínas totais foram extraídas e fracionadas em SDS-PAGE e o nível das proteínas alvo foi analisado por *Western blotting* utilizando os anticorpos anti-HMGB1, anti-PAX-6, anti-FOXI1 e anti-NF-E2. Os níveis de α -tubulina foram utilizados como controle.

Complementarmente, os níveis de mRNA dos FTs foram avaliados por PCR em tempo real em queratinócitos primários (PHKs) e imortalizados com E6 e E7 de HPV-18 (HKs 18E6/E7) a fim de explorar uma possível correlação entre as oncoproteínas e a expressão desses fatores (**figura 18**). Com exceção do *NF-E2 L2*, todos os fatores apresentaram um aumento significativo na expressão em HKs 18E6E7 comparando-se com os PHKs não infectados.

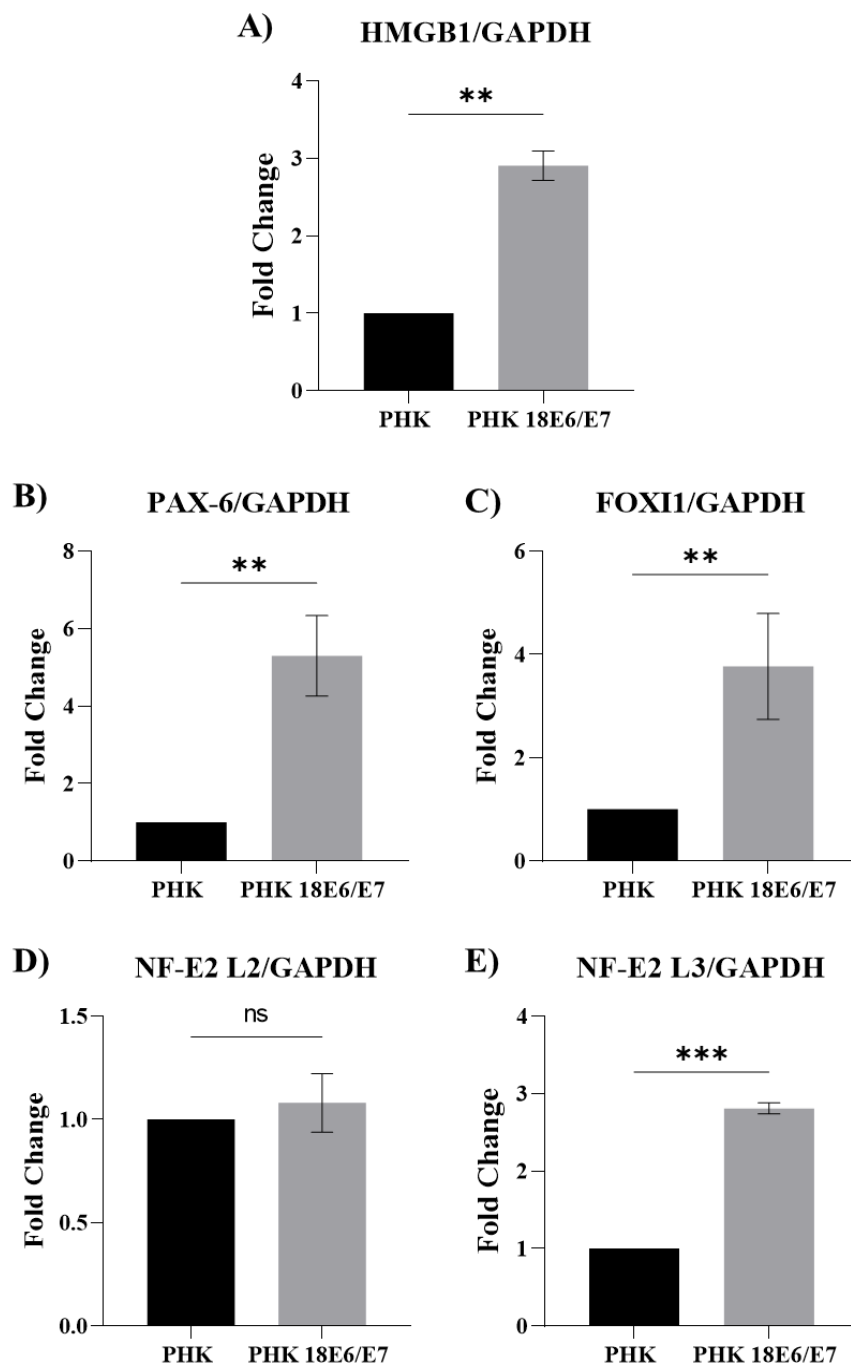


Figura 18. Níveis de mRNA dos FTs em relação a presença ou ausência das oncoproteínas. O RNA total foi extraído de queratinócitos primários (PHKs) e queratinócitos imortalizados com E6 e E7 de HPV-18 (HKs 18E6/E7). A expressão dos FTs foi mensurada por PCR em tempo real e normalizada pelos níveis de *GAPDH*.

6.9. Avaliação histológica da expressão dos FTs em culturas organotípicas de queratinócitos

Nesta etapa, o propósito foi investigar a expressão dos FTs nas diferentes camadas do tecido epitelial estratificado. Para tanto, foram utilizadas culturas organotípicas geradas a partir de queratinócitos primários ou queratinócitos imortalizados com as oncoproteínas de HPV-18. A **figura 19** evidencia um padrão diferencial de expressão dos fatores HMGB1, PAX-6 e NF-E2 comparando-se as duas condições. Enquanto a expressão dos FTs encontra-se mais limitada às camadas basais nas culturas organotípicas de queratinócitos primários, nos queratinócitos imortalizados a marcação está mais intensa e difundida entre todas as camadas.

A marcação de FOXI não foi possível até o momento por razões metodológicas, mas será realizada em breve.

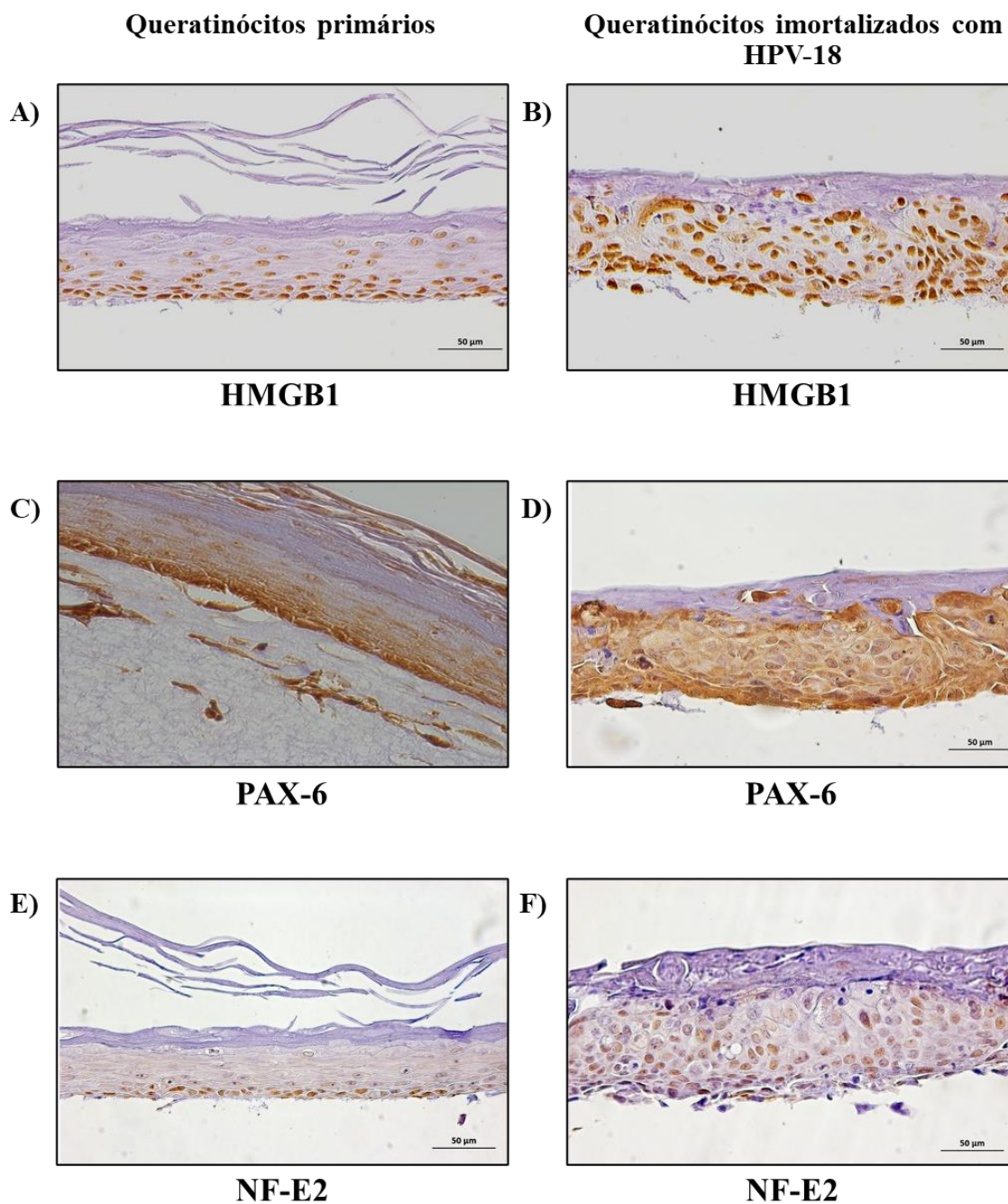


Figura 19. Avaliação da expressão dos FTs através das camadas do epitélio estratificado. Foram utilizadas culturas organotípicas derivadas de queratinócitos primários e de queratinócitos imortalizados com as oncoproteínas de HPV-18. A imuno-histoquímica foi então realizada para os FTs HMGB1, PAX-6 e NF-E2. As imagens são representativas de dois experimentos independentes.

6.10. Metilação

Com o objetivo de explorar os mecanismos epigenéticos de regulação transcricional, avaliou-se o padrão de metilação em 5 sítios da região proximal ao promotor precoce principal de HPV-18 (**figura 20a**). A **figura 20b** mostra uma redução na média da frequência de metilação nos cinco sítios analisados comparando as células diferenciadas com as células não diferenciadas.

A diminuição da metilação nesta região sugere uma maior facilidade de acesso dos FTs de transcrição à essa região conforme as células se diferenciam. Como a região analisada inclui o sítio proximal de ligação a E2, a menor frequência de metilação nessa sequência aumentaria a chance de interação com E2, o que reprimiria a atividade transcricional dos genes precoces nas células diferenciadas.

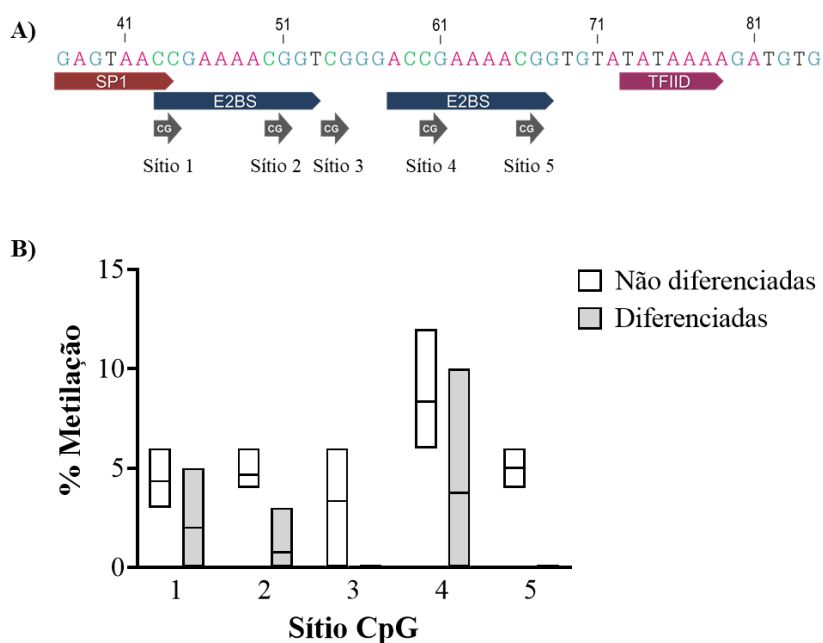


Figura 20. Avaliação do padrão de metilação do promotor precoce de HPV-18 durante a diferenciação. Comparação do padrão de metilação em sítios CpG proximais ao promotor precoce em células HaCaT indiferenciadas e diferenciadas transfectadas com LCR de HPV-18. O nível de metilação da região nucleotídica 44 a 67 foi analisado e a frequência de metilação nos sítios CpG estão representadas pela média e quartis superior e inferior.

7. DISCUSSÃO

Os queratinócitos humanos, células alvo dos HPVs, possuem algumas complexidades para seu cultivo *in vitro*. De forma geral, essas células dependem do co-cultivo com fibroblastos para um crescimento eficiente em cultura, além de suportarem um baixo número de passagens antes de diferenciar e atingirem a senescência (TENCHINI; RANZATI; MALCOVATI, 1992). Além dessas características, a experimentação em queratinócitos diferenciados é dificultada, já que estas células apresentam redução da proliferação, interrupção do ciclo celular na fase G0/G1, e morrem após cerca de 96 horas após exposição ao cálcio, não permitindo a investigação por longo prazo (ZHOU et al., 1996). Em vista dessas limitações, neste estudo, utilizou-se a linhagem de queratinócitos humanos espontaneamente imortalizados, células da linhagem HaCaT, amplamente empregadas para estudos de diferenciação de queratinócitos (BOUKAMP et al., 1988; DEYRIEUX; WILSON, 2007).

Assim como nos queratinócitos primários, as células HaCaT, quando cultivadas em baixa concentração de cálcio, permanecem em um estado altamente proliferativo e possuem pouco contato célula-célula (MICALLEF et al., 2009). Em resposta ao aumento da concentração de cálcio, essas células aumentam as conexões intercelulares e passam por alterações morfológicas relacionadas a forma e aderência das células (KOLLY; SUTER; MÜLLER, 2005). Ainda, se retornarem a serem cultivadas em meio com baixa concentração de cálcio, as células HaCaT diferenciadas são capazes de reverter para um estado semelhante ao basal, tanto morfológicamente quanto bioquimicamente, e permanecerem estáveis neste estado basal (DEYRIEUX; WILSON, 2007).

Para confirmar a adequada reprodução do modelo de diferenciação epitelial utilizando as células HaCaT, averiguou-se as alterações morfológicas e a expressão de marcadores da diferenciação nessas células após a exposição a altas concentrações de cálcio (**figura 2**). Além disso, avaliou-se os níveis da expressão de proteínas comumente utilizadas como marcadores da diferenciação epitelial, uma vez possuem funções específicas em cada camada do epitélio estratificado (**figura 3**) (EICHNER; SUN; AEBI, 1986).

Em conjunto, os resultados obtidos mostraram que as células cultivadas em KSFM com concentração baixa de cálcio podem ser consideradas como representativas da camada basal do epitélio. Já as células cultivadas durante 5 dias em alta concentração de cálcio podem representar as camadas não suprabasais e diferenciadas do epitélio estratificado. Dessa forma, foi possível corroborar outros achados de que células HaCaT cultivadas em baixa e alta concentração de cálcio mimetizam células não diferenciadas e diferenciadas, respectivamente.

No epitélio estratificado, a transição de uma célula basal até se tornar um corneócito é um processo complexo que requer a ativação e inativação simultânea de uma ampla variedade de genes que devem ser expressos no momento e no local corretos (ECKERT; WELTER, 1996). Muitos desses genes são regulados por uma vasta rede de fatores de transcrição (QU; YI; ZHOU, 2019; TOMIC-CANIC et al., 1998). Apesar de que o padrão de expressão de muitos genes-chave em cada camada já seja conhecido, maior aprofundamento de quais os FTs são relevantes para essa regulação continua sendo uma área ativa de investigação (FINNEGAN et al., 2019).

Assim, buscou-se com o ensaio de interação proteína/DNA (*Protein/DNA combo array*) fazer uma análise abrangente dos FTs presentes nos extratos nucleares dos queratinócitos da linhagem HaCaT não diferenciados e diferenciados. Dentre os 30 FTs encontrados nesses extratos, observamos alguns bem descritos na regulação da diferenciação de queratinócitos, como: AP-1, SP-1 e membros da família GATA, novamente corroborando a eficácia do modelo de diferenciação utilizado (**figura 5-7**).

A região LCR do genoma dos HPVs contém uma série elementos reguladores capazes de controlar a transcrição viral (O'CONNOR; CHAN; BERNARD, 1995). Os FTs da célula hospedeira se ligam nessas sequências e podem ativar e/ou reprimir a atividade do promotor. Já foi descrito que a interação de alguns desses FTs com a LCR pode ser dependente do estado de diferenciação da célula (CARSON; KHAN, 2006a; WOOLDRIDGE; LAIMINS, 2008). Entre eles, estão EPOC-1/Skn-1a, C/EBP- α , - β , c-MYB, NF1, NFATx, Pax-5, e WT1 (KAJITANI et al., 2012). Em vista disso, foi realizada a análise *in silico* a fim de identificar quais dos FTs encontrados no ensaio de interação proteína/DNA poderiam ter sequências consenso ao longo da LCR (**figura 8 e figura 10**). Assim, constatou-se a presença de sítios putativos de ligação de 15 FTs: AP-

1, AP-3, NF-E2, PAX-4, PAX-6, PAX-8, EGR, c-Rel, E47, GATA-1, GATA-2, FOXI1; HMG, E12, MT-Box.

Com base na presença diferencial desses FTs, resultados da predição *in silico*, e critérios metodológicos, prosseguiu-se o estudo com os fatores HMG, PAX-6, FOXI1 e NF-E2 (**figura 9**).

6.1. Fator de transcrição HMGB1

O HMGB1 foi o membro escolhido da família HMG (*high-mobility group*) para avançar na investigação. Esta proteína possui diversas funções biológicas atuando tanto no compartimento intracelular como fator de transcrição, como sendo secretado extracelularmente na forma de citocina. Além de ser um importante imunossupressor, também possui um papel em processos como migração celular, inflamação e diferenciação (LOTZE; TRACEY, 2005). O HMGB1 possui domínios de ligação ao DNA realizando a regulação de genes principalmente relacionados ao ciclo celular (TRIPATHI; SHRINET; KUMAR, 2019). Entretanto, até o momento havia sido descrita a ligação apenas do membro HMG-I(Y) à LCR de HPV-18 integrando um complexo ativador da transcrição com AP-1 (BOUALLAGA et al., 2003). Aqui, os ensaios de imunoprecipitação de cromatina demonstraram também a ligação de HMGB1 (**figura 11b**).

Do ponto de vista funcional, os ensaios repórter de luciferase indicaram que HMGB1 inibe a atividade do promotor de forma dose-dependente em células de câncer de colo do útero HPV negativas (células C33A) (**figura 13a**). Em queratinócitos imortalizados espontaneamente sem HPV (HaCaT), HMGB1 também suprimiu a atividade transcricional. Como esperado, essa inibição foi atenuada nos queratinócitos diferenciados (**figura 15a**), uma vez que níveis desta proteína são menores nestas células diferenciadas em comparação as não diferenciadas (**figura 5**). Em concordância, os dados de imuno-histoquímica também evidenciaram maior presença de HMGB1 nas camadas basais, não diferenciadas, de queratinócitos primários ou imortalizados sem HPV (**figuras 7 e 19**). Em conjunto, esses resultados sugerem que a expressão e, possivelmente a atividade, de HMGB1 seja alterada conforme o estado de diferenciação dos

queratinócitos. De fato, um estudo recente conduzido em HaCaT mostrou que a inibição da atividade de HMGB1 acelera o processo de diferenciação dessas células (TANAKA et al., 2020). Assim, é possível que HMGB1 seja importante para a manutenção do estado não diferenciado dos queratinócitos não infectados por HPV.

Contudo, essa regulação parece estar alterada nos queratinócitos imortalizados por E6/E7 de HPV-18, uma vez que a cultura organotípica derivada dessas células revelou uma marcação de HMGB1 mais intensa e difusa entre as camadas, inclusive nas mais diferenciadas, em comparação com a expressão mais limitada à camada basal observada nas culturas 3D derivadas de queratinócitos primários (**figura 19**). Complementarmente, foi possível constatar maiores níveis de mRNA de *HMGB1* em queratinócitos que expressam os oncogenes do que nos queratinócitos não infectados (**figura 18**). Esse mesmo padrão de marcação havia sido observado em estudo prévio utilizando culturas organotípicas de queratinócitos primários e imortalizados com E6 e/ou E7 de HPV-16 (MORALE et al., 2018). Assim, é plausível sugerir que E6/E7 de HPV-18 possa estar influenciando na regulação de HMGB1 no decorrer do processo de diferenciação. Em contrapartida, não observamos alteração da expressão dos oncogenes E6 e E7 frente a superexpressão de HMGB1 nas linhagens transformadas HPV-18 positivas (**figura 16**). Este fator pode, então, estar regulando a expressão de outros FTs que anulem seu efeito inibitório sobre a transcrição viral, ou ainda não ter mais um efeito proeminente na regulação gênica viral após a tumorigênese.

Outros papéis da superexpressão de HMGB1 foram discutidos para vários tipos de câncer, incluindo câncer de colo do útero, no qual foi correlacionada com tumores mais agressivos, presença de metástase e recidiva (TANG et al., 2010; XU et al., 2015). Em tumores HPV positivos, o HMGB1 está envolvido com o estímulo inflamação crônica causada pela infecção, podendo assim contribuir para a progressão do tumor (PANG et al., 2014; WENG et al., 2014). No entanto, os mecanismos específicos subjacentes a esses achados ainda não estão claros e requerem estudos adicionais. De fato, conforme observado na **figura 17**, a avaliação dos níveis proteicos de HMGB1 em amostras imortalizadas por HPV-18 ou transformadas HPV-18 positivas confirmou o aumento desta proteína na presença de HPV-18 em comparação aos queratinócitos não infectados.

6.2. Fator de transcrição PAX-6

A família *paired box* (PAX) codifica um grupo de fatores de transcrição relacionados à regulação do crescimento e formação de tecidos e órgãos durante desenvolvimento embriogênico (LI; ECCLES, 2012; MANSOURI; HALLONET; GRUSS, 1996). Em especial, o PAX-6 é um fator de transcrição evolutivamente conservado e essencial para o desenvolvimento adequado do olho, sistema nervoso central, epitélio esquelético craniofacial, olfatório e pâncreas (DOHRMANN; GRUSS; LEMAIRE, 2000; DORÀ et al., 2008; HAUBST et al., 2004). Este fator está no topo da rede de sinalização que controla a especificação do tipo celular (CVEKL; CALLAERTS, 2017). Em tecidos adultos, sua expressão é fundamental para manutenção do estado indiferenciado e proliferativo das células-tronco (CVEKL et al., 1999; GARCÍA-VILLEGAS et al., 2009).

No ensaio de interação proteína/DNA (*array*), PAX-6 foi o fator que apresentou o maior *fold-change* entre as duas condições, sendo exclusivamente expresso nas células não diferenciadas e o com o maior nível de presença neste extrato proteico (diminuição de 0.00012 vezes em comparação às células diferenciadas) (**figuras 5-7**). Até o momento, não existem estudos sobre PAX-6 ou outros membros desta família no que concerne à diferenciação de queratinócitos.

PAX-6 foi capaz de se ligar diretamente à LCR de HPV-18 e sua superexpressão progressivamente inibiu a atividade transcricional do promotor precoce em células de câncer de colo do útero HPV negativas (C33-A) (**figuras 11 e 13**). Em queratinócitos, a expressão ectópica de PAX-6 também reduziu similarmente a atividade promotora tanto em células não diferenciadas com em células diferenciadas, demonstrando a importância desta proteína como um regulador negativo da transcrição de HPV-18 (**figura 15**).

Na **figura 17**, observou-se a expressão mais intensa de PAX-6 somente nos queratinócitos primários e, em menor quantidade, em uma das linhagens de queratinócitos imortalizados pelo genoma completo de HPV-18, 18NCO. Entretanto, esta proteína não foi detectada em ambas as linhagens tumorais HPV-18 positivas (HeLa e SW756). De fato, os trabalhos na literatura demonstram que os membros da família PAX não são expressos nas células de diversos tipos de câncer e estudos moleculares

evidenciam que esses fatores possuem funções de genes supressores tumorais controlando a proliferação e apoptose. Recentemente, outro membro desta família, PAX-9 já foi correlacionado com a progressão de câncer de colo do útero. Em pesquisa com diferentes linhagens de células tumorais HPV negativa (C-33A), HPV-16 positivas (CaSKi e SiHa), e HPV-18 positiva (HeLa), observou-se que a expressão PAX-9 foi menor nessas linhagens em comparação com células epiteliais do colo do útero. Ademais, os tumores gerados em camundongos com células CasKi apresentaram menor expressão de PAX-9 no tecido tumoral em comparação ao tecido normal adjacente (LIU et al., 2021). A hipermetilação do promotor de PAX-1 também já foi identificada em lesões de colo do útero HPV-16 positivas. O maior nível de metilação foi relacionado com menor transcrição de PAX-1 e pior prognóstico (ZHANG et al., 2020).

Ainda não havia sido relatada qualquer associação direta de membros da família PAX com a infecção por HPV. Embora não houve alteração significativa na expressão dos oncogenes frente a superexpressão de PAX-6, queratinócitos imortalizados com E6/E7 de HPV-18 expressam quantidade elevadas de *PAX-6* em relação aos queratinócitos primários (**figuras 15 e 18**) que entretanto não se correlaciona com os níveis proteicos desta nas células transformadas estudadas. Da mesma forma, foi observada a intensa marcação de PAX-6 difusa entre todas as camadas da cultura organotípica de queratinócitos 18E6/E7, enquanto o tecido formado a partir de queratinócitos primários apresentou menor expressão e mais limitada às camadas basais (**figura 19**). Estudos adicionais em amostras de câncer de colo de útero são fundamentais para avaliar se a expressão diferencial de PAX-6 ocorre de fato de acordo com o estado de transformação celular bem como com a presença ou ausência de HPV.

6.3. Fator de transcrição FOXI1

O fator de transcrição FOXI1 é pertencente a superfamília FOX (*forkhead box*), formada por mais de 2000 membros, que regulam a transcrição se ligando ao DNA em motivos bem conservados (BENAYOUN; CABURET; VEITIA, 2011). Esse FT é capaz de se ligar a cromossomos compactados, alterando o estado de condensação da cromatina na região na qual interage (YAN et al., 2006).

Sítios de ligação a FOX haviam sido preditos por estudos *in silico* na LCR de diferentes tipos de HPV dos gêneros alpha, beta e gama, demonstrando se tratar de uma sequência conservada entre os HPVs (GARCÍA-VALLVÉ et al., 2006). Com o ensaio de imunoprecipitação de cromatina, a ligação do membro FOXI1 na LCR de HPV-18 foi confirmada (**figura 11**).

Diferentemente dos demais fatores explorados neste trabalho, o FOXI1 foi um dos poucos detectados exclusivamente nas células diferenciadas (**figuras 5-7**). Além disso, outra particularidade deste fator foi seu efeito na ativação da atividade transcricional do promotor precoce de HPV-18 nas células C-33A, bem como nos queratinócitos HaCaT (**figuras 13 e 15**). Contudo, foi possível notar que essa ativação sofreu uma atenuação nos queratinócitos diferenciados (**figura 15**). Até o momento, não existem relatos na literatura correlacionando as funções especificamente de FOXI1 com HPV. Contudo, já foi descrita essa associação com outros membros da família, como FOXA1 e FOXM1. Estudos realizados previamente no grupo demonstraram que FOXA1 se liga na LCR ativando a atividade transcricional dos HPVs-16 e -18 de alto risco, e do HPV-6 de baixo risco (MEASSO DO BONFIM et al., 2015; SICHERO; SOBRINHO; VILLA, 2012). Além disso, já foi sugerido que FOXM1 é um alvo potencialmente importante para a transformação mediada pelos oncogenes E6 e E7 de HPV-16 (CHEN et al., 2014; JAISWAL et al., 2015).

A expressão de FOXC1 em câncer de colo do útero e de FOXD1 em câncer de cabeça e pescoço já foi demonstrada estar associada com estadiamentos clínicos mais avançados, alto grau de malignidade e pior prognóstico (LI et al., 2021; WANG et al., 2018). Não foi possível encontrar trabalhos sobre FOXI1 e tumores relacionados com infecções por HPV. Entretanto, a expressão aumentada de FOXI1 já foi detectada em carcinoma renal e câncer gástrico (SUN et al., 2017; TONG; HU, 2021). De acordo, na **figura 17**, a maior expressão de FOXI1 foi também observada nas linhagens transformadas por HPV.

Ademais, FOXI1 não alterou a expressão dos oncogenes E6 e E7 das células HeLa e SW756 (**figura 16**). Em contrapartida, apresentou-se superexpresso nos queratinócitos imortalizados com E6/E7 em relação aos queratinócitos primários, além de ser detectado em uma das linhagens imortalizadas com genoma completo de HPV-18 por *western blotting* (**figuras 17 e 18**).

6.4. Os fatores de transcrição relacionados a NF-E2

Os fatores relacionados ao NF-E2 (*Nuclear Factor Erythroid-Derived 2*) compõe uma família fatores de transcrição conservados em vertebrados de quatro membros: p45 NF-E2, NRF1, NRF2 ou NF-E2 L2 e NRF3 ou NF-E2 L3 (SHELTON; JAISWAL, 2013). Esses fatores são importantes durante o desenvolvimento embrionário e funcionam em resposta ao estresse ambiental (ANDREWS, 1998). Dentre os membros desta família, sabe-se que NF-E2 p45 e NF-E2 L2 possuem especificidades de ligação ao DNA semelhantes (KATSUOKA; YAMAMOTO, 2016). No ensaio de interação proteína/DNA (*array*), detectou-se a ligação no motivo consenso de NF-E2 exclusivamente em queratinócitos não diferenciados, mas sem ser possível discernir entre um dos membros (**figuras 5-7**). Assim, optou-se por seguir a investigação funcional com dois membros, NF-E2 L2 e NF-E2 L3.

O fator NF-E2 L2 mantém o equilíbrio redox da célula induzindo a transcrição de uma série de genes capazes de combater os efeitos nocivos do estresse oxidativo (Ma 2013). Este potente ativador transcricional reconhece e se liga ao elemento responsivo antioxidante (ARE) nos promotores de genes alvo (JOHNSON et al., 2008; LEE; JOHNSON, 2004). Conseqüentemente, essa ligação leva à indução da expressão de diversos genes citoprotetores. Em queratinócitos, NF-E2 L2 pode ser induzido por irradiação UV protegendo contra os danos (KANNAN; JAISWAL, 2006).

Já os papéis fisiológicos de NF-E2 L3 ainda são menos conhecidos, entretanto, sua correlação com câncer já foi reportada. Por meio de estímulos ainda não identificados, o NF-E2 L3 transcola-se para o núcleo e exerce sua atividade transcricional também através de ARE ou de elementos de reconhecimento Maf (MARE) por heterodimerização com pequenas proteínas MAF (CHOWDHURY et al., 2017). Em queratinócitos basais, NF-E2 L3 tem uma função pró-apoptótica em resposta a agentes que danificam as células, prevenindo o acúmulo de células mutadas na epiderme (SIEGENTHALER, 2017). Sendo assim, estudos apontam que NF-E2 L3 possa ter um papel de supressor tumoral na pele.

Nos ensaios funcionais, observou-se que NF-E2 L2 inibiu a atividade transcricional do promotor precoce de HPV-18 em células C-33A, enquanto o aumento progressivo de NF-E2 L3 atenuou a ativação causada pelas menores quantidades (**figura 13**). Em queratinócitos, esses fatores apresentaram um efeito dependente do estado de diferenciação das células. Similarmente, ambos ativaram a transcrição nos queratinócitos não diferenciados e, ao contrário, suprimiram a atividade transcricional nos queratinócitos diferenciados (**figura 15**).

O NF-E2 L2 foi o único dos FTs testados capaz de causar uma redução significativa nos níveis de E6 nas células tumorais HeLa e SW756 (**figura 16**). Entretanto, não há alterações nos níveis de mRNA de NF-E2 L2 de acordo com a expressão das oncoproteínas. Já NF-E2 L3 está aumentado nas HK 18E6E7 em relação as PHK.

Apenas a interação entre NF-E2 L2 e os mecanismos de infecção por HPV foi descrita até o momento. Em células de câncer oral, foi visto que a oncoproteína E7 de HPV-16 promove o recrutamento de NF-E2 L2 para o sítio ARE no promotor de pirina, uma proteína que também atua como um sensor de estresse oxidativo (CARRILLO-BELTRÁN et al., 2020). A indução desta via aumenta transição epitelial-mesenquimal e a migração celular. Além disso, foi demonstrado que a proteína viral E1 interage fisicamente com o principal regulador negativo de NF-E2 L2, o KEAP-1, assim aumentando sua atividade antioxidante (ECKHARDT et al., 2018).

8. CONCLUSÕES

- Após comparar o nível de 345 FTs em queratinócitos não diferenciados e diferenciados, foram detectadas 18 proteínas presentes em ambas as condições, 9 exclusivamente presentes nos queratinócitos não diferenciados e 3 exclusivamente presentes no queratinócitos diferenciados. Os fatores com os menores valores de *fold-change* foram: PAX-6, AP-1, PAX-8 e NF-E2; e com os maiores valores foram: HIF-1, FOXI1, SP-1.
- O estudo *in silico* indicou quais FTs diferencialmente presentes entre as duas condições testadas possuem sítios putativos consenso na LCR de HPV-18, são eles: AP-1, AP-3, NF-E2, PAX-4, PAX-6, PAX-8, EGR, c-Rel, E47, GATA-1, GATA-2, FOXI1; HMG, E12, MT-Box. Destes, os fatores HMG, PAX-6, FOXI1 e NF-E2 foram selecionados para prosseguir na investigação.
- A ligação de HMGB1, PAX-6, FOXI1 e NF-E2 à LCR de HPV-18 foi confirmada por imunoprecipitação de cromatina.
- O nível de HMGB1 reduziu cerca de 80% sua expressão em células diferenciadas em relação às células não diferenciadas. HMGB1 foi capaz de suprimir a atividade transcricional do promotor precoce de HPV-18 em células de câncer de colo do útero HPV negativas. Em queratinócitos, essa inibição foi atenuada após a diferenciação, indicando uma possível associação entre a atividade de HMGB1 e o estado de diferenciação. Ainda, a expressão de HMGB1 se mostrou alterada de acordo com a expressão das oncoproteínas de HPV-18 em queratinócitos nos ensaios de PCR em tempo real, *western blotting* e imuno-histoquímica.

- PAX-6 apresentou o maior *fold-change* comparando-se sua presença queratinócitos diferenciados e não diferenciados. Sua interação com a LCR de HPV-18 parece inibir a atividade transcricional do promotor precoce em células de câncer de colo do útero HPV negativas. Em queratinócitos, a expressão também reduz a atividade do promotor tanto em células não diferenciadas com em células diferenciadas. A expressão de PAX-6 não foi observada nas linhagens tumorais. Além disso, a expressão de PAX-6 aumenta significativamente na presença das oncoproteínas.
- FOXI1 foi encontrado exclusivamente nos queratinócitos diferenciados. Ademais, causou a ativação da atividade transcricional do promotor precoce de HPV-18 nas células C-33A, bem como nos queratinócitos. Sua expressão foi detectada em maior quantidade nas células transformadas em relação aos queratinócitos imortalizados ou primários. Finalmente, apresentou-se superexpresso nos queratinócitos imortalizados com E6/E7 em relação aos queratinócitos primários.
- NF-E2 foi detectado exclusivamente nos queratinócitos não diferenciados. Enquanto NF-E2 L2 inibiu a atividade transcricional do promotor precoce de HPV-18 em células C-33A, o aumento progressivo de NF-E2 L3 atenuou a ativação causada pelas menores quantidades. Em queratinócitos, esses fatores apresentaram efeito similares, ambos ativaram a transcrição nos queratinócitos não diferenciados e, ao contrário, suprimiram a atividade transcricional nos queratinócitos diferenciados. O NF-E2 L2 foi o único dos FTs testados capaz de causar uma redução significativa nos níveis de E6 nas células tumorais HeLa e SW756. Entretanto, enquanto os níveis de mRNA de NF-E2 L2 não se modificou significativamente com a expressão das oncoproteínas, NF-E2 L3 aumenta nas HK 18E6E7 em relação as PHK.

CAPÍTULO II

THE ROLE OF EVER_{1/2} IN B-HPV TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY

This research was accomplished in collaboration with the Infections Cancer Infections and Cancer Biology Group led by Dr. Massimo Tommasino at the International Agency for Research on Cancer (IARC) in Lyon, France

1. ABSTRACT

Cutaneous human papillomavirus (HPV) types from the beta (β) genus are ubiquitously distributed throughout the human body and may be part of the commensal flora. The association of β -HPVs and the development of cutaneous squamous cell carcinomas (cSCC) was initially reported in patients with the rare genetic disorder *Epidermodysplasia verruciformis* (EV). About half of EV patients harbor mutations within the *TMC6* or *TMC8* genes which encode EVER1 and EVER2 proteins, respectively. It was recently suggested that among the general population EVER1/2 may act as a restriction factor to β -HPV infections. However, the exact mechanism underlying these findings is yet to be fully elucidated. Hence, the purpose of this study was to shed new light on host-virus interactions regarding the interplay between EVER proteins and β -HPVs transcriptional activity. Therefore, we initially overexpressed EVER1 and/or EVER2 in immortalized human keratinocytes and observed the activation of the HPV-38 early promoter with increasing amounts of EVER1 or EVER2. Next, we evaluated the transcriptional activity of β 1-HPV-5, β 2-HPV-38, and β 3-HPV-49 in cell lines derived from two EV patients with depleted *EVER2* expression (Evpt4 and Evpt5). We found a non-statistically significant increase in the transcriptional activity of all HPV types using both cell lines compared to normal keratinocytes. Moreover, we explored the effect of UV irradiation in this context. In general, we observed a repressive effect of UV irradiation on HPV-5 and -49 promoters' activity in normal keratinocytes which was attenuated when using Evpt4 keratinocytes. In contrast, besides the repressive effect of UV exposure on HPV-38 promoter activity in normal keratinocytes, there was a 9.3-fold increment on transcription post-UV irradiation in the EVER2-null keratinocytes. Further experiments should be conducted to depict the mechanisms involved in these findings. Expanding this knowledge will contribute to a better understanding of the biological properties of β -HPVs and the pathogenesis of their associated diseases.

2. INTRODUCTION

2.1. Clinical relevance of Beta-HPVs

Human papillomavirus (HPV) are grouped into 5 genera (Alpha [α]-, Beta [β]-, Gamma [γ]-, Mu [μ]-, and Nu [ν]-HPVs) based on the identity of the *L1* major capsid gene sequence (VAN DOORSLAER et al., 2017). Additionally, HPVs are classified as cutaneous or mucosal according to their tropism (BERNARD et al., 2010). The β genus comprises more than 50 cutaneous HPV types which are ubiquitously distributed throughout the human body and may be part of the commensal flora (<http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>).

Cutaneous HPVs have been associated with a variety of clinical manifestations including common warts, plantar warts, plane warts, condyloma acuminatum, and Bowenoid papulosis. Moreover, β -HPVs are associated with non-melanoma skin cancer (NMSC), including cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) and cutaneous basal cell carcinoma (cBCC), the most common cancer in Caucasians with an incidence that is increasing globally (LOMAS; LEONARDI-BEE; BATH-HEXTALL, 2012).

The association between β -HPVs and skin cancer was first reported in patients with *epidermodysplasia verruciformis* (EV), a rare autosomal recessive skin disorder (ORTH, 2006a). EV patients develop precancerous lesions (actinic keratoses) which frequently progress to malignant transformation and become invasive NMSC, particularly in UV-exposed regions (BURGER; ITIN, 2014). Approximately 90% of all cutaneous SCCs among EV patients harbor β -HPV types 5 or 8, suggesting that β -HPVs might act as a co-carcinogen, by potentiating the deleterious effects of other carcinogens, such as UV radiation, at early stages of carcinogenesis (JABLONSKA; DABROWSKI; JAKUBOWICZ, 1972).

Several studies evidence that the increased susceptibility to β -HPVs clinically relevant infections in EV patients is related to mutations in EVER genes (DE JONG et al., 2018). The products of these genes seem to act as a natural barrier to β -HPV DNA replication in non-EV individuals (LAZARCZYK et al., 2009a). However, to this date,

the exact role of EVER1 and EVER2 in the context of β -HPV infections has not been fully elucidated.

2.2. EVER 1/ 2 and their role in HPV-infected keratinocytes

Since the identification of the susceptibility loci at chromosome 17 (EV1) and chromosome 2 (EV2), loss of functions mutations within *TMC6* and *TMC8* (also named *EVER1* and *EVER2*) genes were identified in approximately 75% of EV patients across the world (RAMOZ et al., 2000, 2002). Both genes belong to a larger gene family highly conserved named transmembrane channel-like (TMC) (KURIMA et al., 2003). These proteins assemble a transmembrane trimeric complex with the ZnT1 protein located at the endoplasmic reticulum (ER), where together are responsible for accurate zinc traffic (LAZARCZYK et al., 2008). *TMC6* and *TMC8* are normally expressed in several cell types including keratinocytes and lymphocytes (LAZARCZYK et al., 2012).

The pathogenic consequence of TMC mutations is yet to be fully elucidated. It was suggested that loss of the EVER/ZnT-1 (zinc transporter-1 protein) complex impairs zinc transferring from the cytoplasm into the ER lumen, which leads to an accumulation of zinc at the cytoplasm and indirectly inside the nucleus (LAZARCZYK et al., 2008). Zinc imbalance could then modify the activities of several key cellular proteins, such as enzymes, signal transduction proteins, and transcription factors (TFs). For this reason, some studies indicate that the control of cellular zinc homeostasis may constitute a natural antiviral barrier. More specifically, zinc deregulation seems to be crucial for genital and cutaneous HPVs persistence. It was already demonstrated that E5 and E8 from genital HPVs are capable of suppressing the EVER/ZnT-1 complex in keratinocytes. Since both *E5* and *E8* genes are missing among cutaneous HPVs genomes, this could explain, at least in part, the higher susceptibility to β -HPVs infection among EVER-deficient cells (LAZARCZYK; FAVRE, 2008).

Furthermore, the EVER/ZnT1 may also have a role in regulating HPV gene expression through the modulation of different TFs activities. For instance, it was shown that the ZnT1/EVER complex suppresses the activity of the AP-1 complex in keratinocytes (LAZARCZYK et al., 2008). The AP-1 members, specially c-Jun, are

critical for the activation of the viral transcriptional activity besides having an important role in modulating the expression of cellular genes relevant to viral maintenance (KIM et al., 2006; KYO et al., 1997). HPV-16 E5 protein binds to the EVER/ZnT1 complex blocking their negative regulation of c-Jun activity in human keratinocytes. Altogether, these data indicate that EVER suppression, either by α -HPV E5 proteins or due to TMC mutations in β -HPVs infected cells may be an important step for the success of viral infections (LAZARCZYK et al., 2008).

Therefore, a better understanding of the interplay between EVER proteins and HPVs will potentially shed new light on host-virus interactions. Further investigations regarding the molecular mechanism of EVER as a restriction factor for clinically relevant β -HPV infections would contribute to elucidating the natural history of these viruses and clarify their pathological implications and, especially, their role in promoting carcinogenesis. Ultimately, this knowledge could provide a new target for the management of β -HPV infections and associated diseases.

2.3. Significance

Several epidemiological and biological studies support a possible correlation between β -HPVs infections and carcinogenesis. The E6 and E7 oncoproteins from some β -HPV types have been shown to disrupt fundamental cellular processes intimately associated with cellular transformation, such as proliferation, apoptosis, and differentiation. It is suggested that their activity may be required only at the early stages of carcinogenesis potentiating the effects of other carcinogens, such as UV radiation (TOMMASINO, 2017).

Besides several efforts in this field, the precise contribution of the β -HPVs in non-melanomas skin cancers remains to be established. One major obstacle relies on the fact that unlike cancers associated with mucosal α -HPVs, in which transcriptionally active viral genomes are invariably observed, that is not the case for β -HPVs and skin carcinomas (HOWLEY; PFISTER, 2015).

Uncovering the molecular details of the correlation of EV to unusual sensitivity to infections by cutaneous HPVs, it was found that EVER proteins may be the essential

players in limiting β -HPVs infections among the general population (LAZARCZYK et al., 2009b). However, the intriguing mechanisms of EVER-based molecular barriers remain unsolved.

Since EVER disruption leads to the activation of zinc-inducible TFs, we propose that the transcriptional activity of β -HPVs may be influenced by EVER proteins, thus representing a key step of viral gene expression control. For this purpose, we evaluated the impact of EVER1/2 expression upon the transcriptional activity of β -HPVs from three different species (β 1-HPV-5, β 2-HPV-38, and β 3-HPV-49) in keratinocytes. Additionally, we aimed to explore the effect of UV irradiation, once it was already demonstrated that transcriptional activity of diverse β -HPVs types are influenced by UV light (VASILJEVIĆ et al., 2008). Exploring the regulatory networks of β -HPVs transcription may provide a better comprehension of these genus particularities regarding their biological properties and their pathogenesis. New insights in this field could also reveal novel targets for antiviral therapy.

3. AIMS

- I.** Deplete EVER1/2 expression in hTERT immortalized primary human keratinocytes (PHK).
- II.** Evaluate the transcriptional activity of β 1-HPV-5, β 2-HPV-38, and β 3-HPV-49 in parental (hTERT HK) and EVER1/2-depleted cells.
- III.** Investigate the impact of UV irradiation upon the transcriptional activity of β 1-HPV-5, β 2-HPV-38, and β 3-HPV-49 in parental (hTERT HK) and EVER1/2-depleted cells.

4. METHODOLOGY

4.1. Cell culture and irradiation

Experiments were carried out using human primary keratinocytes isolated from neonatal foreskin (PHKs); in an HK cell line expressing the hTERT gene to prolong the life span of the cells (hTERT HKs); and in Evpt4 and Evpt5 cells lines, both isolated from patients harboring mutations within the *EVER2* gene. Cells were maintained in KGM2 medium (PromoCell) at 37 °C and 5% CO₂. For the irradiation assays, cells covered with a thin layer of phosphate-buffered saline were exposed to a 25-mJ/cm² dose of UVB radiation using the BIO-SUN UV irradiation system (Vilber Lourmat). After irradiation, cells were cultured in a humidified chamber for 8h at standard conditions and then harvested.

4.2. EVER 1 and EVER 2 silencing

Gene silencing of *EVER1* and *EVER2* was achieved using previously constructed plasmids for CRISPR/*EVER1* and CRISPR/*EVER2*. All single guide RNAs sequence information is shown in **Table 1**. The CRISPR/Cas9 vectors were transiently transfected into hTERT HKs. CRISPR/*EVER1* and CRISPR/*EVER2* were performed individually and in combination to evaluate the reciprocal downregulation of both genes. Purification of the cells carrying the CRISPR/Cas9 vectors was performed 48 h post-transfection according to the manufacturer's protocol (GeneArt CRISPR Nuclease Vector Kit; Life Technologies).

Table 1: Target sequence information for CRISPR/*EVER1* and CRISPR/*EVER2*

Name	SEQUENCE CRISPR gRNA
EVER1-C5-FWD	5'- CTCAGGGACATCGAGGATGAGTTTT -3'
EVER1-C5-REV	5'- TCATCCTCGATGTCCCTGAGCGGTG -3'

EVER1-C4-FWD	5'- TCGCTTTCATCATAGGGGCTGTTTT -3'
EVER1-C4-REV	5'- AGCCCCTATGATGAAAGCGACGGTG -3'
EVER2-C1-FWD	5'- CGCTTGTCATCATGGCATAGTTTT -3'
EVER2-C1-REV	5'- TATGCCATGATGGACAAGCGCGGTG -3'
EVER2-C2-FWD	5'- GCCTCTTCGGCACAGGAATTGTTTT -3'
EVER2-C2-REV	5'- AATTCCTGTGCCGAAGAGGCCGGTG -3'

4.3. Reverse transcription and quantitative PCR

Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA II Kit (Macherey Nagel). The RNA obtained was reverse transcribed to cDNA using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocols. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using the Mesa Green qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec) and the primers listed in **Table 2**.

Table 2: qPCR primers sequence information

Gene	Sequence
<i>EVER1</i> forward	5'- GTGGCCTGCCCTACAACAT -3'
<i>EVER1</i> reverse	5'- CCGAAAGAGTGAGCCATGC -3'
<i>EVER2</i> forward	5'- CAAGAAGTACACCCTCCTGAAGA -3'
<i>EVER2</i> reverse	5'- GAGGAGTGGATGCTGCTGAC -3'
<i>CIB1</i> forward	5'- TTCCAGCACGTCATCTCCC -3'
<i>CIB1</i> reverse	5'- GCCACAGCTCAGCAGTAGAAA -3'

4.4. Immunoblotting (IB)

Cells were lysed using IP buffer (20 mM Tris HCl [pH 7.5], 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40) supplemented with Complete Protease Inhibitor mixture (Roche). Samples were resolved by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Perkin Elmer). Membranes were blocked in 5% non-fat milk and incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody. Membranes were probed with the following primary antibodies: β -actin (clone C4; MP Biomedicals), GAPDH (6C5) (sc-32233; Santa Cruz), EVER1 (sc-376679, Santa Cruz), EVER2 (PA5-20526, Sigma). Images were produced using the ChemiDoc XRS imaging system (Bio-Rad).

4.5. Plasmid construction

The PCR-amplified full-length LCRs of HPV-5, HPV-38, and HPV-49 were cloned upstream pGL3-Basic Firefly Luciferase Reporter vector (Promega) (pGL3-5LCR, pGL3-38LCR, pGL3-49LCR). Briefly, the complete LCR regions were amplified by PCR using primers including specific recognition sites for *Hind*III (Promega) and *Kpn*I (Biolabs) restriction endonucleases. The amplified fragments and the pGL3-Basic vector were cut using both restriction endonucleases. Purified fragments were cloned into the pre-cut pGL3-Basic vector (Promega) upstream of the luciferase gene. The constructs were evaluated by DNA sequencing.

4.6. Transcriptional activity assays

hTERT HKs or PHKs were cotransfected in 48-well plates using the TransIT-Keratinocyte Transfection Reagent (Mirus) according to the manufacturer's protocols with 500 ng of recombinant pGL3-LCR-firefly Luc (HPV-5, HPV-38, and HPV-49) and 25 ng of the pRL-TK Renilla reporter vector per well as an internal control of transfection efficiency. Cells were harvested 48 hours post-transfection by the addition of reporter lysis buffer (Promega). The Promega Dual-Luciferase Reporter Assay system was used to measure Firefly and Renilla luciferase activities in protein extracts. Light emissions were measured using an Optocompt luminometer (MGM Instruments). The expression of firefly luciferase relative to Renilla luciferase was compared between all the β -HPVs promoters constructs and expressed as relative luminescence units (RLU).

4.7. Statistical analysis

Statistical significance was determined using the One-Way ANOVA test with Prism7 (GraphPad). The levels of statistical significance for each experiment (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, not significant) are indicated in the corresponding figures. The error bars in the graphs represent the standard deviation.

5. RESULTS

The *EVER 1* and *EVER 2* genes were knockdown using CRISPR/Cas9 technology in hTERT HKs. The inhibition of *EVER* genes was measured by RT-qPCR and by IB. Both *EVER* genes expression was suppressed after CRISPR-*EVER 1* and/or CRISPR-*EVER 2* transfections (**Figure 1A and 1B**). The *EVER1* mRNA level decreased by a fold-change of 0.45 for *EVER1*-CRISPR and 0.72 for *EVER2*-CRISPR. The *EVER2* mRNA level decreased by a fold-change of 0.42 for *EVER2*-CRISPR and presented a greater reduction when the *EVER1*-CRISPR was transfected, with a fold-change of 0.25. The *EVER1*-CRISPR co-transfected together with *EVER2*-CRISPR resulted in the significant reduction of both *EVER1* (fold-change 0.34) and *EVER2* (fold-change 0.64). IB assays showed a reduction of *EVER1* protein levels in hTERT HK transfected with CRISPR-*EVER1*, CRISPR-*EVER2*, and when co-transfected with CRISPR-*EVER1* and CRISPR-*EVER2*. In contrast, the *EVER2* protein levels did not present a relevant reduction (**Figure 1C**).

Although successful knockdown was obtained, it was not possible to generate a cell line with stable *EVER* genes silencing. Therefore, two strategies were persuaded to accomplish the next objectives: (1) we performed *EVER1* and *EVER2* overexpression instead of knockdown to evaluate the impact of these proteins on β -HPVs transcriptional activity; (2) we also employed primary keratinocytes isolated from two EV patients with depletion of *EVER2* which were gently donated by Dr. Marisa Gariglio from the Department of Clinical and Experimental Medicine, Medical School of Novara, Novara, Italy (named as Evpt4 and Evpt5).

Transient overexpression of *EVER1* and *EVER2* was performed in PHKs. The expression of *EVER1* and *EVER2* markedly increased after the transfection with pBabe-*EVER1* and pBabe-*EVER2*, respectively (**Figure 1D and 1E**). pBabe-*EVER1* transfection promoted a 42.5-fold increase in *EVER1* expression, while *EVER2* levels were not significantly affected. *EVER2* overexpression markedly enhanced *EVER2* mRNA levels by a 214-fold increase and did not interfere considerably with *EVER1* expression.

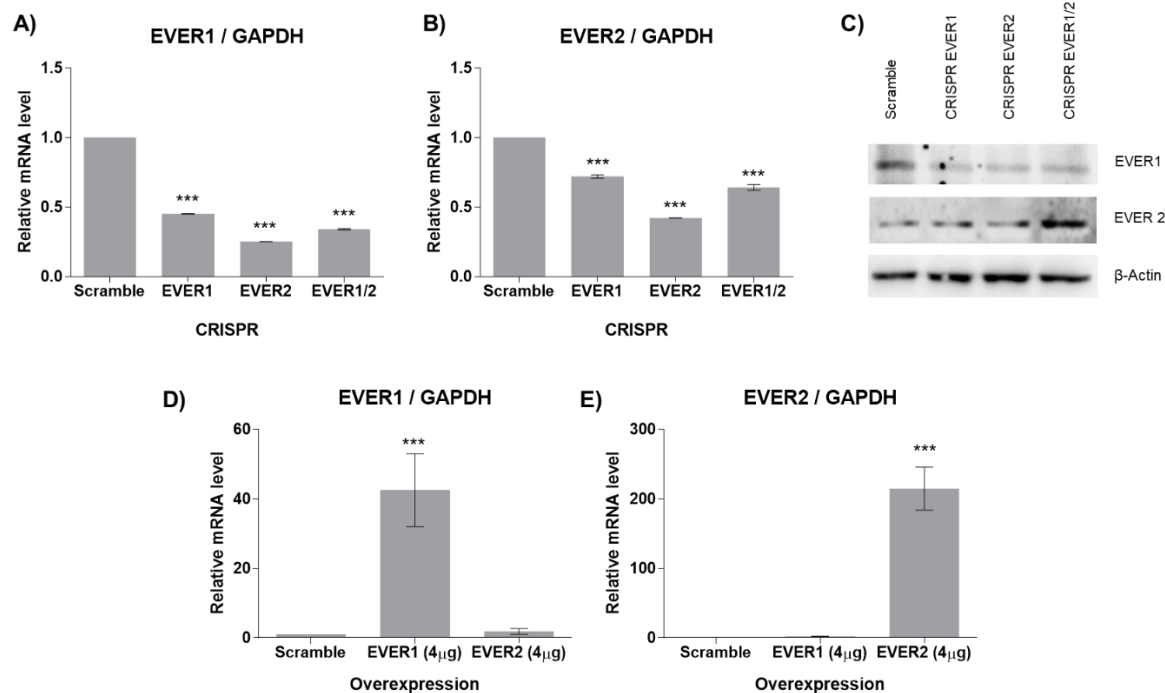


Figure 1. The EVER-complex knockdown and overexpression. hTERT HKs transfected with CRISPR/Cas9 empty vector (Scramble) or EVER 1 and/or EVER 2 vectors (CRISPR-EVER1 and CRISPR-EVER2) were processed for IB and RT-qPCR analysis. **(A)** *EVER1* and **(B)** *EVER2* mRNA were measured by RT-qPCR and normalized to *GAPDH* levels. **(C)** EVER protein levels were also evaluated. For overexpression, PHKs were transfected with pBabe empty vector or with pBabe-EVER1 and/or pBabe-EVER2. **(D)** *EVER1* and **(E)** *EVER2* mRNA levels were measured by RT-qPCR. Error bars indicate standard deviations of 2 independent experiments. ***, $p < 0.001$.

Recently, loss-of-function of the *CIB1* gene was described in six EV families. *CIB1*, *EVER1*, and *EVER2* proteins have been proposed to form a complex that may act together as a restriction factor for β -HPV via unknown mechanisms (DE JONG et al., 2018). Additionally, it has been shown that *CIB1* can be degraded in the case of one missing interaction partner, hence we investigated the expression of *CIB1* in the *EVER1/2* knockdown or overexpressed keratinocytes. We were unable to see any statistically change of *CIB1* mRNA expression levels after the knockdown of *EVER1* or

EVER 2 in comparison with the scramble; or after overexpression of EVER1 or EVER 2 in comparison with the scramble (**Figure 2**).

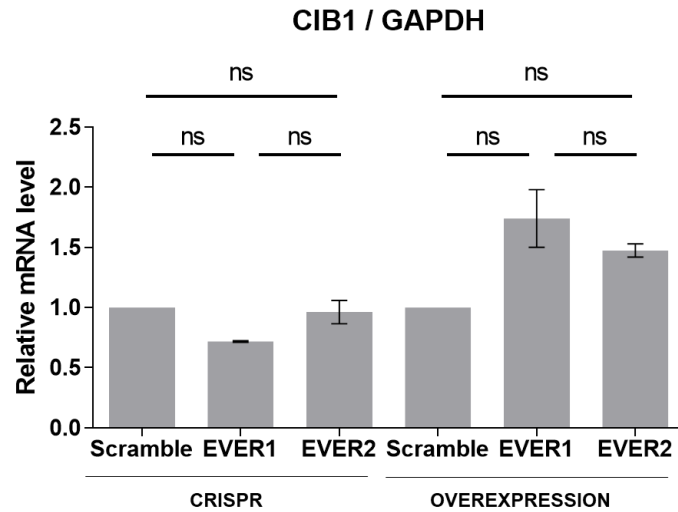


Figure 2. CIB1 expression in keratinocytes with knockdown or overexpression of *EVER1* or *EVER2*. Total mRNA of hTERT HKs transfected with CRISPR/Cas9 empty vector (Scramble) or EVER 1 and/or EVER 2 vectors (CRISPR-EVER1 and CRISPR-EVER2) and PHKs transfected with the pbabe empty vector or with pbabe-EVER1 and/or pbabe-EVER2 were extracted. The *CIB1* mRNA levels were measured by RT-qPCR. Error bars indicate standard deviations of 2 independent experiments.

Next, we performed a pilot study to access the transcriptional activity of the HPV-38 promoter in PHKs overexpressing EVER1 and/or EVER2. We observed a dose-response increment of luciferase activity with increasing amounts of EVER1 plasmids up to 100 ng, and of EVER2 plasmids for all three tested inputs. The co-transfection of EVER1 and EVER2 increased the reporter activity with 50 ng of exogenous DNA, although the dose-response was not observed. (**Figure 3**).

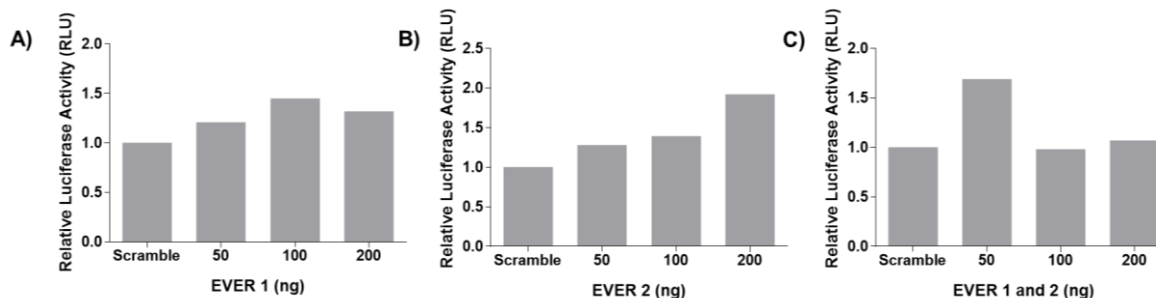


Figure 3. Effect of EVER1/2 upon HPV-38 transcriptional activity. hTERT HKs were co-transfected with reporter vector containing the HPV-38 LCR driving the expression of the luciferase gene and increasing amounts of the empty vector; pbabe-EVER1; and/or pbabe-EVER2. The luciferase reporter activity was measured 48h post-transfection. Data are presented by firefly luciferase relative to renilla activity and normalized by the empty vectors. The data represent the average of one experiment conducted in triplicate.

Keratinocytes were obtained from EV patients' harboring novel invalidating deletions in the *EVER2* gene. These mutations create shifts in the reading frame and introduce a premature termination codon. Thus, we investigated the HPVs 5, 38, and 49 transcriptional activities in these *EVER2*-null keratinocytes. We observed an increase in both cell lines for all HPVs promoter's activities (**Figure 4**). The HPV-5 promoter presented a 1.4-fold and 1.7-fold increase in EVpt4 and EVpt5 cells, respectively. The fold activation of HPV-38 promoter activity was 2.4 for EVpt4 and 1.8-fold for EVpt5. Finally, the HPV-49 promoter showed the major impact upon the transcriptional activation with a 2.1-fold and 3.2-fold increase for EVpt4 and EVpt5, respectively. Despite the observed increment of luciferase activity, the differences were not statistically significant. Therefore, more assays should be performed to corroborate these findings.

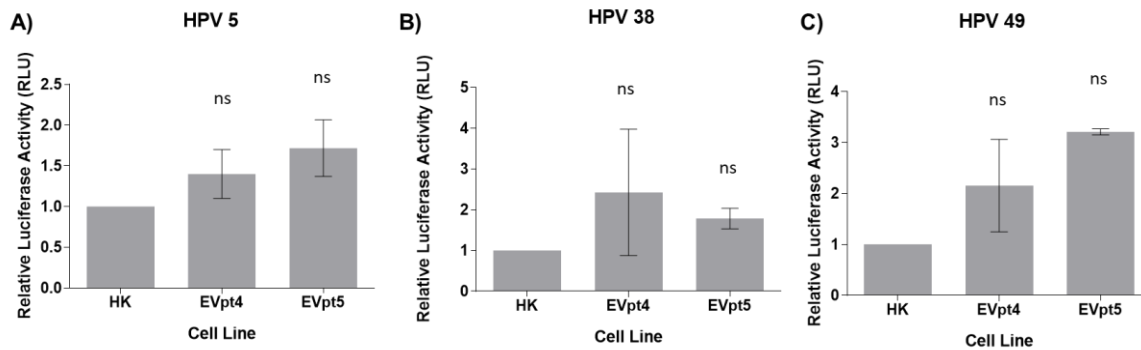


Figure 4. HPV-5, 38, and 49 transcriptional activities in EV patients cell lines. The pGL3-LCR-firefly Luc (A) HPV-5, (B) HPV-38, and (C) HPV-49 vectors were transfected in the EV patient cell lines, EVpt4 and EVpt5, and in PHKs as control. The luciferase activity was determined. Data are presented by firefly luciferase relative to renilla activities and normalized by the empty vectors. Error bars indicate standard deviations of 2 independent experiments.

Further, we transfected the EV patient cell lines with the hTERT gene to expand the life span of these cells and continue experiments. The hTERT Evpt4 cells were successfully established, however, it was not possible to achieve Evpt5 cell line immortalization. Thus, we proceed with experiments using the hTERT Evpt4 keratinocytes.

Finally, we investigated the impact of UV irradiation upon the transcriptional activity of HPVs 5, 38, and 49 LCRs transfected in the hTERT Evpt4 cell line and using hTERT HKs as control. In general, we observed a repressive effect of UV irradiation of all HPVs' promoters in the hTERT expressing keratinocytes. In contrast, we observed that this repression was reversed in EVpt4 keratinocytes for the HPV-5 and 49 promoters, while the HPV-38 promoter had an increment of 9.3-fold on the transcriptional activity post-UV irradiation.

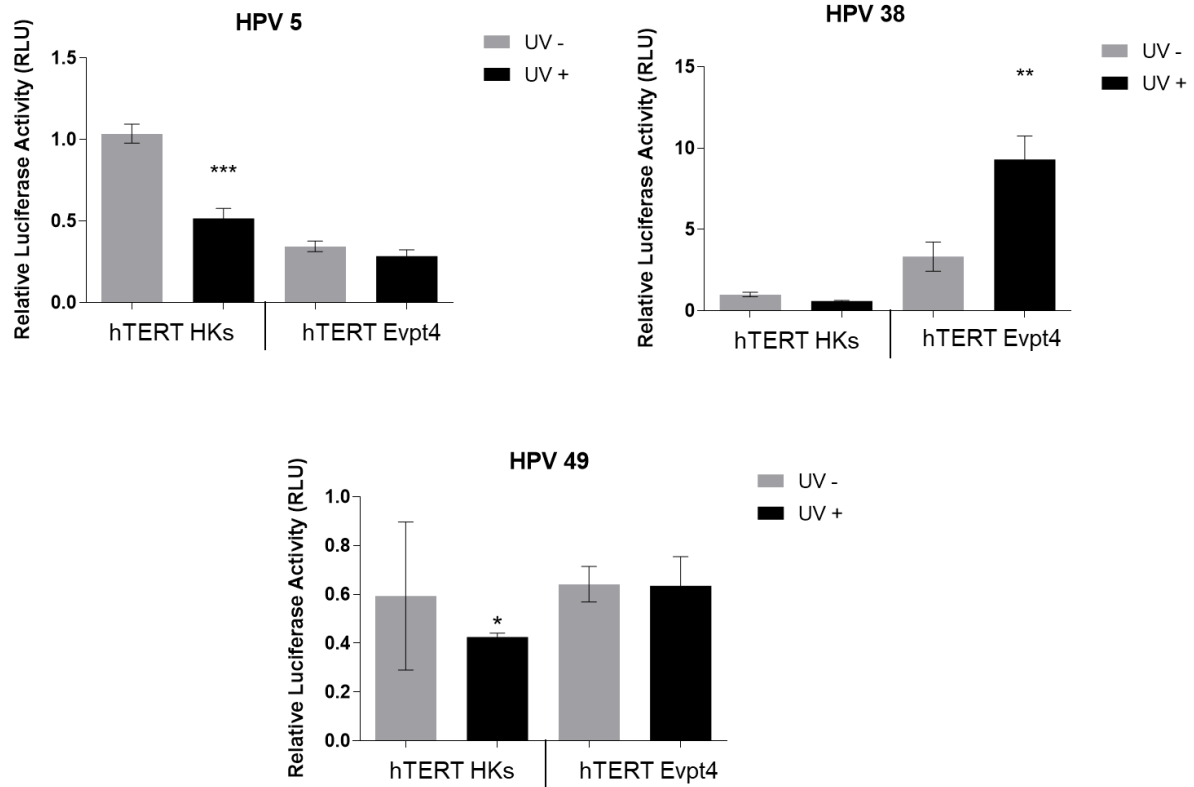


Figure 5. HPV-5, 38, and 49 transcriptional activities in hTERT HKs and hTERT EVpt4 cells after UV irradiation. The pGL3-LCR-firefly Luc (A) HPV-5, (B) HPV-38, and (C) HPV-49 vectors were transfected in the EV patient cell lines, EVpt4 and EVpt5, and in PHKs as control. The luciferase activity was determined. Data are presented by firefly luciferase relative to renilla activity and normalized by the empty vectors. Error bars indicate standard deviations of technical replicates of one experiment. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

6. DISCUSSION

While cutaneous HPVs of the β genus infection are widespread and asymptomatic in the general population, EV patients are highly susceptible to these viruses (ORTH, 2006a). The persistent infection with β -HPVs in these individuals causes skin lesions such as flat warts and pityriasis versicolor-like lesions. Some EV patients also develop non-melanoma skin cancer, particularly in areas of the body exposed to the sun. The loss-of-function mutations in either *EVER1* or *EVER2* genes are responsible for the majority of EV cases (KALINSKA-BIENIAS; KOWALEWSKI; MAJEWSKI, 2016; WILCZYNSKI et al., 1993). These and several others evidences shed the light on the hypothesis that the EVER complex could act as an anti-HPV barrier (LAZARCZYK et al., 2009a, 2012).

Herein, we investigated the effect of EVER proteins upon the transcriptional activity of β -HPV-5, -38, and -49. For this purpose, the initial step was to develop EVER 1/2 null keratinocytes. The CRISPR technology was employed, and we were able to successfully knockdown the EVER1/2 at the mRNA level, although the protein evaluation indicated decreased levels of only EVER1 in all cells (**Figures 1A-C**). The lack of reliable antibodies against EVER proteins were already pointed out by other authors (DE JONG et al., 2018) and made it difficult for us to assess the levels of the corresponding proteins in further experiments.

It was recently suggested that CIB1 forms a complex with EVER1 and EVER2. Previous findings show that disruption of CIB1–EVER1–EVER2 interaction underlies the selective susceptibility of EV patients to β -HPVs. The proposed mechanism is that, in EV patients, the lack of CIB1–EVER1–EVER2 permits the transcription of β -HPV minichromosome, which leads to the development of EV lesions on the skin (DE JONG et al., 2018; WU et al., 2020). Therefore, we investigated CIB1 mRNA levels in the keratinocytes with altered EVER1 or EVER2 expression but observed that CIB1 mRNA levels were not significantly altered in keratinocytes after knockdown or overexpression of EVER1 or EVER2 (**Figure 2**). This is consistent with the study in thymocytes that did

not observe CIB1 reduction at the mRNA level neither for EVER1 nor EVER2 mutants, instead, the changes occurred at the protein level (WU et al., 2020).

The hypothesis that the EVER complex would constitute a restriction factor for cutaneous β -HPVs persistence is based on its functions in the immune system, controlling already-established HPV infections; and, at the molecular level, on the findings that EVER proteins in keratinocytes may control viral replication and interferes on viral genome expression (ORTH, 2006a). The present study was a pioneer in the investigation of the EVER impact upon cutaneous β -HPVs transcription.

The RT-qPCR analysis demonstrated an expressive increase of EVER1 and EVER2 expression post-transfection of expressing plasmids (**Figures 1D and E**). We then evaluated the effect of EVER1/2 overexpression upon HPV-38 transcriptional activity using these cells. Thus, we performed a pilot study transfecting increasing amounts of EVER1 or EVER2 plasmids and measured the luciferase activity. In general, we observed that exogenous EVER1/2 can lead to the activation of the HPV-38 early promoter (**Figure 3**).

Additionally, we were able to analyze the transcriptional activity of β -HPVs in two cell lines previously isolated from two EV patients carrying invalidating mutations in the EVER2 gene, named EVpt4 and EVpt5 (BORGOGNA et al., 2012; LANDINI et al., 2012). We compared the HPV-5, -38, and -49 promoters' activities in both cell lines with PHKs with normal expression of EVER2. The preliminary results showed a non-significant increase in the transcriptional activity of all β -HPVs tested in the keratinocytes carrying EVER2 mutations in relation to PHKs (**Figure 4**).

Taken together, we showed that EVER complex disruption, whether by overexpression or knockdown of EVER genes, may impact upon the tested cutaneous β -HPVs transcriptional activity. The EVER proteins form a complex with the ZnT-1 in keratinocytes controlling intracellular zinc concentration, consequently, their expression may affect the activity of several zinc-modulated proteins, such as enzymes, signal transduction proteins, and TFs (LAZARCZYK; FAVRE, 2008). Therefore, it will be important to investigate EVER-modulated TFs in order to better clarify the mechanisms underlying these findings.

Finally, we explored the UV irradiation influence in this context. For this assay, we successfully immortalized the EV patient 4 cell line with the hTERT gene. This achievement enabled to maintain in culture these cells until higher passages for further analysis. The HPV-5, -38, or -49 promoters' activities were evaluated in the hTERT Evpt4 cell line and hTERT HKs, irradiated or non-irradiated with UV. The results revealed that the HPVs 5 and 49 transcriptional activities are not affected by UV irradiation, while the HPV-38 promoter was activated by 2.8 times when we compare the irradiated EVpt4 cell line with the non-irradiated cells (**Figure 5**). In conclusion, UV irradiation of the EVER2-null patient cell line significantly induced the HPV-38 promoter in all the conditions tested and UV irradiation did not affect the HPV-5 and HPV-49 transcriptional activities.

Increasing evidence suggest that cutaneous HPV infection may act as a co-factor to UV-irradiation in the development of non-melanoma skin cancer (ACCARDI; GHEIT, 2014). This association was first described among EV patients based on the observations of the frequent development of cSCC at sun-exposed sites and the higher prevalence of β -HPVs surrounding all these lesions (ORTH, 2006b). The repression of the HPV-38 promoter by UV irradiation was previously reported in immortalized keratinocytes (HaCaT cells) (VASILJEVIĆ et al., 2008). Accordingly, we observed HPV-38 promoter repression with different magnitude in hTERT HKs. Otherwise, UV-irradiation activated the HPV-38 promoter in EVER2-mutated keratinocytes. These results suggest a role of EVER2 upon the transcriptional activity regulation of cutaneous β -HPVs promoters in keratinocytes exposed to the UV light.

We emphasize that further experiments would be necessary to confirm the findings and to evaluate different conditions, including (1) increased EVER1 and EVER2 plasmids input for the keratinocyte's transfection assays; (2) IB analysis with more efficient and specific antibodies for EVER1 and EVER2 proteins; (3) a time-course for the UV irradiation assay to find the ideal conditions.

CAPÍTULO III

AP1 COMPLEX AND P53 COOPERATION IN BETA-HPV38 TRANSCRIPTIONAL REGULATION

This research was accomplished in collaboration with the Infections Cancer Infections and Cancer Biology Group led by Dr. Massimo Tommasino at International Agency for Research on Cancer (IARC) in Lyon, France

1. ABSTRACT

While the role of mucosal high-risk HPVs (HR HPVs) in cervical carcinogenesis is well understood, less is known about the cutaneous β -HPVs transforming properties. To become transcriptionally active and express E6 and E7 oncoproteins, HPVs essentially require a permissive cellular environment. Particularly, cellular transcription factors (TFs) are essential for determining the fine-tuned magnitude and temporal regulation of viral transcription. The most notable refers to the composition of TFs that directly bind to the non-coding region of the HPV genome, designated as Long Control Region (LCR). It is well known for all alpha-HPV types investigated so far that the activator protein 1 (AP-1) binding at the LCR plays a crucial role in viral transcriptional activation and therefore leads to constitutive expression of E6 and E7. c-Jun is the most extensively studied and the major transcriptional activator of the AP-1 family. The stress response of c-Jun has an important synergistic interaction with p53-regulated pathways, such as DNA repair and cell cycle checkpoints regulation. However, few studies address the role of these TFs upon cutaneous β -HPV transcription. Therefore, we investigated the cooperation of c-Jun with p53 on the regulation of the transcriptional activity of the cutaneous HPV-38. We found that the ectopic co-expression of c-Jun and p53 resulted in strong activation of the HPV-38 promoter. Furthermore, we demonstrated that c-Jun and p53 interact directly in multiple sites along the LCR. Additionally, we assessed the affinities of c-Jun to p53 binding sites and of p53 to c-Jun binding sites, which indicated an interaction between both TFs. The data presented in this study provide novel insight regarding an interplay between these important cellular players and the cutaneous β -HPV transcriptional status.

2. INTRODUCTION

HPVs are a ubiquitous virus that infects the keratinocytes from the basal layer of the stratified epithelia. Numerous HPV types have been isolated and assigned to genus and species according to their nucleotide sequence of the major capsid protein L1 (www.hpvcenter.se). Aside from the taxonomic criteria, the biological properties can be considered for a more comprehensive evaluation. The oncogenic potential and the tropism for mucosal or cutaneous epithelia are the most commonly used (ALTAMURA; TOMMASINO; BORZACCHIELLO, 2020; DE VILLIERS et al., 2004; DE VILLIERS, 2013).

Members from the β genus are widely present in the skin of immunocompetent individuals causing asymptomatic infections. However, a growing body of evidence suggests a role for β HPVs as a contributor of non-melanoma skin cancer in synergy with other factors such as UV radiation, immunosuppression, or genetic disorders (HOWLEY; PFISTER, 2015; TOMMASINO, 2017). While the role of mucosal high-risk HPVs (HR HPVs) in cervical carcinogenesis is well understood, less is known about the β -HPVs transforming properties. Findings indicate that β -HPVs magnify DNA damage caused by UV radiation disturbing the cycle control, apoptosis pathway, and DNA repair machinery (DONG et al., 2008). Specifically, as occurs for mucosal HR HPV types, the oncoproteins E6 and E7 from β -HPVs are able to target the retinoblastoma protein (pRb) and p53 networks, but the mechanisms are diverse and vary between beta HPV types. In particular, the β -HPV38 does not promote p53 degradation as the mucosal HPVs, but instead impairs the growth arrest and proapoptotic functions by stabilizing the wild-type p53 and activating the expression of its antagonist Δ Np73 (ACCARDI et al., 2006).

The E6 and E7 oncoproteins expression essentially require a permissive cellular environment composed of a spectrum of host cell factors that favors the HPV to become transcriptionally active and establish the infection. Particularly, cellular transcription factors (TFs) are essential for determining the fine-tuned magnitude and temporal regulation of viral transcription (THIERRY, 2009). The most notable is the composition of TFs that have direct binding sites at the non-coding region present on the HPV

genome, designated as Long Control Region (LCR) (BERNARD; APT, 1994; GARCIA-CARRANCA; THIERRY; YANIV, 1988). It is well known for all alpha-HPV types investigated so far that the activator protein 1 (AP-1) binding at LCR plays a crucial role in the transcriptional activation and therefore constitutive expression of E6 and E7 (KYO et al., 1997; KYO; TAM; LAIMINS, 1995; OFFORD; BEARD, 1990; THIERRY et al., 1992; WELTER; ECKERT, 1995).

The AP-1 complex is formed by either homodimerization or heterodimerization of Jun (c-jun, JunB, JunD), Fos (c-fos, FosB, Fra-1 and Fra-2), Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K and Nrl), and ATF (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2) families (HESS; ANGEL; SCHORPP-KISTNER, 2004). The member's expression is inducible by different stimuli such as inflammatory cytokines, stress inducers, UV irradiation, or pathogens (SHAULIAN; KARIN, 2002). On the other hand, their constitutive activation plays a role in carcinogenic inflammation, transformation, and maintenance of cancer stemness (EFERL; WAGNER, 2003).

c-Jun is the most extensively studied and the major transcriptional activator of the AP-1 family (ANGEL; KARIN, 1991). This protein is able to regulate and integrate a plethora of signaling pathways, hence is commonly associated with tumorigenesis, especially in cancers arising from keratinocytes (MENG; XIA, 2011). Increased c-Jun expression was observed in malignant keratinocytes derived from squamous cell carcinoma (SCC) compared with normal keratinocytes (LOHMAN et al., 1997). The higher levels of c-Jun were also seen in HPV containing keratinocytes and in HPV+ cancer cells (MORGAN et al., 2020).

Interestingly, c-Jun is regarded as a hallmark of the mammalian UV response (DEVARY et al., 1991; FRITZ; KAINA, 1999; HOCHEDLINGER; WAGNER; SABAPATHY, 2002). Several studies show a dramatic and rapid induction of c-Jun transcription by UVC or UVB. The blockage of c-Jun expression after UVB exposure is capable of reducing squamous cell carcinoma development and decreasing the tumor sizes in mouse models (COOPER et al., 2003). The stress response of c-Jun has an important synergistic interaction with p53-regulated pathways, such as DNA repair and cell cycle checkpoints (SCHERER et al., 2000; SONG et al., 2010). c-Jun needs to be activated by JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) mediated phosphorylation to be able to

interact with other AP-1 members (RJ, 2000). JNK also targets p53, controlling its stability and expression level (LO et al., 2004; MILNE et al., 1995; PS et al., 2012). Further, c-Jun is necessary for cell-cycle reentry after UV irradiation by negatively regulating p53 recruitment to the p21 promoter (SHAULIAN et al., 2000). c-Jun and p53 also functionally interact up-regulating the mismatch repair enzyme MSH232 in response to UV irradiation (SCHERER et al., 2000).

On the basis of these findings, we investigate the cooperation of the c-Jun with p53 on the regulation of the transcriptional activity of the cutaneous papillomavirus HPV-38. The ectopic co-expression of c-Jun and p53 resulted in strong activation of the HPV-38 promoter. We demonstrate that c-Jun and p53 interact directly with the LCR. These findings emphasize the need for a greater understanding of the transcriptional state of the infected cells and the cellular players that perform driver roles in coupling host transcription with the virus. Together, these observations reflect a strong influence of host transcription factor composition in the target tissue upon the expression of viral oncogenes that in turn modify the cellular environment leading to the manifestation of pathological characteristics of the HPV-positive tumors.

3. METHODOLOGY

3.1. Cell cultures

Primary human foreskin keratinocytes (PHKs) were cultured in Keratinocyte Growth Medium 2 (Promocell). Human foreskin keratinocytes immortalized by HPV-38 E6 and E7 oncoproteins (HK 38E6E7) were cultured together with NIH 3T3 feeder cells in FAD medium containing 3-parts of Ham's F12, 1-part DMEM, 2.5% FCS, insulin (5 µg/mL), epidermal growth factor (10 ng/mL), cholera toxin (8.4 ng/mL), adenine (24 µg/mL), hydrocortisone (0.4 µg/mL), and 1% of penicillin/streptomycin preparation. Feeder layers were prepared by treating NIH 3T3 cells with mitomycin for 2 h. NIH 3T3 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin preparation. All cells were maintained in 5% CO₂ at 37°C.

3.2. Deletion constructs

For the construction of vectors with deletions within the LCR, the pGL3-HPV38LCR was used as a template. The 5'-end sequential deletions regions were amplified using the primers depicted in **Table 1**. Each of the resulting 3'-fragments was cloned into the precut pGL3-Basic vector (Promega) as described before. The resulting plasmids were named: pGL3-38LCR-del1, pGL3-38LCR-del2, pGL3-38LCR-del3, pGL3-38LCR-del4, or pGL3-38LCR-del5. For confirmation, plasmid constructions were evaluated by DNA sequencing.

Table 1: Primers used for deletion constructs

Primer	Sequence
38LCRwt forward	TATAAaggtaccCCGTTTTTCGGTCGCCC
38LCRwt reverse	CCAGTCAAGCTTGAATACATCCCAAGC
38LCRdel1 forward	AAAAGgtaccACCTTCTTTGTGACTAAACCGAACAAG

38LCRdel1 reverse	AAAAaagcttGAATACATCCCAAGCTTACAGGCC
38LCRdel2 forward	AAAAGgtaccCGAACAAGTCAACACCAGTAACCG
38LCRdel2 reverse	AAAAaagcttGAATACATCCCAAGCTTACAGGCC
38LCRdel3 forward	AAAAGgtaccCGGTTAATCAGATTATAAATTCCTGAAGGG
38LCRdel3 reverse	AAAAaagcttGAATACATCCCAAGCTTACAGGCC
38LCRdel4 forward	AAAAGgtaccTCCTGAAGGGCAGATTTCAATCAG
38LCRdel4 reverse	AAAAaagcttGAATACATCCCAAGCTTACAGGCC
38LCRdel5 forward	AAAAGgtaccGGTTAACAACCATCACACGTAATCG
38LCRdel5 reverse	AAAAaagcttGAATACATCCCAAGCTTACAGGCC

3.3. Luciferase reporter assays

Cells (1×10^5 /well of 48-well plates) were co-transfected with one of the firefly reporters constructs pGL3-5LCR, pGL3-38LCR, pGL3-49LCR (500 ng/well) in combination with the Renilla Luciferase Reporter plasmid (25 ng/well) and with or without pCMV-Jun and/or pCNA-p53 plasmids (50 ng/well each). Transient transfection experiments were performed using TransIT-Keratinocytes Transfection Reagent (Mirus) according to the manufacturer's protocols. The cells were harvested 48 hours post-transfection with 65 μ l/well of Passive Lysis Buffer (Promega) and stored at -80°C until measured. Luciferase activity was measured in each sample (20 μ l) using the Dual-Luciferase reagent (Promega). All experiments were performed in triplicate.

3.4. Immunoblotting

Total protein was extracted using the NucleoSpin RNA/ Protein Kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions. Samples were resolved by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Perkin Elmer). Membranes were blocked in 5% non-fat milk and incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody. Membranes were probed with the following primary antibodies: β -actin (clone C4; MP Biomedicals), GAPDH (6C5) (sc-32233; Santa Cruz), p53 (DO-1) (sc-126; Santa Cruz Biotechnology), HA-tag (3F10; Roche), c-Jun (H-79)

(sc-1694; Santa Cruz). Images were produced using the ChemiDoc XRS imaging system (Bio-Rad).

3.5. Chromatin immunoprecipitation

ChIP was performed using the Shearing ChIP and OneDay ChIP kits (Diagenode) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were sonicated to obtain DNA fragments of 200–500 bp. Sheared chromatin was immunoprecipitated using the indicated antibodies: p53 (DO-1) (sc-126; Santa Cruz Biotechnology), c-Jun (ab31419; Abcam). Supernatants were collected after centrifugation at 12,000g for 1 min. Pelleted beads were incubated again with 10 mM DTT for 20 min at 37°C and centrifuged at 12,000g for 1 min. Then, 10% of the combined supernatants were kept as the input for the second ChIP, which was performed with the OneDay ChIP kit (Diagenode) according to the manufacturer's protocol. The eluted DNA was used as a template for qPCR. As a negative control, the responsive elements of c-Jun and p53 at human genes promoters (IL-18 and TRL9, respectively) and the luciferase gene (present at the pGL3 plasmid) were used.

3.6. Oligonucleotide pulldown assay

Cells were lysed and sonicated in HKMG buffer (10 mM HEPES [pH 7.9], 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.5% NP-40) containing protease and phosphatase inhibitors. After centrifugation at 12,000g for 10 min, protein extracts were precleared with streptavidin–agarose beads. The HPV-38 LCR was divided into two regions (positions 7195-7387, named 38.1; 7391-199, named 38.2) and each was used as a template. PCR amplification was performed using a biotinylated forward primer and a non-biotinylated reverse primer, listed in **Table 2**. Amplicons were extracted from agarose gel by using the MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) and quantified. Then, 2.5 mg of cellular protein extracts were incubated with 1 µg of biotin-38LCR1 and biotin-38LCR2 probes and 10 µg of poly(dI-dC)·poly(dI-dC) for 16 h at 4°C. DNA-bound

proteins were collected with streptavidin–agarose beads for 1 h and washed 5 times with HKMG buffer. DNA-bound proteins were then analyzed by IB.

Table 2: Primers used for probes design

Primer	Sequence
38 LCR1 Forward	CGTTTTTCGGTCGCCCAAT
38 LCR1 Reverse	GGCAAAGTCTTGGCGGTTG
38 LCR2 Forward	CTTGGCAGAACATCTTTGGCAGAC
38 LCR2 Reverse	GAATACATCCCAAGCTTACAGGC

3.7. Electromobility shift assay

Nuclear extracts from cells were prepared as previously described (VENUTI et al., 2019). Briefly, 3×10^6 cells were collected, washed in PBS 1x, and resuspended in hypotonic buffer A (10 mM HEPES [pH 7.9], 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF). Cell suspensions were then incubated on ice and homogenized by 15 passages through a 25-gauge needle. Cytoplasmatic fractions were collected by centrifugation at 12,000 rpm for 1 min at 4°C. Nuclei were washed in buffer A, centrifuged, and dissolved in hypertonic buffer B (20 mM HEPES [pH 7.9], 25% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT). Nuclear extracts were collected by centrifugation at 12,000 rpm for 2 min at 4°C. Protein concentration was estimated using a BCA assay kit (Interchin). Then, 5 µg of the extracts were incubated with 0.5 pmol of biotin-labeled DNA probe and poly (dI-dC) in binding buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glycerol [pH 7.5]) in a final volume of 15 µL. Binding reactions were incubated for 20 min at room temperature. The dye solution was then added, and samples were loaded into a 5% polyacrylamide gel in 0.5× Tris-borate-EDTA buffer for running. The gels were then transferred to BM-Nylon (+) blotting membrane (Roche) and developed using the Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module provided in the non-radioactive LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific). Specificity of the protein–DNA complexes was verified by a

competition experiment where the nuclear extracts were incubated with an excess of unlabeled DNA.

3.8. In Silico LCR Analysis

Putative c-Jun and p53-binding sites were searched in LCR sequences from HPVs 5, 38, and 49. Sequences were analyzed using *MoLoTool: Transcription Factor Motif Location Toolbox*. LCR sequences from different papillomavirus genomes were obtained from the *PapillomaVirus Episteme (PaVE)* site.

3.9. Statistical analysis

Statistical significance was determined using the One-way ANOVA test with Prism9 (GraphPad). The levels of statistical significance for each experiment (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, not significant) are indicated in the corresponding figures. The error bars in the graphs represent the standard deviation.

4. RESULTS

4.1. Ectopically expressed c-Jun and p53 activate HPV-38 promoter

To address the question of whether c-Jun and p53 influence the transcription of HPV38 promoter, we transiently expressed c-Jun and/or p53 in HKs in combination with the pGL3-38LCR reporter plasmid. The measurement of luciferase activity was performed 48 hours post-transfection. Individual overexpression of c-Jun or p53 caused a 2.5-fold and 2.9-fold increment in the promoter activity, respectively. Interestingly, the ectopic expression of c-Jun and p53 combined presented a synergistic effect upon the HPV-38 LCR activation, provoking an 8-fold increase (**Figure 1A**). Therefore, the combined effect of c-Jun and p53 is stronger than either of these factors alone. IB assays were performed to check the overexpression of the TFs using total protein extracts from the luciferase assay (**Figure 1B**).

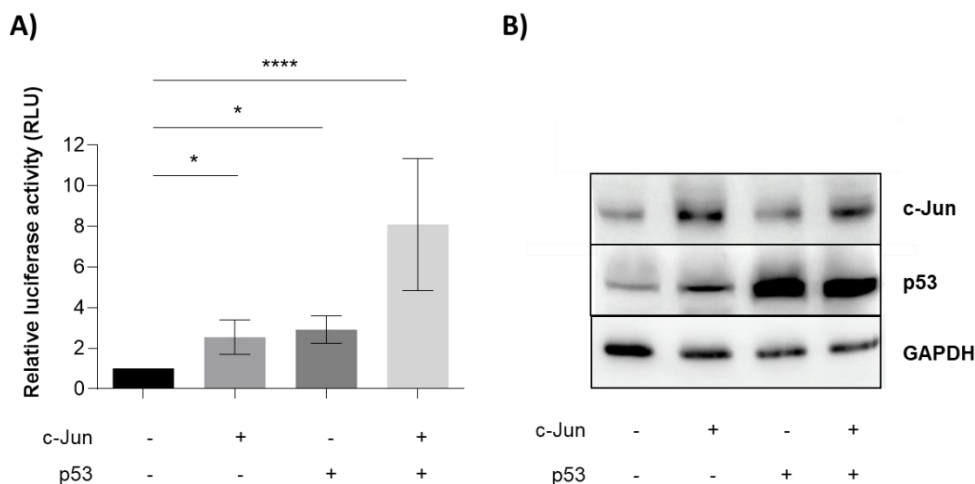


Figure 1. Ectopically expressed c-Jun and p53 strongly activate the HPV-38 promoter. (A) Primary HKs were co-transfected with the pGL3-38LCR construct and c-Jun and/or p53. pGL3-38LCR with the empty vector was used as a negative control. The luciferase reporter activity was measured 48h post-transfection. Data are presented by firefly luciferase relative to renilla activity and normalized by the empty vectors. Error

bars indicate standard deviations of 6 independent experiments. **(B)** Proteins extracts from HKs co-transfected for luciferase assay were also analyzed by immunoblotting (IB) with the indicated antibodies. The images shown are representative examples of 2 different experiments. *, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$.

4.2. c-Jun and p53 cooperation is specific to HPV-38

Next, we investigated if the synergistic effect between c-Jun and p53 is specific to the HPV38LCR or also affects other cutaneous β -HPVs LCR. We tested the HPV5LCR and HPV49LCR transcriptional activity and compared it to that of HPV-38LCR and observed that overexpression of c-Jun and p53 did not cause significant changes in HPV-5 and HPV-49 promoters' activity (**Figure 2A-C**). Since the activation could be due to an interaction with a responsive element presented only on the HPV-38 LCR, we performed *an silico* analysis to search for c-Jun and p53 putative binding sites within HPV-38, 5, and 49 LCRs. We found two proximal putative binding sites for c-Jun and p53 within the HPV-38 LCR which are not present on HPV5 and HPV49 LCRs.

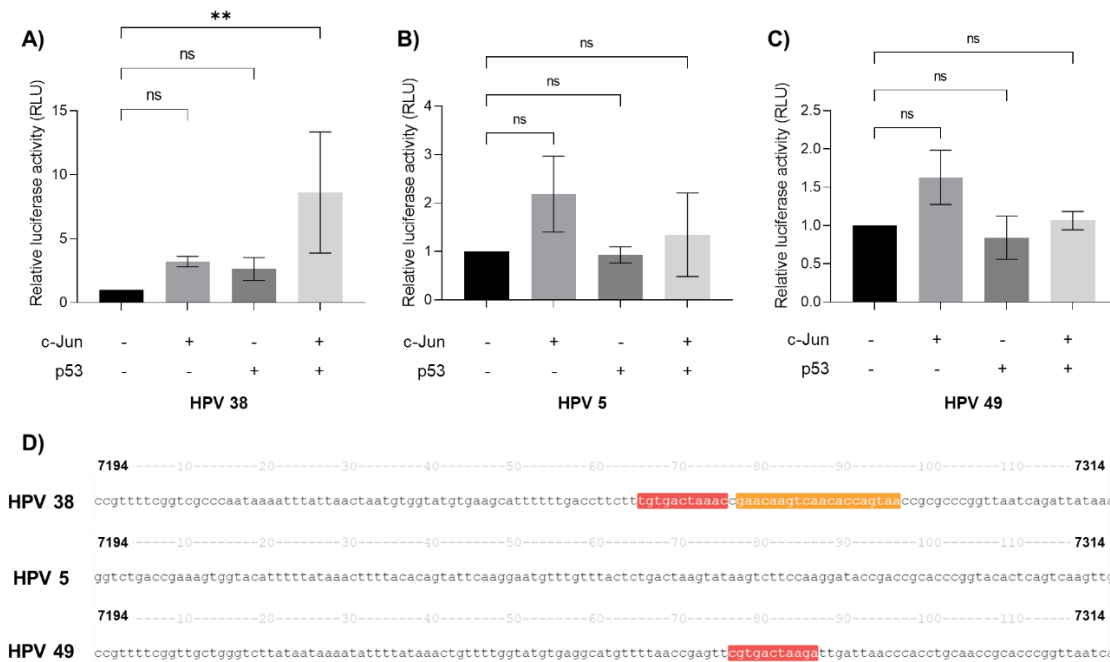


Figure 2. Ectopically expressed c-Jun and p53 activates HPV-38 promoter, but not HPV-5 and 49 promoters. (A) Primary HKs were co-transfected with the pGL3-38LCR, pGL3-5LCR, or pGL3-49LCR constructs together with c-Jun and/or p53. The empty vectors were used as a negative control. The luciferase reporter activity was measured 48h post-transfection. Data are presented as the firefly luciferase relative to renilla activity and normalized by the empty vectors. Error bars indicate standard deviations of 3 independent experiments. (B) *In silico* analysis of HPV-38, HPV-5, and HPV-49 LCRs. The illustration shows a segment of the HPVs LCR. The red highlighted sequence indicates c-Jun putative binding sites, while the orange highlighted sequence indicates a p53 putative binding site. ** $p < 0.01$.

4.3. The 5'-fragment of the HPV-38 LCR is necessary for c-Jun and p53 activation

To define the cis-acting elements of the HPV-38 LCR that mediate transactivation by c-Jun and p53, sequential deletions from the 5'-end were generated. The scheme representing the deletions and the conserved regions of the LCR are shown in **Figure 3A**.

The full-length HPV LCR (38LCRwt) or those harboring sequential deletions (38LCRΔ1-5) were co-transfected with c-Jun and p53 in HKs. The deletion of the region between nt7194 and nt7252 led to a significant decrease in the activation by c-Jun and p53, indicating the presence of an important binding site for these TFs in this region. From the following deletion 38LCRΔ2 (7252-7271) there were no significant differences regarding the transcription activity of HPV-38 LCR mutant constructs (**Figure 3B**).

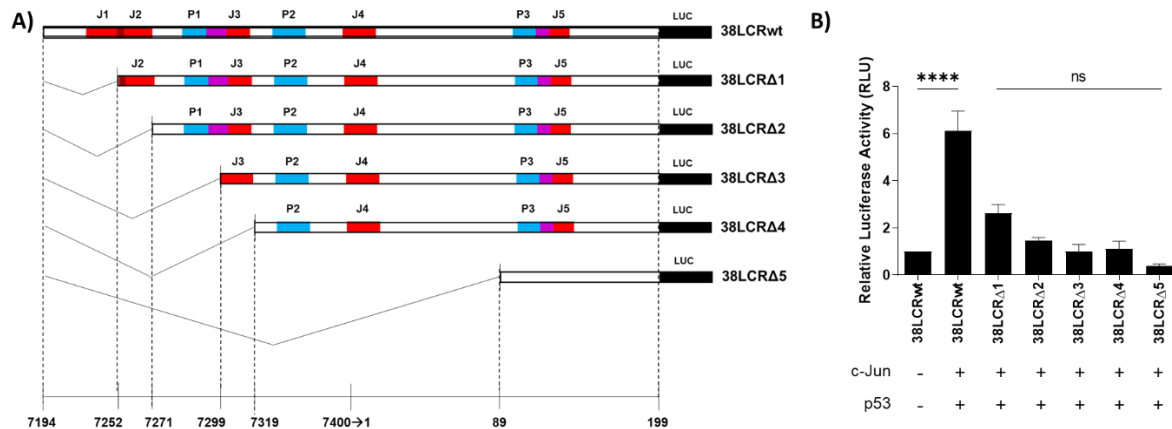


Figure 3. Deletion from the region between nt7194 and nt7252 led to a significant decrease in the activation by c-Jun and p53. (A) The deletion scheme of the pGL3-LCR38 wild-type (LCR38wt). The red dots indicate putative binding sites for c-Jun while the blue dots indicate the putative binding sites for p53. (B) The luciferase activity was measured after co-transfection of each pGL3-LCR38wt or 38LCRΔ1-5 with c-Jun and p53. The pGL3-38LCRwt reporter construct alone was used as a control. Data are presented by firefly luciferase relative to renilla activity and normalized by the empty vectors. Error bars indicate standard deviations of 3 independent experiments. **** $p < 0.0001$.

4.4. Jun and p53 are capable of binding directly on the HPV38 LCR

HKs and 38HKs were transfected with pGL3-38LCR with or without c-Jun and p53 co-transfection. Then, the physical interaction of c-Jun and p53 with the HPV38 LCR was investigated by immunoprecipitation assays using antibodies against either c-Jun or p53. Amplification of the HPV-18 LCR following IP using antibodies against c-Jun or p53 in cells overexpressing these proteins confirms the presence of a specific binding site of c-Jun and p53 within the HPV38LCR. This interaction is magnified in keratinocytes immortalized by HPV-38 in comparison to primary keratinocytes with a 5-fold increment for c-Jun binding and 6.5-fold increment for p53 binding (Figure 4A and 4B).

Next, oligo pulldown experiments using two biotinylated DNA probes, one with the first segment of HPV38 LCR, named 38.1, and the other harboring the second half, named 38.2. This assay revealed that c-Jun and p53 efficiently bind to both fragments

(Figure 4C). Therefore, these factors have binding sites in both regions of the HPV38LCR.

Further, we designed biotin-labeled DNA probes for EMSA assays enclosing either the two c-Jun putative binding sites within the initial segment of the LCR, which was shown to be important for c-Jun and p53 combined effect upon transcriptional activation. Figure 4D demonstrates a specific interaction with both regions, since the binding was increased when c-Jun and p53 were overexpressed, and further shows that the binding is stronger in 38HK than in HK, in agreement with ChIP findings.

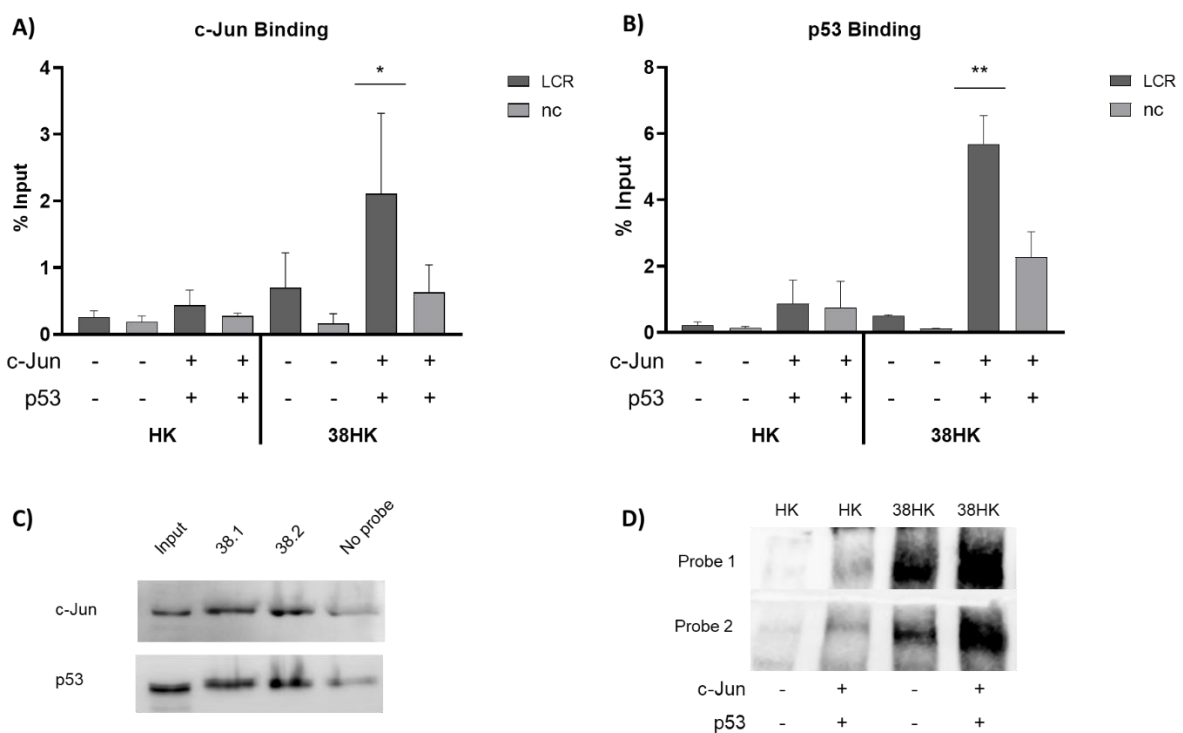


Figure 4. c-Jun and p53 binding to the LCR is enriched in 38HKs. ChIP assay using (A) c-Jun or (B) p53 antibodies was performed in cross-linked chromatin from HKs and 38HKs. Results were analyzed by qPCR with a set of primers spanning HPV 38-LCR or the luciferase gene present in the pGL3 luciferase reporter vector as a negative control (nc). Error bars represent standard deviations of 3 independent experiments performed in duplicate by qPCR. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. (C) DNA pull-down assays were performed to complement the investigation regarding c-Jun and p53 binding to the HPV-38 LCR. The LCR was divided into two fragments, 38.1 corresponds to nucleotide positions

nt7195-nt7387, and 38.2 corresponds to nucleotide positions nt7391-nt199. **(D)** Electromobility shift assay performed with biotinylated probes containing two c-Jun putative binding sites (probe 1: nt7228-nt7253 and probe 2: nt7252-nt7277). Probes were incubated and cross-linked with HK or 38HK nuclear protein extracts.

4.5. c-Jun and p53 have common binding sites within HPV38 LCR

We proceeded to explore the putative binding sites for c-Jun and p53 within the LCR. All putative binding sites for c-Jun and p53 indicated by *in silico* analysis were investigated and are represented in **Figure 5A**. In total, we designed biotinylated probes enclosing the five c-Jun sequence motifs independently and three p53 sequence motifs independently. The corresponding unlabeled probes were used as a control to check the specificity of the binding to these sequences. We observed that c-Jun binds strongly to the J3 site, whereas p53 major binding occurred at the P2 site. Accordingly, the binding of c-Jun and p53 was decreased in presence of the unlabeled probes (**Figure 5A**).

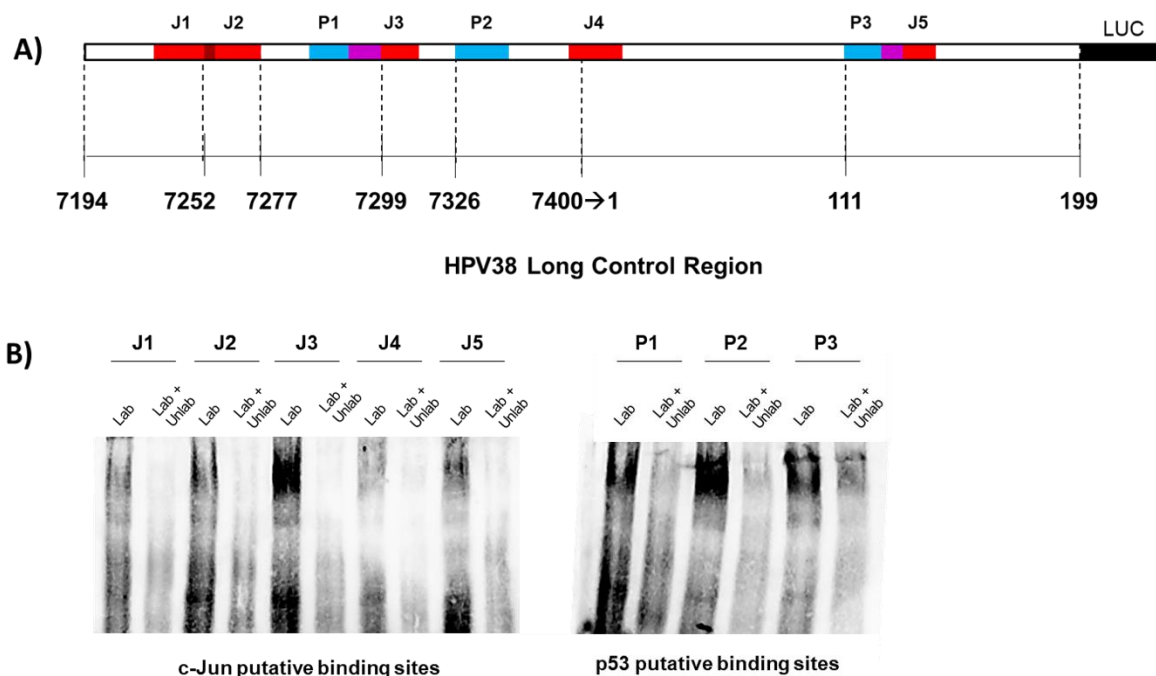


Figure 5. c-Jun and p53 specific binding within the HPV-38 LCR. (A) Scheme representing c-Jun (light red boxes) and p53 (blue boxes) binding sequence motifs

distribution along the HPV-38 LCR. c-Jun and p53 juxtaposed sequences are represented by purple boxes and two c-Jun juxtaposed sequences are represented by dark red boxes. **(B)** Electrophoretic mobility shift assays were performed using 38HK nuclear protein extracts with biotinylated oligonucleotides. Five c-Jun putative binding sites, J1-J5, and three p53 putative binding sites, P1-P3, were investigated. The images shown are representative examples of 2 different experiments.

We performed a supershift assay employing anti-c-Jun antibody using probes J1-J5, and employing anti-p53 antibody using probes P1-P3. We observed a strong binding of c-Jun to J2, J3, and J4 sites and for p53 to P2 and P3 sites (**Figure 6A**). Additionally, the binding of c-Jun and p53 was diminished in the presence of the respective antibodies confirming that the bands detected correspond to these factors' interaction with the probe. Furthermore, we addressed the question of whether c-Jun and p53 have any common binding sites within HPV-38 LCR. The J2, J3, P2, and P3 sequence motifs were then analyzed using the anti-p53 antibody in J2 and J3 binding reactions; and the anti-c-Jun antibody in P2 and P3 binding reactions. The anti-p53 especially affected binding to the J2 site, while anti-c-Jun similarly shifts the binding on P1 and P2 (**Figure 6B**). Therefore, c-Jun and p53 presented affinity to the same motifs and suggest a possible interaction or a complex formation.

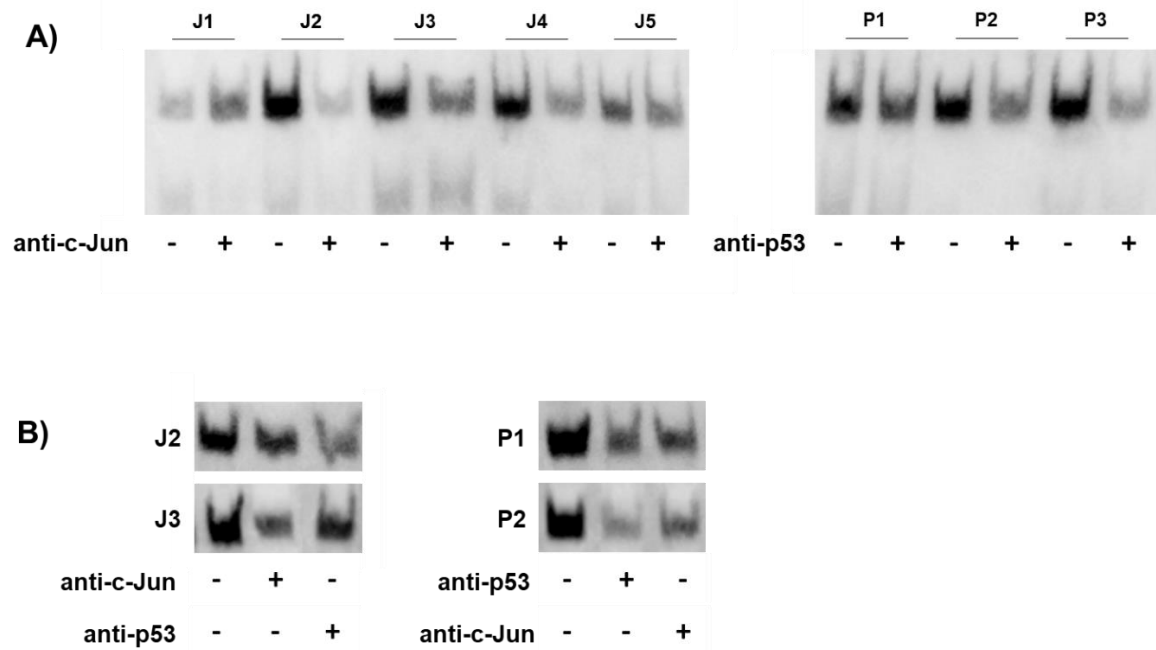


Figure 6. c-Jun and p53 share common binding sites within the HPV-38 LCR. (A) Electromobility shift assay performed with 38HK nuclear protein extracts and biotinylated probes containing c-Jun or p53 putative binding sequence motifs. (A) The supershift was achieved in the presence (+) of anti-c-Jun antibody or anti-53 antibody. (B) The anti-p53 antibody was used to access the binding of p53 to J2 and J3 binding sites. Similarly, the anti-c-Jun antibody was used to access the binding of c-Jun to P1 and P2 binding sites.

5. DISCUSSION

Cellular transcription factors (TFs) are essential to determine the fine-tuned magnitude and temporal regulation of viral transcription (THIERRY, 2009). It is well known for all alpha-HPV types investigated so far that the activator protein 1 (AP-1) bind directly to the LCR and plays a crucial role in transcriptional activation (KYO et al., 1997; KYO; TAM; LAIMINS, 1995; OFFORD; BEARD, 1990; THIERRY et al., 1992; WELTER; ECKERT, 1995). c-Jun is the most extensively studied and the major transcriptional activator of the AP-1 family (ANGEL; KARIN, 1991). This protein is able to regulate and integrate a plethora of signaling pathways involved in the cell cycle and apoptosis, as well as in tumor development and progression, especially in cancers arising from keratinocytes (LOHMAN et al., 1997; MENG; XIA, 2011; MORGAN et al., 2020). The stress response of c-Jun has an important interaction with p53-regulated pathways, such as DNA repair and cell cycle checkpoints (SCHERER et al., 2000; SONG et al., 2010). For instance, c-Jun and p53 functionally interact up-regulating the mismatch repair enzyme MSH232 in response to UV irradiation (SCHERER et al., 2000).

Since most of the findings rely on alpha-HPV types, a thorough understanding of how cutaneous β -HPVs engage interactions with host cells to enable transcription initiation is still missing. Herein, we reveal that the cooperation between the cellular factors c-Jun and p53 is capable of potentializing β -HPV-38 transcriptional activity. Although individually both proteins increased promoter activity, c-Jun and p53 co-expression exhibited a synergism with an 8-fold increment (**Figure 1**)

This effect was only detected for HPV-38 but not for HPV-5 or HPV-49, indicating a specific interaction of these factors with the HPV-38 LCR (**Figure 2**). The *in-silico* search for c-Jun and p53 binding sites within HPVs 5, 38, and 49 LCR showed important differences regarding their responsive elements' arrangements. Interestingly, this analysis indicated c-Jun and p53 putative binding sites contiguously positioned in the 5'-segment of HPV-38 LCR, which are not present in the HPV-5 and HPV-49 LCRs (**Figure 2**). The deletion assay also indicates the requirement of this 5'-segment for the c-Jun and p53 effective HPV-38 promoter activation (**Figure 3**). Accordingly, previous

studies demonstrated that the co-expression of p53 with c-Jun did not influence the activation of the HPV-20 promoters. Otherwise, the activation of HPV-20 promoter was promoted by p53 family members, $\Delta Np63\alpha$ and $TAp63\alpha$, mediated by complex formation with c-Jun (FEI et al., 2006, 2005).

Furthermore, we present data demonstrating the *in vitro* interaction of Jun and p53 directly to the HPV-38 LCR using immunoprecipitation assays, which were further confirmed by DNA pull-down assays (**Figure 4**). The results show that the binding of both factors was stronger using the crosslinked chromatin from HPV38 E6/E7 immortalized keratinocytes compared to primary keratinocytes. It is well known that E6/E7 oncoproteins expression leads to disruption of several molecular pathways related to cell survival, proliferation, including p53 and c-Jun networks (PACINI et al., 2017; ZHANG et al., 2017). E6 and E7 oncoproteins from β -HPV38 are able to up-regulate the expression of the hTERT catalytic subunit of the telomerase and immortalize primary human keratinocytes (GABET et al., 2008). However, HPV-38 E6 does not promote p53 degradation as mucosal HPVs, but instead impairs growth arrest and proapoptotic functions by stabilizing wild-type p53 and activating the expression of its antagonist $\Delta Np73$ (ACCARDI et al., 2006). Additionally, E7 of HPV-38 but not of HPV-10 and HPV-20 induces G1/S control loss (CALDEIRA et al., 2003).

Finally, the electrophoretic mobility shift assays demonstrated that c-Jun has affinity to p53 binding sites and vice-versa (**Figures 4 and 5**). This reciprocal interaction suggests affinities to the same motifs or the formation of a complex. To our knowledge, we describe for the first time the physical interaction between this transcription factor, and the HPV-38 LCR. However, it was reported the direct binding of p63 isoforms through its SAM (sterile alpha motif) domain to c-Jun, which in turn bind to HPV-20 LCR and leads to the promoter activation.

Considering these findings, we hypothesize that during natural HPV infection, exposure to UV leads to c-Jun and p53 accumulation, a situation that we reproduced here by ectopic expression of both factors. Consequently, overexpression of both c-Jun and p53 augments the binding of c-Jun and p53 to the HPV-38 LCR which favors HPV to become transcriptionally active and establish the infection. Epidemiological and molecular evidence shows that HPV-38 has developed mechanisms to alter the response

of normal cells to UV irradiation, favoring skin carcinogenesis (ACCARDI; GHEIT, 2014; TOMMASINO, 2017). The stress response after UV exposure results in JNK (c-Jun N-terminal kinases) activation and c-Jun induction, as well as stabilization and induction of p53 (SHAULIAN et al., 2000). Furthermore, UV radiation induces the recruitment of c-Jun and p53 to the TLR9 (Toll-like receptor 9) promoter, a transmembrane receptor that plays a fundamental role in innate immunity (PACINI et al., 2017). However, HPV-38 E6 and E7 prevent c-Jun and p53 binding at this site, demonstrating that the oncoproteins can regulate these factor's functions.

Further studies should be conducted to complement our hypothesis and to find other crucial cellular players in coupling host-virus molecular networks. These findings emphasize a need for a greater understanding of the transcriptional regulation of cutaneous β -HPVs in infected cells.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCARDI, Rosita et al. Skin human papillomavirus type 38 alters p53 functions by the accumulation of $\Delta Np73$. **EMBO Reports**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 334–340, 2006. DOI: 10.1038/sj.embor.7400615. Disponível em: /pmc/articles/PMC1456898/. Acesso em: 4 jun. 2021.

ACCARDI, Rosita; GHEIT, Tarik. Cutaneous HPV and skin cancer. **La Presse Médicale**, [S. l.], v. 43, n. 12, p. e435–e443, 2014. DOI: 10.1016/J.LPM.2014.08.008.

ALTAMURA, Gennaro; TOMMASINO, Massimo; BORZACCHIELLO, Giuseppe. Cutaneous vs. Mucosal Tropism: The Papillomavirus Paradigm Comes to an “and”. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, p. 588663, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.588663. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 4 jun. 2021.

ANDREWS, Nancy C. Molecules in focus The NF-E2 transcription factor. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 429–432, 1998. DOI: 10.1016/S1357-2725(97)00135-0. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272597001350#BIB1>. Acesso em: 23 abr. 2019.

ANGEL, Peter; KARIN, Michael. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. **Biochimica et biophysica acta**, [S. l.], v. 1072, n. 2–3, p. 129–157, 1991. DOI: 10.1016/0304-419X(91)90011-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1751545/>. Acesso em: 29 jul. 2021.

ARENDS, M. J.; DONALDSON, Y. K.; DUVALL, E.; WYLLIE, A. H.; BIRD, C. C. Human papillomavirus type 18 associates with more advanced cervical neoplasia than human papillomavirus type 16. **Human pathology**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 432–7, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8387954>. Acesso em: 7 fev. 2018.

BARBOSA, M. S.; SCHLEGEL, R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. **Oncogene**, [S. l.], v. 4, n. 12, p. 1529–32, 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2556677>. Acesso em: 6 nov. 2018.

BENAYOUN, Bérénice A.; CABURET, Sandrine; VEITIA, Reiner A. Forkhead transcription factors: key players in health and disease. **Trends in Genetics**, [S. l.], v. 27, n. 6, p. 224–232, 2011. DOI: 10.1016/J.TIG.2011.03.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168952511000448>. Acesso em: 23 abr. 2019.

BERNARD, H. U.; APT, D. Transcriptional control and cell type specificity of HPV gene expression. **Archives of dermatology**, [S. l.], v. 130, n. 2, p. 210–5, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8304760>. Acesso em: 18 jul. 2017.

BERNARD, Hans-Ulrich. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. **Antiviral therapy**, [S. l.], v. 7, n. 4, p.

219–37, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12553476>. Acesso em: 18 jul. 2017.

BERNARD, Hans-Ulrich; BURK, Robert D.; CHEN, Zigui; DOORSLAER, Koenraad Van; HAUSEN, Harald Zur; VILLIERS, Ethel-Michele De. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. **Virology**, [S. l.], v. 401, n. 1, p. 70, 2010. DOI: 10.1016/J.VIROL.2010.02.002.

BORGOGNA, C. et al. Characterization of beta papillomavirus E4 expression in tumours from Epidermodysplasia Verruciformis patients and in experimental models. **Virology**, [S. l.], v. 423, n. 2, p. 195–204, 2012. DOI: 10.1016/J.VIROL.2011.11.029. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22217391/>. Acesso em: 1 nov. 2021.

BOUALLAGA, Isabelle; TEISSIER, Sébastien; YANIV, Moshe; THIERRY, Françoise. HMG-I(Y) and the CBP/p300 Coactivator Are Essential for Human Papillomavirus Type 18 Enhanceosome Transcriptional Activity. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 23, n. 7, p. 2329–2340, 2003. DOI: 10.1128/MCB.23.7.2329-2340.2003/ASSET/F0CAF7DA-1FF8-4F9B-9397-5F3F21526A98/ASSETS/GRAPHIC/MB0730902007.JPEG. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/MCB.23.7.2329-2340.2003>. Acesso em: 1 fev. 2022.

BOUKAMP, P.; PETRUSSEVSKA, R. T.; BREITKREUTZ, D.; HORNING, J.; MARKHAM, A.; FUSENIG, N. E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **The Journal of cell biology**, [S. l.], v. 106, n. 3, p. 761–71, 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2450098>. Acesso em: 29 jan. 2018.

BOUVARD, Véronique et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. **The Lancet. Oncology**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 321–2, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19350698>. Acesso em: 30 nov. 2017.

BRUNI, L.; ALBERO, G.; SERRANO, B.; MENA, M.; GÓMEZ, D.; MUÑOZ, J.; AL, Et. **ICO/IARC information centre on HPV and cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World**. [s.l: s.n.].

BURGER, B.; ITIN, P. H. Epidermodysplasia Verruciformis. **Curr Probl Dermatol. Basel**, [S. l.], v. 45, p. 123–131, 2014. DOI: 10.1159/000356068.

CALDEIRA, Sandra et al. The E6 and E7 Proteins of the Cutaneous Human Papillomavirus Type 38 Display Transforming Properties. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 77, n. 3, p. 2195, 2003. DOI: 10.1128/JVI.77.3.2195-2206.2003. Disponível em: </pmc/articles/PMC140944/>. Acesso em: 26 jul. 2021.

CARRILLO-BELTRÁN, Diego et al. Human Papillomavirus 16 E7 Promotes EGFR/PI3K/AKT1/NRF2 Signaling Pathway Contributing to PIR/NF-κB Activation in Oral Cancer Cells. **Cancers** 2020, Vol. 12, Page 1904, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 1904, 2020. DOI: 10.3390/CANCERS12071904. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/7/1904/htm>. Acesso em: 3 fev. 2022.

CARSON, A.; KHAN, S. A. Characterization of Transcription Factor Binding to Human

- Papillomavirus Type 16 DNA during Cellular Differentiation. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 80, n. 9, p. 4356–4362, 2006. a. DOI: 10.1128/JVI.80.9.4356-4362.2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611894>. Acesso em: 9 fev. 2018.
- CARSON, A.; KHAN, S. A. Characterization of Transcription Factor Binding to Human Papillomavirus Type 16 DNA during Cellular Differentiation. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 80, n. 9, p. 4356–4362, 2006. b. DOI: 10.1128/JVI.80.9.4356-4362.2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611894>. Acesso em: 29 set. 2017.
- CASTRO-MONDRAGON, Jaime A. et al. JASPAR 2022: the 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 50, n. D1, p. D165–D173, 2022. DOI: 10.1093/NAR/GKAB1113. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/50/D1/D165/6446529>. Acesso em: 18 jan. 2022.
- CHEN, Po Ming; CHENG, Ya Wen; WANG, Yao Chen; WU, Tzu Chin; CHEN, Chih Yi; LEE, Huei. Up-Regulation of FOXM1 by E6 Oncoprotein through the MZF1/NKX2-1 Axis Is Required for Human Papillomavirus–Associated Tumorigenesis. **Neoplasia**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 961–971, 2014. DOI: 10.1016/J.NEO.2014.09.010.
- CHOWDHURY, A. M. Masudul Azad; KATOH, Hiroki; HATANAKA, Atsushi; IWANARI, Hiroko; NAKAMURA, Nanami; HAMAKUBO, Takao; NATSUME, Tohru; WAKU, Tsuyoshi; KOBAYASHI, Akira. Multiple regulatory mechanisms of the biological function of NRF3 (NFE2L3) control cancer cell proliferation. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 12494, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-12675-y. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-12675-y>. Acesso em: 7 nov. 2018.
- CID-ARREGUI, Angel. Therapeutic vaccines against human papillomavirus and cervical cancer. **The open virology journal**, [S. l.], v. 3, p. 67–83, 2009. DOI: 10.2174/1874357900903010067. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915722>. Acesso em: 13 ago. 2018.
- COOPER, Simon J.; MACGOWAN, Jacalyn; RANGER-MOORE, James; YOUNG, Matthew R.; COLBURN, Nancy H.; BOWDEN, G. Tim. Expression of Dominant Negative c-jun Inhibits Ultraviolet B-Induced Squamous Cell Carcinoma Number and Size in an SKH-1 Hairless Mouse Model. **Molecular Cancer Research**, [S. l.], v. 1, n. 11, 2003.
- CVEKL, A.; KASHANCHI, F.; BRADY, J. N.; PIATIGORSKY, J. Pax-6 interactions with TATA-box-binding protein and retinoblastoma protein. **Investigative ophthalmology & visual science**, [S. l.], v. 40, n. 7, p. 1343–50, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10359315>. Acesso em: 23 abr. 2019.
- CVEKL, Ales; CALLAERTS, Patrick. PAX6: 25th anniversary and more to learn. **Experimental eye research**, [S. l.], v. 156, p. 10–21, 2017. DOI: 10.1016/J.EXER.2016.04.017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27126352/>. Acesso em: 3 fev. 2022.
- DE JONG, Sarah Jill et al. The human CIB1-EVER1-EVER2 complex governs keratinocyte-intrinsic immunity to β -papillomaviruses. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 215, n. 9, p. 2289–2310, 2018. DOI: 10.1084/jem.20170308.

DE SANJOSÉ, Silvia; DIAZ, Mireia; CASTELLSAGUÉ, Xavier; CLIFFORD, Gary; BRUNI, Laia; MUÑOZ, Nubia; BOSCH, F. Xavier. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **The Lancet. Infectious diseases**, [S. l.], v. 7, n. 7, p. 453–459, 2007. DOI: 10.1016/S1473-3099(07)70158-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17597569/>. Acesso em: 25 jan. 2022.

DE VILLIERS, Ethel-Michele; FAUQUET, Claude; BROKER, Thomas R.; BERNARD, Hans-Ulrich; ZUR HAUSEN, Harald. Classification of papillomaviruses. **Virology**, [S. l.], v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004. DOI: 10.1016/j.virol.2004.03.033. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183049>. Acesso em: 30 nov. 2017.

DE VILLIERS, Ethel Michele. **Cross-roads in the classification of papillomaviruses** *Virology*, , 2013. DOI: 10.1016/j.virol.2013.04.023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23683837/>. Acesso em: 4 jun. 2021.

DEVARY, Y.; GOTTLIEB, R. A.; LAU, L. F.; KARIN, M. Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 2804–2811, 1991. DOI: 10.1128/MCB.11.5.2804-2811.1991.

DEYRIEUX, Adeline F.; WILSON, V. G. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. **Cytotechnology**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 77–83, 2007. DOI: 10.1007/s10616-007-9076-1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003021>. Acesso em: 29 jan. 2018.

DOHRMANN, Cord; GRUSS, Peter; LEMAIRE, Lydia. Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas. **Mechanisms of Development**, [S. l.], v. 92, n. 1, p. 47–54, 2000. DOI: 10.1016/S0925-4773(99)00324-X.

DONG, W.; ARPIN, C.; ACCARDI, R.; GISSMANN, L.; SYLLA, B. S.; MARVEL, J.; TOMMASINO, M. Loss of p53 or p73 in human papillomavirus type 38 E6 and E7 transgenic mice partially restores the UV-activated cell cycle checkpoints. **Oncogene**, [S. l.], v. 27, n. 20, p. 2923–2928, 2008. DOI: 10.1038/sj.onc.1210944. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18026133/>. Acesso em: 4 jun. 2021.

DORÀ, Natalie; OU, Jingxing; KUCEROVA, Romana; PARISI, Ida; WEST, John D.; COLLINSON, J. Martin. PAX6 dosage effects on corneal development, growth, and wound healing. **Developmental Dynamics**, [S. l.], v. 237, n. 5, p. 1295–1306, 2008. DOI: 10.1002/DVDY.21528. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dvdy.21528>. Acesso em: 3 fev. 2022.

ECKERT, R. L.; RORKE, E. A. Molecular biology of keratinocyte differentiation. **Environmental health perspectives**, [S. l.], v. 80, p. 109–116, 1989. DOI: 10.1289/EHP.8980109. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2466639/>. Acesso em: 17 jan. 2022.

ECKERT, Richard L.; WELTER, Jean F. Transcription factor regulation of epidermal keratinocyte gene expression. **Molecular biology reports**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 59–70, 1996. DOI: 10.1007/BF00357073. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8983019/>. Acesso em: 26 jan. 2022.

ECKHARDT, Manon et al. Multiple Routes to Oncogenesis Are Promoted by the Human Papillomavirus–Host Protein Network. **Cancer Discovery**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 1474–1489, 2018. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-1018. Disponível em: <https://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/8/11/1474>. Acesso em: 3 fev. 2022.

EFERL, Robert; WAGNER, Erwin F. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. **Nature Reviews Cancer** 2003 3:11, [S. l.], v. 3, n. 11, p. 859–868, 2003. DOI: 10.1038/nrc1209. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc1209>. Acesso em: 29 jul. 2021.

EGAWA, Nagayasu; DOORBAR, John. The low-risk papillomaviruses. **Virus Research**, [S. l.], v. 231, p. 119–127, 2017. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.12.017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28040475>. Acesso em: 13 ago. 2018.

EICHNER, R.; SUN, T. T.; AEBI, U. The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. **The Journal of cell biology**, [S. l.], v. 102, n. 5, p. 1767–77, 1986. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2422179>. Acesso em: 2 fev. 2018.

FEI, J. W.; ANGEL, P.; WEI, Q. X.; DE VILLIERS, E. M. Tap63 α indirectly regulates a cutaneous HPV promoter through complex formation with Jun family members. **Oncogene** 2006 25:28, [S. l.], v. 25, n. 28, p. 3914–3923, 2006. DOI: 10.1038/sj.onc.1209420. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1209420>. Acesso em: 16 nov. 2021.

FEI, Jian Wei; WEI, Quan Xiang; ANGEL, Peter; DE VILLIERS, Ethel Michele. Differential Enhancement of a Cutaneous HPV Promoter by Δ NP63 α , JUN and Mutant p53. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.4.5.1653>, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 689–696, 2005. DOI: 10.4161/CC.4.5.1653. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.4.5.1653>. Acesso em: 16 nov. 2021.

FILHO, Sérgio Menezes Amaro et al. Methylation at 3'LCR of HPV16 can be affected by patient age and disruption of E1 or E2 genes. **Virus Research**, [S. l.], v. 232, p. 48–53, 2017. DOI: 10.1016/j.virusres.2017.01.022. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28143725>. Acesso em: 16 set. 2017.

FINNEGAN, Alex; CHO, Raymond J.; LUU, Alan; HARIRCHIAN, Paymann; LEE, Jerry; CHENG, Jeffrey B.; SONG, Jun S. Single-cell transcriptomics reveals spatial and temporal turnover of keratinocyte differentiation regulators. **Frontiers in Genetics**, [S. l.], v. 10, n. JUL, p. 775, 2019. DOI: 10.3389/FGENE.2019.00775/BIBTEX.

FRATTINI, M. G.; LIM, H. B.; LAIMINS, L. A. In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 93, n. 7, p. 3062–7, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8610168>. Acesso em: 9 fev. 2018.

FRITZ, G.; KAINA, B. Activation of c-Jun N-Terminal Kinase 1 by UV Irradiation Is Inhibited by Wortmannin without Affecting c-jun Expression. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 1768, 1999. DOI: 10.1128/MCB.19.3.1768. Disponível em: </pmc/articles/PMC83970/>. Acesso em: 30 jul. 2021.

FUJISAKI, Hitomi; FUTAKI, Sugiko; YAMADA, Masashi; SEKIGUCHI, Kiyotoshi; HAYASHI, Toshihiko; IKEJIMA, Takashi; HATTORI, Shunji. Respective optimal calcium concentrations for proliferation on type I collagen fibrils in two keratinocyte line cells, HaCaT and FEPE1L-8. **Regenerative Therapy**, [S. l.], v. 8, p. 73, 2018. DOI: 10.1016/J.RETH.2018.04.001. Disponível em: /pmc/articles/PMC6146901/. Acesso em: 16 jan. 2022.

GABET, Anne-Sophie; ACCARDI, Rosita; BELLOPEDE, Angelica; POPP, Susanne; BOUKAMP, Petra; SYLLA, Bakary S.; LONDOÑO-VALLEJO, J. Arturo; TOMMASINO, Massimo. Impairment of the telomere/telomerase system and genomic instability are associated with keratinocyte immortalization induced by the skin human papillomavirus type 38. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 622–632, 2008. DOI: 10.1096/FJ.07-8389COM. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.07-8389com>. Acesso em: 17 nov. 2021.

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**, [S. l.], v. 62, n. 11, p. 4321–4330, 1988. DOI: 10.1128/jvi.62.11.4321-4330.1988. Disponível em: /pmc/articles/PMC253867/?report=abstract. Acesso em: 1 abr. 2021.

GARCÍA-VALLVÉ, Santiago; IGLESIAS-ROZAS, José R.; ALONSO, Ángel; BRAVO, Ignacio G. Different papillomaviruses have different repertoires of transcription factor binding sites: convergence and divergence in the upstream regulatory region. **BMC Evolutionary Biology**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 20, 2006. DOI: 10.1186/1471-2148-6-20. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16526953>. Acesso em: 9 fev. 2018.

GARCÍA-VILLEGAS, Refugio; ESCAMILLA, Juan; SÁNCHEZ-GUZMÁN, Erika; PASTÉN, Angela; HERNÁNDEZ-QUINTERO, Miriam; GÓMEZ-FLORES, Eber; CASTRO-MUÑOZLEDO, Federico. Pax-6 is expressed early in the differentiation of a corneal epithelial model system. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 220, n. 2, p. 348–356, 2009. DOI: 10.1002/jcp.21771. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.21771>. Acesso em: 23 abr. 2019.

HAUBST, Nicole; BERGER, Joachim; RADJENDIRANE, Venugopal; GRAW, Jochen; FAVOR, Jack; SAUNDERS, Grady F.; STOYKOVA, Anastassia; GÖTZ, Magdalena. Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development. **Development**, [S. l.], v. 131, n. 24, p. 6131–6140, 2004. DOI: 10.1242/DEV.01524. Disponível em: <https://journals.biologists.com/dev/article/131/24/6131/42693/Molecular-dissection-of-Pax6-function-the-specific>. Acesso em: 3 fev. 2022.

HESS, Jochen; ANGEL, Peter; SCHORPP-KISTNER, Marina. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 117, n. 25, p. 5965–5973, 2004. DOI: 10.1242/JCS.01589.

HOCHEDLINGER, Konrad; WAGNER, Erwin F.; SABAPATHY, Kanaga. Differential effects of JNK1 and JNK2 on signal specific induction of apoptosis. **Oncogene**, [S. l.], v. 21, n. 15, p. 2441–2445, 2002. DOI: 10.1038/SJ.ONC.1205348.

HOWLEY, Peter M.; PFISTER, Herbert J. **Beta genus papillomaviruses and skin cancer***Virology* Academic Press Inc., , 2015. DOI: 10.1016/j.virol.2015.02.004.

JABLONSKA, S.; DABROWSKI, J.; JAKUBOWICZ, K. Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. **Cancer research**, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 583–9, 1972. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5061309>. Acesso em: 17 nov. 2019.

JAISWAL, Neha; JOHN, Rince; CHAND, Vaibhav; NAG, Alo. Oncogenic Human Papillomavirus 16E7 modulates SUMOylation of FoxM1b. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [S. l.], v. 58, p. 28–36, 2015. DOI: 10.1016/J.BIOCEL.2014.11.002.

JOHNSON, Jeffrey A.; JOHNSON, Delinda A.; KRAFT, Andrew D.; CALKINS, Marcus J.; JAKEL, Rebekah J.; VARGAS, Marcelo R.; CHEN, Pei Chun. The Nrf2–ARE Pathway. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 1147, n. 1, p. 61–69, 2008. DOI: 10.1196/ANNALS.1427.036. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1196/annals.1427.036>. Acesso em: 3 fev. 2022.

KAJITANI, Naoko; SATSUKA, Ayano; KAWATE, Akifumi; SAKAI, Hiroyuki. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 3, n. APR, 2012. DOI: 10.3389/FMICB.2012.00152. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3334820/](http://pmc/articles/PMC3334820/). Acesso em: 27 jan. 2022.

KALINSKA-BIENIAS, Agnieszka; KOWALEWSKI, Cezary; MAJEWSKI, Sławomir. **The EVER genes - The genetic etiology of carcinogenesis in epidermodysplasia verruciformis and a possible role in non-epidermodysplasia verruciformis patients***Postepy Dermatologii i Alergologii* Termedia Publishing House Ltd., , 2016. DOI: 10.5114/ada.2016.59145.

KANNAN, Sankaranarayanan; JAISWAL, Anil K. Low and High Dose UVB Regulation of Transcription Factor NF-E2-Related Factor 2. **Cancer Research**, [S. l.], v. 66, n. 17, p. 8421–8429, 2006. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1181. Disponível em: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/66/17/8421>. Acesso em: 3 fev. 2022.

KATSUOKA, Fumiki; YAMAMOTO, Masayuki. Small Maf proteins (MafF, MafG, MafK): History, structure and function. **Gene**, [S. l.], v. 586, n. 2, p. 197–205, 2016. DOI: 10.1016/J.GENE.2016.03.058.

KIM, Yu Mee; REED, William; WU, Weidong; BROMBERG, Philip A.; GRAVES, Lee M.; SAMET, James M. Zn²⁺-induced IL-8 expression involves AP-1, JNK, and ERK activities in human airway epithelial cells. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, [S. l.], v. 290, n. 5, 2006. DOI: 10.1152/ajplung.00479.2005.

KOLLY, Carine; SUTER, Maja M.; MÜLLER, Eliane J. Proliferation, Cell Cycle Exit, and Onset of Terminal Differentiation in Cultured Keratinocytes: Pre-Programmed Pathways in Control of C-Myc and Notch1 Prevail Over Extracellular Calcium Signals. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 124, n. 5, p. 1014–1025, 2005. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23655.x. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15854044>. Acesso em: 2 fev. 2018.

KOMBE KOMBE, Arnaud John; LI, Bofeng; ZAHID, Ayesha; MENGIST, Hylemariam Mihiretie; BOUNDA, Guy Armel; ZHOU, Ying; JIN, Tengchuan. Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation. **Frontiers in Public Health**, [S. l.], v. 8, p. 552028, 2020. DOI: 10.3389/FPUBH.2020.552028. Disponível em: </pmc/articles/PMC7855977/>. Acesso em: 25 jan. 2022.

KURIMA, Kiyoto; YANG, Yandan; SORBER, Katherine; GRIFFITH, Andrew J. Characterization of the transmembrane channel-like (TMC) gene family: functional clues from hearing loss and epidermodysplasia verruciformis. **Genomics**, [S. l.], v. 82, n. 3, p. 300–8, 2003. DOI: 10.1016/s0888-7543(03)00154-x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12906855>. Acesso em: 18 nov. 2019.

KYO, Satoru; KLUMPP, David J.; INOUE, Masaki; KANAYA, Taro; LAIMINS, Laimonis A. Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 78, n. 2, p. 401–411, 1997. DOI: 10.1099/0022-1317-78-2-401.

KYO, Satoru; TAM, Amy; LAIMINS, Laimonis A. Transcriptional Activity of Human Papillomavirus Type 31b Enhancer Is Regulated through Synergistic Interaction of AP1 with Two Novel Cellular Factors. **Virology**, [S. l.], v. 211, n. 1, p. 184–197, 1995. DOI: 10.1006/viro.1995.1390. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7645210>. Acesso em: 18 jul. 2017.

LANDINI, MM et al. Lack of EVER2 protein in two epidermodysplasia verruciformis patients with skin cancer presenting previously unreported homozygous genetic deletions in the EVER2 gene. **The Journal of investigative dermatology**, [S. l.], v. 132, n. 4, p. 1305–1308, 2012. DOI: 10.1038/JID.2011.399. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22158547/>. Acesso em: 1 nov. 2021.

LAZARCZYK, M.; CASSONNET, P.; PONS, C.; JACOB, Y.; FAVRE, M. The EVER Proteins as a Natural Barrier against Papillomaviruses: a New Insight into the Pathogenesis of Human Papillomavirus Infections. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 73, n. 2, p. 348–370, 2009. a. DOI: 10.1128/mubr.00033-08.

LAZARCZYK, M.; FAVRE, M. Role of Zn²⁺ Ions in Host-Virus Interactions. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 82, n. 23, p. 11486–11494, 2008. DOI: 10.1128/jvi.01314-08.

LAZARCZYK, Maciej; CASSONNET, Patricia; PONS, Christian; JACOB, Yves; FAVRE, Michel. The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, [S. l.], v. 73, n. 2, p. 348–70, 2009. b. DOI: 10.1128/MMBR.00033-08. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487731>. Acesso em: 9 nov. 2019.

LAZARCZYK, Maciej; DALARD, Cécile; HAYDER, Myriam; DUPRE, Loïc; PIGNOLET, Béatrice; MAJEWSKI, Slawomir; VUILLIER, Françoise; FAVRE, Michel; LIBLAU, Roland S. EVER proteins, key elements of the natural anti-human papillomavirus barrier, are regulated upon T-cell activation. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 6, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0039995.

LAZARCZYK, Maciej; PONS, Christian; MENDOZA, José Andrés; CASSONNET, Patricia; JACOB, Yves; FAVRE, Michel. Regulation of cellular zinc balance as a potential mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 205, n. 1, p. 35–42, 2008. DOI: 10.1084/jem.20071311.

LEE, Jong Min; JOHNSON, Jeffrey A. An Important Role of Nrf2-ARE Pathway in the Cellular Defense Mechanism. **BMB Reports**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 139–143, 2004. DOI: 10.5483/BMBREP.2004.37.2.139.

LI, Caiyun G.; ECCLES, Michael R. PAX genes in cancer; friends or foes? **Frontiers in Genetics**, [S. l.], v. 3, n. JAN, p. 6, 2012. DOI: 10.3389/FGENE.2012.00006/BIBTEX.

LI, Jin; YAN, Tingyuan; WU, Xiang; KE, Xueping; LI, Xin; ZHU, Yumin; YANG, Jianrong; LI, Zhongwu. Aberrant overexpression of transcription factor Forkhead box D1 predicts poor prognosis and promotes cancer progression in HNSCC. **BMC cancer**, [S. l.], v. 21, n. 1, 2021. DOI: 10.1186/S12885-021-08868-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34772357/>. Acesso em: 3 fev. 2022.

LIU, Jie; WANG, Ya Qi; NIU, Hai Bo; ZHANG, Chun Xiao. PAX9 functions as a tumor suppressor gene for cervical cancer via modulating cell proliferation and apoptosis. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1002/KJM2.12489. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/kjm2.12489>. Acesso em: 3 fev. 2022.

LO, Pang-Kuo; HUANG, Sheng-Zhu; CHEN, Hsiang-Chin; WANG, Fung-Fang. The Prosurvival Activity of p53 Protects Cells from UV-Induced Apoptosis by Inhibiting c-Jun NH2-terminal Kinase Activity and Mitochondrial Death Signaling. **Cancer Research**, [S. l.], v. 64, n. 23, p. 8736–8745, 2004. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2584. Disponível em: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/64/23/8736>. Acesso em: 30 jul. 2021.

LOHMAN, Frans P.; GIBBS, Susan; FISCHER, David F.; BORGSTEIN, Anne-Marijke B.; VAN DE PUTTE, Pieter; BACKENDORF, Claude. Involvement of c-JUN in the regulation of terminal differentiation genes in normal and malignant keratinocytes. **Oncogene** 1997 14:13, [S. l.], v. 14, n. 13, p. 1623–1627, 1997. DOI: 10.1038/sj.onc.1200974. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1200974>. Acesso em: 29 jul. 2021.

LOMAS, A.; LEONARDI-BEE, J.; BATH-HEXTALL, F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer **British Journal of Dermatology**, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2012.10830.x.

LOTZE, Michael T.; TRACEY, Kevin J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 331–342, 2005. DOI: 10.1038/nri1594. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nri1594>. Acesso em: 7 nov. 2018.

MANSOURI, Ahmed; HALLONET, Marc; GRUSS, Peter. Pax genes and their roles in cell differentiation and development. **Current Opinion in Cell Biology**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 851–857, 1996. DOI: 10.1016/S0955-0674(96)80087-1.

MATYS, V. et al. TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 34, n. 90001, p. D108–D110, 2006. DOI: 10.1093/nar/gkj143. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkj143>. Acesso em: 27 abr. 2019.

MEASSO DO BONFIM, Caroline; SIMÃO SOBRINHO, João; LACERDA NOGUEIRA, Rodrigo; SALGADO KUPPER, Daniel; CARDOSO PEREIRA VALERA, Fabiana; LACERDA NOGUEIRA, Maurício; VILLA, Luisa Lina; RAHAL, Paula; SICHERO, Laura. Differences in Transcriptional Activity of Human Papillomavirus Type 6 Molecular Variants in Recurrent Respiratory Papillomatosis. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. e0132325, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0132325. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26151558>. Acesso em: 30 nov. 2017.

MENG, Qinghang; XIA, Ying. c-Jun, at the crossroad of the signaling network. **Protein & Cell**, [S. l.], v. 2, n. 11, p. 889, 2011. DOI: 10.1007/S13238-011-1113-3. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC4875184/>. Acesso em: 29 jul. 2021.

MICALLEF, Ludovic; BELAUBRE, Françoise; PINON, Aline; JAYAT-VIGNOLES, Chantal; DELAGE, Christiane; CHARVERON, Marie; SIMON, Alain. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. **Experimental Dermatology**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 143–151, 2009. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2008.00775.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18637039>. Acesso em: 2 fev. 2018.

MILNE, Diane M.; CAMPBELL, Linda E.; CAMPBELL, David G.; MEEK, David W. p53 Is Phosphorylated in Vitro and in Vivo by an Ultraviolet Radiation-induced Protein Kinase Characteristic of the c-Jun Kinase, JNK1 (*). **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 270, n. 10, p. 5511–5518, 1995. DOI: 10.1074/JBC.270.10.5511. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925818947836/fulltext>. Acesso em: 30 jul. 2021.

MITTAL, Suruchi; BANKS, Lawrence. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. **Mutation research. Reviews in mutation research**, [S. l.], v. 772, p. 23–35, 2017. DOI: 10.1016/J.MRREV.2016.08.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28528687/>. Acesso em: 25 jan. 2022.

MORALE, Mirian Gallote; DA SILVA ABJAUDE, Walason; SILVA, Aline Montenegro; VILLA, Luisa Lina; BOCCARDO, Enrique. HPV-transformed cells exhibit altered HMGB1-TLR4/MyD88-SARM1 signaling axis. **Scientific Reports 2018 8:1**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-21416-8. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-21416-8>. Acesso em: 29 jan. 2022.

MORGAN, Ethan L.; SCARTH, James A.; PATTERSON, Molly R.; WASSON, Christopher W.; HEMINGWAY, Georgia C.; BARBA-MORENO, Diego; MACDONALD, Andrew. E6-mediated activation of JNK drives EGFR signalling to promote proliferation and viral oncoprotein expression in cervical cancer. **Cell Death & Differentiation 2021 28:5**, [S. l.], v. 28, n. 5, p. 1669–1687, 2020. DOI: 10.1038/s41418-020-00693-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41418-020-00693-9>. Acesso em: 29 jul. 2021.

NUNES, Emily Montosa et al. E6/e7 functional differences among two natural human papillomavirus 18 variants in human keratinocytes. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 6, 2021. DOI: 10.3390/V13061114/S1. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8228617/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/348228617/). Acesso em: 29 jan. 2022.

O'CONNOR, Mark; CHAN, Shih-Yen; BERNARD, Hans-Ulrich. Transcription Factor Binding Sites in the Long Control Region of Genital HPVs. **Human Papillomaviruses. Compendium, part III-A. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory**, [S. l.], p. 21–40, 1995.

OFFORD, E. A.; BEARD, P. A member of the activator protein 1 family found in keratinocytes but not in fibroblasts required for transcription from a human papillomavirus type 18 promoter. **Journal of virology**, [S. l.], v. 64, n. 10, p. 4792–8, 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2168967>. Acesso em: 26 abr. 2019.

ORTH, Gérard. **Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses** **Seminars in Immunology**, 2006. a. DOI: 10.1016/j.smim.2006.07.008.

ORTH, Gérard. Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses. **Seminars in Immunology**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 362–374, 2006. b. DOI: 10.1016/J.SMIM.2006.07.008.

OZBUN, M. A.; MEYERS, C. Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. **Journal of virology**, [S. l.], v. 71, n. 7, p. 5161–72, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9188583>. Acesso em: 9 fev. 2018.

OZBUN, M. A.; MEYERS, C. Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. **Virology**, [S. l.], v. 248, n. 2, p. 218–30, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721231>. Acesso em: 9 fev. 2018.

PACINI, Laura; CERAOLO, Maria Grazia; VENUTI, Assunta; MELITA, Giusi; HASAN, Uzma A.; ACCARDI, Rosita; TOMMASINO, Massimo. UV Radiation Activates Toll-Like Receptor 9 Expression in Primary Human Keratinocytes, an Event Inhibited by Human Papillomavirus 38 E6 and E7 Oncoproteins. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 91, n. 19, p. 1123–1140, 2017. DOI: 10.1128/JVI.01123-17/ASSET/927896C1-3327-4790-BCD6-80DC33BA0D8F/ASSETS/GRAPHIC/ZJV9991829220008.JPEG. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JVI.01123-17>. Acesso em: 17 nov. 2021.

PANG, Xiaobao; ZHANG, Yao; WEI, Heng; ZHANG, Jing; LUO, Qingshuang; HUANG, Chenglin; ZHANG, Shulan. Expression and Effects of High-Mobility Group Box 1 in Cervical Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 8699–8712, 2014. DOI: 10.3390/ijms15058699. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24837834>. Acesso em: 7 nov. 2018.

PINIDIS, Petros; TSIKOURAS, Panagiotis; IATRAKIS, Georgios; ZERVOUDIS, Stefanos; KOUKOULI, Zacharoula; BOTHOU, Anastasia; GALAZIOS, Georgios; VLADAREANU, Simona. Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis.

Mædica, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 48, 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC5394500/>. Acesso em: 25 jan. 2022.

PLUMMER, Martyn; DE MARTEL, Catherine; VIGNAT, Jerome; FERLAY, Jacques; BRAY, Freddie; FRANCESCHI, Silvia. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **The Lancet Global Health**, [S. l.], v. 4, n. 9, p. e609–e616, 2016. DOI: 10.1016/S2214-109X(16)30143-7. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27470177>. Acesso em: 13 ago. 2018.

PS, Gowda; F, Zhou; LV, Chadwell; DG, McEwen. p53 binding prevents phosphatase-mediated inactivation of diphosphorylated c-Jun N-terminal kinase. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 287, n. 21, p. 17554–17567, 2012. DOI: 10.1074/JBC.M111.319277. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22467874/>. Acesso em: 30 jul. 2021.

QU, Jieqiong; YI, Guoqiang; ZHOU, Huiqing. P63 cooperates with CTCF to modulate chromatin architecture in skin keratinocytes. **Epigenetics and Chromatin**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–13, 2019. DOI: 10.1186/S13072-019-0280-Y/FIGURES/5. Disponível em: <https://epigeneticsandchromatin.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13072-019-0280-y>. Acesso em: 26 jan. 2022.

RAMOZ, Nicolas; RUEDA, Luis Alfredo; BOUADJAR, Bakar; MONTOYA, Luz Stella; ORTH, Gerard; FAVRE, Michel. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. **Nature Genetics**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 579–581, 2002. DOI: 10.1038/ng1044.

RAMOZ, Nicolas; TAÏEB, Alain; RUEDA, Luis Alfredo; MONTOYA, Luz Stella; BOUADJAR, Bakar; FAVRE, Michel; ORTH, Gérard. Evidence for a nonallelic heterogeneity of epidermodysplasia verruciformis with two susceptibility loci mapped to chromosome regions 2p21- p24 and 17q25. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 114, n. 6, p. 1148–1153, 2000. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00996.x.

RAVNAN, J. B.; GILBERT, D. M.; TEN HAGEN, K. G.; COHEN, S. N. Random-choice replication of extrachromosomal bovine papillomavirus (BPV) molecules in heterogeneous, clonally derived BPV-infected cell lines. **Journal of virology**, [S. l.], v. 66, n. 12, p. 6946–52, 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1331505>. Acesso em: 9 fev. 2018.

RJ, Davis. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell**, [S. l.], v. 103, n. 2, p. 239–252, 2000. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)00116-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11057897/>. Acesso em: 30 jul. 2021.

SCHERER, Stefan J.; MAIER, Sandra M.; SEIFERT, Markus; HANSELMANN, Rainer G.; ZANG, Klaus D.; MÜLLER-HERMELINK, Hans K.; ANGEL, Peter; WELTER, Cornelius; SCHARTL, Manfred. p53 and c-Jun Functionally Synergize in the Regulation of the DNA Repair Gene hMSH2 in Response to UV *. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 275, n. 48, p. 37469–37473, 2000. DOI: 10.1074/JBC.M006990200. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925820884488/fulltext>. Acesso em: 29 jul. 2021.

SCHIFFMAN, Mark; CASTLE, Philip E.; JERONIMO, Jose; RODRIGUEZ, Ana C.; WACHOLDER, Sholom. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, [S. l.], v.

370, n. 9590, p. 890–907, 2007. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61416-0. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826171>. Acesso em: 13 ago. 2018.

SERRANO, Beatriz; BROTONS, María; BOSCH, Francesc Xavier; BRUNI, Laia. Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [S. l.], v. 47, p. 14–26, 2018. DOI: 10.1016/J.BPOBGYN.2017.08.006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693417301244>. Acesso em: 9 ago. 2018.

SHAULIAN, Eitan; KARIN, Michael. AP-1 as a regulator of cell life and death. **Nature Cell Biology** 2002 4:5, [S. l.], v. 4, n. 5, p. E131–E136, 2002. DOI: 10.1038/ncb0502-e131. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncb0502-e131>. Acesso em: 29 jul. 2021.

SHAULIAN, Eitan; SCHREIBER, Martin; PIU, Fabrice; BEECHE, Michelle; WAGNER, Erwin F.; KARIN, Michael. The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. **Cell**, [S. l.], v. 103, n. 6, p. 897–908, 2000. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00193-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11136975/>. Acesso em: 2 jun. 2021.

SHELTON, Phillip; JAISWAL, Anil K. The transcription factor NF-E2-related factor 2 (nrf2): A protooncogene? **FASEB Journal**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 414–423, 2013. DOI: 10.1096/FJ.12-217257.

SICHERO, Laura; FRANCO, Eduardo Luis; VILLA, Luisa Lina. Different P105 Promoter Activities among Natural Variants of Human Papillomavirus Type 18. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 191, n. 5, p. 739–742, 2005. DOI: 10.1086/427825. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15688288>. Acesso em: 30 nov. 2017.

SICHERO, Laura; SOBRINHO, João Simão; VILLA, Luisa Lina. Identification of Novel Cellular Transcription Factors that Regulate Early Promoters of Human Papillomavirus Types 18 and 16. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 206, n. 6, p. 867–874, 2012. DOI: 10.1093/infdis/jis430. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740717>. Acesso em: 18 jul. 2017.

SIEGENTHALER, Beat. The Nrf3 Transcription Factor and its Novel Roles in Keratinocytes. [S. l.], 2017. DOI: 10.3929/ETHZ-B-000198225. Disponível em: <https://www.research-collection.ethz.ch/handle/20.500.11850/198225>. Acesso em: 7 nov. 2018.

SONG, Ji-young; HAN, Hye-Sook; SABAPATHY, Kanaga; LEE, Byung-Moo; YU, Eunsil; CHOI, Jene. Expression of a Homeostatic Regulator, Wip1 (Wild-type p53-induced Phosphatase), Is Temporally Induced by c-Jun and p53 in Response to UV Irradiation *. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 285, n. 12, p. 9067–9076, 2010. DOI: 10.1074/JBC.M109.070003. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925820873037/fulltext>. Acesso em: 29 jul. 2021.

STANLEY, Margaret. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecologic Oncology**, [S. l.], v. 109, n. 2, p. S15–S21, 2008. DOI: 10.1016/J.YGYNO.2008.02.003. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090825808001054#bib7>. Acesso em: 15 ago. 2018.

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**, [S. l.], v. 146, n. 11, p. 2069–84, 2001.

SUN, Ruifang; LIU, Zhigang; TONG, Dongdong; YANG, Yang; GUO, Bo; WANG, Xiaofei; ZHAO, Lingyu; HUANG, Chen. miR-491-5p, mediated by Foxi1, functions as a tumor suppressor by targeting Wnt3a/ β -catenin signaling in the development of gastric cancer. **Cell Death & Disease** 2017 8:3, [S. l.], v. 8, n. 3, p. e2714–e2714, 2017. DOI: 10.1038/cddis.2017.134. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/cddis2017134>. Acesso em: 3 fev. 2022.

TAN, S. H.; LEONG, L. E.; WALKER, P. A.; BERNARD, H. U. 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. **Journal of virology**, [S. l.], v. 68, n. 10, p. 6411–20, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8083979>. Acesso em: 30 nov. 2017.

TANAKA, Fumika; UDA, Minori; HIROSE, Yuina; HIRAI, Yohei. Restoration of calcium-induced differentiation potential and tight junction formation in HaCaT keratinocytes by functional attenuation of overexpressed high mobility group box-1 protein. **Cytotechnology**, [S. l.], v. 72, n. 1, p. 165–174, 2020. DOI: 10.1007/S10616-019-00367-6/FIGURES/4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10616-019-00367-6>. Acesso em: 1 fev. 2022.

TANG, Daolin; KANG, Rui; ZEH, Herbert J.; LOTZE, Michael T. High-mobility group box 1 and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, [S. l.], v. 1799, n. 1–2, p. 131–140, 2010. DOI: 10.1016/J.BBAGRM.2009.11.014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874939909001606>. Acesso em: 7 nov. 2018.

TENCHINI, M. L.; RANZATI, C.; MALCOVATI, M. Culture techniques for human keratinocytes. **Burns**, [S. l.], v. 18, n. SUPPL. 1, p. S11–S16, 1992. DOI: 10.1016/0305-4179(92)90104-3.

THIERRY, F.; HEARD, J. M.; DARTMANN, K.; YANIV, M. Characterization of a transcriptional promoter of human papillomavirus 18 and modulation of its expression by simian virus 40 and adenovirus early antigens. **Journal of virology**, [S. l.], v. 61, n. 1, p. 134–42, 1987. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3023691>. Acesso em: 11 out. 2019.

THIERRY, F.; SPYROU, G.; YANIV, M.; HOWLEY, P. Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. **Journal of virology**, [S. l.], v. 66, n. 6, p. 3740–8, 1992.

THIERRY, Françoise. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. **Virology**, [S. l.], v. 384, n. 2, p. 375–379, 2009. DOI: 10.1016/j.virol.2008.11.014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682208007289>. Acesso em: 18 jul. 2017.

TOMIC-CANIC, Marjana; KOMINE, Mayumi; FREEDBERG, Irwin M.; BLUMENBERG, Miroslav. Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes. **Journal of dermatological science**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 167–181, 1998. DOI: 10.1016/S0923-1811(98)00016-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9697045/>. Acesso em: 26 jan. 2022.

TOMMASINO, Massimo. **The biology of beta human papillomaviruses** **Virus Research** Elsevier B.V., , 2017. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.11.013.

TONG, Kuo; HU, Zhongliang. FOXI1 expression in chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma: a study of The Cancer Genome Atlas transcriptome-based outlier mining and immunohistochemistry. **Virchows Archiv**, [S. l.], v. 478, n. 4, p. 647–658, 2021. DOI: 10.1007/S00428-020-02900-X/FIGURES/6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00428-020-02900-x>. Acesso em: 3 fev. 2022.

TRIPATHI, Alok; SHRINET, Kriti; KUMAR, Arvind. HMGB1 protein as a novel target for cancer. **Toxicology Reports**, [S. l.], v. 6, p. 253–261, 2019. DOI: 10.1016/J.TOXREP.2019.03.002.

VAN DOORSLAER, Koenraad et al. The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 45, n. D1, p. D499–D506, 2017. DOI: 10.1093/nar/gkw879. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28053164>. Acesso em: 3 out. 2017.

VAN DOORSLAER, Koenraad; BERNARD, Hans-Ulrich; CHEN, Zigui; DE VILLIERS, Ethel-Michelle; ZUR HAUSEN, Harald; BURK, Robert D. Papillomaviruses: evolution, Linnaean taxonomy and current nomenclature. **Trends in microbiology**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 49–50; author reply 50-1, 2011. DOI: 10.1016/j.tim.2010.11.004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144754>. Acesso em: 30 nov. 2017.

VASILJEVIĆ, Nataša; NIELSEN, Lone; DOHERTY, Geoff; DILLNER, Joakim; FORSLUND, Ola; NORRILD, Bodil. Differences in transcriptional activity of cutaneous human papillomaviruses. **Virus Research**, [S. l.], v. 137, n. 2, p. 213–219, 2008. DOI: 10.1016/j.virusres.2008.07.013.

VATS, Arushi; TREJO-CERRO, Oscar; THOMAS, Miranda; BANKS, Lawrence. Human papillomavirus E6 and E7: What remains? **Tumour Virus Research**, [S. l.], v. 11, p. 200213, 2021. DOI: 10.1016/J.TVR.2021.200213.

VENUTI, Assunta; MUSARRA-PIZZO, Maria; PENNISI, Rosamaria; TANKOV, Stoyan; MEDICI, Maria Antonietta; MASTINO, Antonio; REBANE, Ana; SCIORTINO, Maria Teresa. HSV-1\EGFP stimulates miR-146a expression in a NF-κB-dependent manner in monocytic THP-1 cells. **Scientific Reports 2019 9:1**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-41530-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-41530-5>. Acesso em: 8 nov. 2021.

WALBOOMERS, Jan M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, [S. l.], v. 189, n. 1, p. 12–19, 1999. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10451482>. Acesso em: 7 fev. 2018.

WANG, Lu; CHAI, Lulu; JI, Qingchun; CHENG, Rongjie; WANG, Jiao; HAN, Shiyu. Forkhead box protein C1 promotes cell proliferation and invasion in human cervical cancer. **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 4392–4398, 2018. DOI: 10.3892/MMR.2018.8423/HTML. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.8423/abstract>. Acesso em: 3 fev. 2022.

WANG, X.; MEYERS, C.; WANG, H. K.; CHOW, L. T.; ZHENG, Z. M. Construction of a Full Transcription Map of Human Papillomavirus Type 18 during Productive Viral Infection. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 85, n. 16, p. 8080–8092, 2011. DOI: 10.1128/JVI.00670-11. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21680515>. Acesso em: 15 ago. 2018.

WATT, F. M. Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. **Current Opinion in Cell Biology**, [S. l.], v. 1, n. 6, p. 1107–1115, 1989. DOI: 10.1016/S0955-0674(89)80058-4.

WELTER, J. F.; ECKERT, R. L. Differential expression of the fos and jun family members c-fos, fosB, Fra-1, Fra-2, c-jun, junB and junD during human epidermal keratinocyte differentiation. **Oncogene**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 2681–7, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8545126>. Acesso em: 26 abr. 2019.

WENDLAND, Eliana Marcia et al. Prevalence of HPV infection among sexually active adolescents and young adults in Brazil: The POP-Brazil Study. **Scientific Reports 2020 10:1**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-61582-2. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-61582-2>. Acesso em: 25 jan. 2022.

WENG, Hui; LIU, Hongbo; DENG, Yunhua; XIE, Yuyan; SHEN, Guanxin. Effects of high mobility group protein box 1 and toll like receptor 4 pathway on warts caused by human papillomavirus. **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 1765–1771, 2014. DOI: 10.3892/mmr.2014.2477. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25118798>. Acesso em: 7 nov. 2018.

WILCZYNSKI, S. P.; OFT, M.; COOK, N.; LIAO, S. Y.; IFTNER, T. Human papillomavirus type 6 in squamous cell carcinoma of the bladder and cervix. **Human pathology**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 96–102, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380278>. Acesso em: 30 nov. 2017.

WISE-DRAPER, Trisha M.; WELLS, Susanne I. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 1003–1017, 2008. DOI: 10.2741/2739. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17981607/>. Acesso em: 25 jan. 2022.

WOOLDRIDGE, Tonia R.; LAIMINS, Laimonis A. Regulation of human papillomavirus type 31 gene expression during the differentiation-dependent life cycle through histone modifications and transcription factor binding. **Virology**, [S. l.], v. 374, n. 2, p. 371–380, 2008. DOI: 10.1016/J.VIROL.2007.12.011.

WU, CJ et al. Expression of a TMC6-TMC8-CIB1 heterotrimeric complex in lymphocytes is regulated by each of the components. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 295, n. 47, p. 16086–16099, 2020. DOI: 10.1074/JBC.RA120.013045. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32917726/>. Acesso em: 3 nov. 2021.

XU, Yirong; CHEN, Zhenwen; ZHANG, Guangheng; XI, Yanfeng; SUN, Ruifang; CHAI, Fei; WANG, Xiaogang; GUO, Jianhong; TIAN, Lin. HMGB1 overexpression correlates with poor prognosis in early-stage squamous cervical cancer. **Tumor Biology**, [S. l.], v. 36, n. 11, p. 9039–9047, 2015. DOI: 10.1007/s13277-015-3624-7. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26084608>. Acesso em: 7 nov. 2018.

YAN, Jizhou; XU, Lisha; CRAWFORD, Gregory; WANG, Zenfeng; BURGESS, Shawn M. The Forkhead Transcription Factor FoxI1 Remains Bound to Condensed Mitotic Chromosomes and Stably Remodels Chromatin Structure. **MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 155–168, 2006. DOI: 10.1128/MCB.26.1.155-168.2006. Disponível em: <http://mcb.asm.org/>. Acesso em: 23 abr. 2019.

ZHANG, Lu; HU, Danni; WANG, Shasha; ZHANG, Ying; PANG, Lijuan; TAO, Lin; JIA, Wei. Association between dense PAX1 promoter methylation and HPV16 infection in cervical squamous epithelial neoplasms of Xin Jiang Uyghur and Han women. **Gene**, [S. l.], v. 723, 2020. DOI: 10.1016/J.GENE.2019.144142. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31589957/>. Acesso em: 3 fev. 2022.

ZHANG, Wenzhang; WU, Xin; HU, Liang; MA, Yuefan; XIU, Zihan; HUANG, Bingyu; FENG, Yun; TANG, Xudong. Overexpression of Human Papillomavirus Type 16 Oncoproteins Enhances Epithelial-Mesenchymal Transition via STAT3 Signaling Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, [S. l.], v. 25, n. 5, p. 843–852, 2017. DOI: 10.3727/096504016X14813880882288. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28508744>. Acesso em: 21 set. 2017.

ZHOU, Wenjing; TYRING, Stephen K.; BRYSK, Miriam; CHAN, Teh Sheng. Immortalization of differentiated human keratinocytes by human papillomavirus (HPV) 16 DNA. **Journal of Dermatological Science**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 140–152, 1996. DOI: 10.1016/S0923-1811(96)00520-8.

SÚMULA CURRICULAR

Aline Lopes Ribeiro
(Ribeiro, AL)

1. Formação

- 2010-2013 Bacharela em Ciências Biológicas - Modalidade Médica (Biomedicina).
Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). São Paulo, SP.
- 2014-2016 Mestre em Ciências (Biologia/Genética).
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biologia, Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP.
- 2017-2022 Doutorado em Oncologia (em andamento, previsão término 03/2022).
Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO), Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP.

2. Histórico profissional, serviços e distinções acadêmicas e prêmios

A lista abaixo destaca atividades científicas nacionais e internacionais, atividades didáticas e de liderança demonstrando diversas contribuições para o programa de pós-graduação durante o doutorado:

- I. Escrita de capítulo no livro “Oncologia – Da molécula à Clínica”, Chammas – Folgueira- Villa, 2022. Editora dos editores.
- II. Prêmio de melhor pôster na categoria Doutorado (2º lugar) no I Simpósio de Câncer de São Paulo. 2020.
- III. Representante discente do programa de pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/Instituto do Câncer do

Estado de São Paulo (ICESP), São Paulo - SP, Brasil, 2018-2020.

- IV. Participação na organização do IV Curso em Oncologia Molecular realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo - SP, Brasil. 2017 e 2019.
- V. Apresentação de pôster no “DNA Tumour Virus Meeting” promovido pelo International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology em Trieste, Itália. 2019.
- VI. Coordenação da organização da X Jornada da Pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), São Paulo - SP, Brasil, em 2019. Bem como, participação da comissão de organização do evento em 2017 e 2018.
- VII. Apresentação de pôster no “32nd International Papillomavirus Conference” promovido pela International Papillomavirus Society em Sydney, Austrália. 2018.
- VIII. Apresentação de pôster no “Second AACR International Conference on Translational Cancer Medicine” promovido pela American Association for Cancer Research em São Paulo-SP, Brasil. 2018.
- IX. Monitoria com bolsa pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino na disciplina “Mecanismos moleculares do processo neoplásico” do curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brasil. 2018.
- X. Grant recebido para participação no 3rd ICGEB Workshop on HPV and associated malignancies” realizado no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) em São Paulo - SP, Brasil. 2017.

3. Lista de pesquisas mais relevantes

- I. RIBEIRO, A.L., Caodaglio, A.S., Sichero, L. "Regulation of HPV transcription". *Clinics*. 2018; 73(Suppl 1): e486s. doi: 10.6061/clinics/2018/e486s.
Citações: 22; Fator de impacto: 2.365
- II. RIBEIRO, A. L.; KAID, C.; SILVA, P.; CORTEZ, B.; OKAMOTO, O.K. Inhibition of Lysyl oxidases impair migration and angiogenic properties of tumor-

associated pericytes. Stem Cells International, v. 2017, p. 1-10, 2017.

Citações: 15; Fator de impacto: 5.443

III. RIBEIRO, A.L. and Okamoto, O.K.. Combined Effects of Pericytes in the Tumor Microenvironment. Stem Cells International, v. 2015, p. 1-8, 2015.

Citações: 126; Fator de impacto: 5.443

IV. JAZEDJE, T.; RIBEIRO, A. L.; PELLATI, M.; DE SIQUEIRA BUENO, H. M.; NAGATA, G.; TRIERVEILER, M ; RODRIGUES, E. G; ZATZ, M. Human Mesenchymal Stromal Cells Transplantation May Enhance or Inhibit 4T1 Murine Breast Adenocarcinoma through Different Approaches. Stem Cells International, v. 2015, p. 1-11, 2015.

Citações: 13; Fator de impacto: 5.443

V. MAFRA da COSTA, A; RIBEIRO, A.L.; RIBEIRO, A.G.; GINI, A; CABASAG, C.; REIS, R.M.; FREGNANI, J.H.T.G.; SOERJOMATARAM, I. Impact of covid-19 pandemic on cancer-related hospitalizations in Brazil. Cancer Control. Dec 2021.

Citação: 1; Fator de impacto: 3.302

4. Lista de financiamentos à pesquisa

VIGENTES

Modalidade Doutorado

Financiamento: FAPESP Ref.: Processo 2016/16528-2

Vigência: 01/03/2017 a 03/02/2022

Título: “Análise da atividade transcricional de HPV-18 durante a diferenciação celular”.

Produção gerada:

RIBEIRO, A.L., Caodaglio, A.S., Sichero, L. "Regulation of HPV transcription".
Submetido ao periódico Clinics. Novembro, 2017.

CONCLUÍDAS

<p>Auxílio a Pesquisa no Exterior/ Doutorado</p> <p>Financiamento: Laboratório de Infecção e Biologia do Câncer, na Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), em Lyon, França</p> <p>Vigência: 01/03/2021 a 30/09/2021</p> <p>Responsável: Massimo Tommasino</p> <p>Título: Atividade transcricional de beta-HPVs</p>
<p>Estágio de Pesquisa no Exterior / BEPE – Doutorado</p> <p>Financiamento: FAPESP Ref.: Processo 2019/25486-0</p> <p>Vigência: 01/03/2020 a 28/02/2021</p> <p>Responsável: Laura Cristina Sichero Vettorazzo</p> <p>Título: O impacto de EVER1/2 sobre a atividade transcricional de beta-HPV</p>
<p>Modalidade Mestrado</p> <p>Financiamento: CAPES</p> <p>Vigência: 2014 a 2016</p> <p>Responsável: Oswaldo Keith Okamoto</p> <p>Título: “Lisil oxidase e propriedades pró-tumorigênicas de pericitos”</p> <p>Produção gerada:</p> <p>RIBEIRO, A. L.; KAID, C.; SILVA, P.; CORTEZ, B.; OKAMOTO, O.K. Inhibition of Lysyl oxidases impair migration and angiogenic properties of tumor-associated pericytes. <i>Stem Cells International</i>, v. 2017, p. 1-10, 2017.</p> <p>RIBEIRO, A.L. and Okamoto, O.K.. Combined Effects of Pericytes in the Tumor Microenvironment. <i>Stem Cells International</i>, v. 2015, p. 1-8, 2015.</p>
<p>Modalidade Iniciação Científica</p> <p>Financiamento: FAPESP N. 2013/00337-5</p> <p>Vigência: 01/2013 a 12/2013</p> <p>Título: “Avaliação do potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais murinas em camundongos com adenocarcinoma mamário”.</p> <p>Responsável: Tatiana Jazedje da Costa Silva</p> <p>Produção gerada:</p> <p>JAZEDJE, T.; RIBEIRO, A. L.; PELLATI, M.; DE SIQUEIRA BUENO, H. M.; NAGATA, G.; TRIERVEILER, M.; RODRIGUES, E. G. ; ZATZ, M.. Human Mesenchymal Stromal Cells Transplantation May Enhance or Inhibit 4T1 Murine</p>

<p>Breast Adenocarcinoma through Different Approaches. <i>Stem Cells International</i>, v. 2015, p. 1-11, 2015.</p>
<p>Modalidade Iniciação Tecnológica</p> <p>Financiamento: CNPq</p> <p>Vigência: 2011 a 2012</p> <p>Título: “Estudo dos efeitos do lítio sobre apoptose e autofagia em modelo farmacológico para a doença de <i>Huntington</i> (3-NP)”.</p> <p>Responsável: Soraya Soubhi Smaili</p>
<p>Modalidade Iniciação Científica</p> <p>Financiamento: CNPq</p> <p>Vigência: 2010 a 2011</p> <p>Título: Indução de morte celular pelo ácido 3-nitropropiónico utilizado como modelo farmacológico para o estudo da doença de Huntington</p> <p>Responsável: Soraya Soubhi Smaili</p>

5. Link para a página MyCitations (Google Scholar)

<https://scholar.google.com.br/citations?user=U4JwU0IAAAAJ&hl=pt-BR&authuser=1>

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

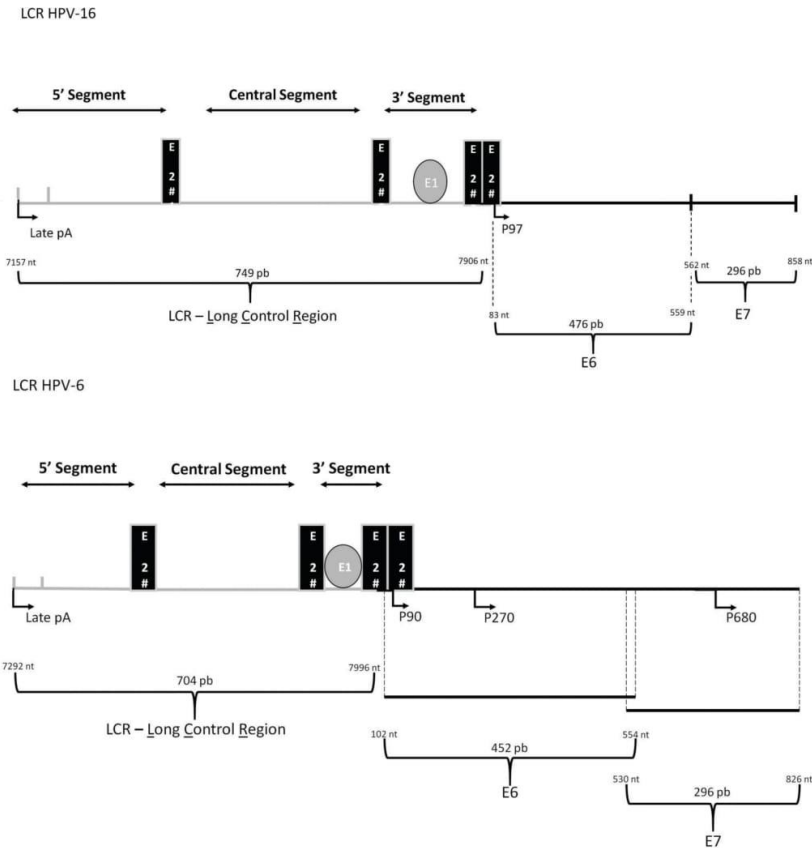


Figure 1 - Schematic representation of the LCR and E6 and E7 genes from high- and low-risk HPVs, represented by HPV-16 and HPV-6, respectively. Four E2 binding sites (E2bs) are conserved among mucosal HPVs, with E2bs#1 and E2bs#2 dividing the LCR in three distinct segments: the 5' segment, the central 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 CCCTC-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

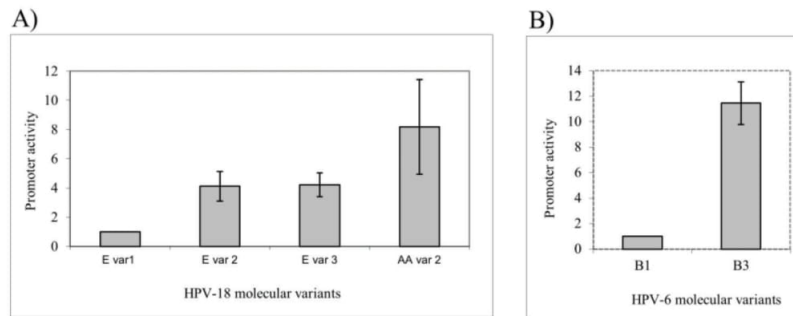


Figure 2 - Differential promoter activity among different HPV variants. (A) Variants from the HPV-18 Asian-Amerindian branch presented a higher early promoter activity than variants of the European branch. (B) For HPV-6, a variant of the B1 sublineage was ten times more transcriptionally active than 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 AI, 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/10.1086/657321>.
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, CMeyer 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, Twiggs 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, Delius 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, Iftner 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, Iftner 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, Kranjec 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. Sichero 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 API 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, Delius 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, Offord 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. *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. Iftner 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 TFIIID. *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, Lőrincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasia. *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. Iftner T, Haedicke-Jarboui 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 MG, 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, Madlung J, Macek B, et al. Interaction of NCOR/SMRT Repressor Complexes with Papillomavirus E8* E2C Proteins Inhibits Viral Replication. *PLoS Pathog*. 2016;12(4):e1005556, <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. Mitran-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.viro.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/ncr.2009.517>.
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, Kleebkaow 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/EBPβ 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. Songcock 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.viro.2017.04.021>.
80. Bodily JM, Hennigan 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.viro.2013.04.033>.
81. Karpathiou G, Da Cruz V, Casteillo F, Mobarki M, Dumollard JM, Chaleul 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/v907175>.
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.viro.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 Brn-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 Brn-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 Brn-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, Kocjan 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 Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2011;20(3):113-23.
103. Jelen MM, Chen Z, Kocjan 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, Kocjan 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>.