

ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOLOGIA MOLECULAR – BM09

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE VARIANTES DO  
ONCOGENE E7 DO PAPILOMAVIRUS HUMANO 16**

R. C. P. LIMA<sup>1</sup>, M. N. CORDEIRO<sup>1</sup>, R. C. O. SILVA<sup>1</sup>, D. L. SANTOS<sup>1</sup>, M. R. B. JÚNIOR<sup>1</sup>, A.P.F. CAMPOS<sup>1</sup>, A.J.D. DA SILVA<sup>1</sup>, A. P. A. D. GURGEL<sup>2</sup>, M. V. A. BATISTA<sup>3</sup>, B. S. CHAGAS<sup>1</sup>, A. C. FREITAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental

<sup>2</sup>Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Engenharia e Meio ambiente

<sup>3</sup>Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Biologia

E-mail para contato: ritajpbio@gmail.com; acf\_ufpe@yahoo.com.br

**RESUMO** – *O câncer cervical é causado pela infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) de alto risco. A oncogenicidade do HPV está fortemente associada a fatores genéticos do vírus, como os tipos virais e variantes. Polimorfismos em oncogenes virais têm sido associados a um maior risco de progressão maligna. Polimorfismos podem levar à alteração da função biológica com conseqüências clínicas. Além de prejudicar o controle do ciclo celular mediado por pRB, as atividades de E7 incluem perturbação da via NF-κB. Com base em três polimorfismos isolados de amostras clínicas positivas para o HPV-16 do Nordeste do Brasil, nosso estudo realizou uma das primeiras análises funcionais baseadas na atividade NF-κB dos polimorfismos de HPV-16. Adicionalmente, foi realizada a análise dos níveis de expressão de RNAm do gene E7 variante, obtido de culturas de células transfectadas. As variantes do gene E7, nas quais os três polimorfismos estão presentes, podem exercer forte efeito supressor nos pacientes infectados, podendo ter implicações na persistência da infecção e na progressão. No entanto, as alterações resultantes dos polimorfismos podem não estar necessariamente relacionadas com os níveis de expressão diferencial das variantes. Estes resultados adicionam dados importantes para os estudos sobre a variabilidade de E7, o que poderia contribuir para uma melhor compreensão da diversidade e infecção do HPV.*

**Palavras-chave:** HPV-16; Câncer cervical; Polimorfismos; NF-κB.

**ABSTRACT** – *Cervical cancer is caused by persistent high-risk human papillomavirus (HPV) infection. In addition to environmental factors, the oncogenicity of HPV is strongly associated with genetic factors of the virus itself such as viral types and variants involved in infection. In particular, polymorphisms in viral oncogenes have been associated with an increased risk of malignant progression. Polymorphisms may lead to altered biological function with clinical consequences. In addition to impairing pRB-mediated cell cycle control, E7 activities include perturbation of the NF-κB pathway affecting an important critical anti-viral cellular pathway. Based on three polymorphisms isolated from clinical samples positive for HPV-16 from Northeast Brazil, our study performed one of the first functional analyzes based on the NF-κB activity of HPV-16 E7 polymorphisms. Additionally, the analysis of mRNA expression levels of the variant E7 gene obtained from cultures of transfected cells was performed. HPV-16 E7 gene variants in which all three polymorphisms are present may exert a strong suppressive effect in*

*HPV infected patients, which may lead to implications for persistence of infection and progression. However, changes resulting from polymorphisms may not necessarily be related to the differential expression levels of the variants. These results add important data for the studies on the variability of E7, which could contribute to a better understanding of the diversity and infection of HPV.*

**Keywords:** HPV-16; Cervical cancer; Polymorphisms; NF- $\kappa$ B.

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção persistente por HPVs de alto risco é o principal fator predisponente para a formação de neoplasia cervical de alto grau (Bernard et al., 2010). A proteína E7 do HPV-16 interfere com a sinalização NF- $\kappa$ B, interagindo diretamente com as subunidades IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , causando a redução da atividade relacionada à sinalização NF- $\kappa$ B em células U2OS (Spitkovsky et al., 2002). Mesmo sob estímulo da citocina TNF- $\alpha$ , células U2OS transfectadas com o gene E7 de HPV-16 foram menos responsivas, exibindo uma sinalização NF- $\kappa$ B atenuada (Byg et al., 2012). Por fim, o mecanismo através do qual a função da proteína E7 de HPV de alto risco reduz uma das principais vias de sinalização pró-inflamatória ainda exige mais estudos. Além das variantes funcionais com oncogenicidade diferenciada e imunogenicidade, os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) podem estar envolvidos no potencial de integração específico da variante (Jackson et al., 2016).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

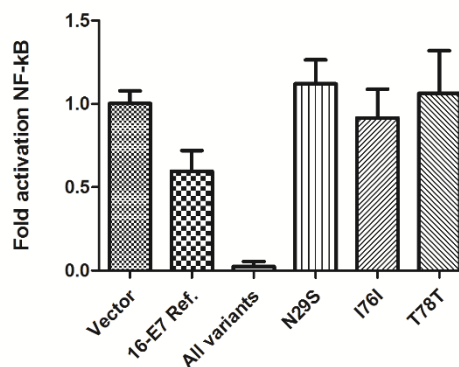
Com base em três polimorfismos de E7 do HPV-16, previamente isolados em achados clínicos (N29S, I76I e T78T), os genes E7 foram desenhados contendo todos os três polimorfismos, com apenas um de cada, ou sem qualquer deles. Esses genes E7 foram clonados no vetor pcDNA3.1, e os plasmídeos foram designados "All variants", "N29S", "I76I", "T78T" e "16 E7 Reference", o qual corresponde ao gene E7 sem os SNPs estudados. Células HEK-293 foram co-transfectadas com um gene-repórter de luciferase de vaga-lume dependente de NF- $\kappa$ B, conhecido como plasmídeo ( $\kappa$ B) 3-Luc, e um segundo plasmídeo que expressa constitutivamente a luciferase de *Renilla*, cuja atividade do produto fornece sinal constante, com comprimento de onda diferente daquele exibido pela atividade da luciferase de vaga-lume, para normalizar a luminescência de todos os grupos durante as medições. Sob estímulo de TNF- $\alpha$ , a atividade NF- $\kappa$ B promove a expressão da luciferase de vaga-lume, cuja atividade foi mensurada pelo luminômetro de microplacas GloMax® 96. A análise estatística foi realizada com ANOVA;  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Além disso, para acessar os níveis de expressão de mRNA de E7 a partir de culturas celulares, foi obtido, 24 horas após a transfecção, o RNA total, a partir do qual o cDNA foi sintetizado. A expressão do gene foi normalizada com GAPDH e ACT, como genes de referência, e as expressões foram calculadas por método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

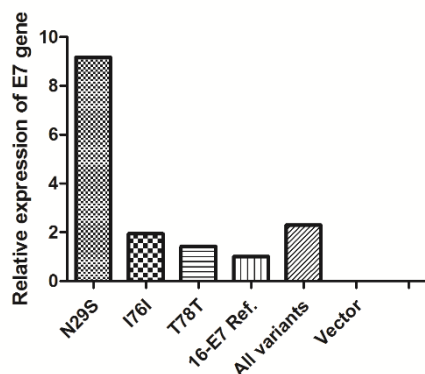
Nossos resultados mostraram que células expressando o gene sintético E7 de HPV-16, contendo todos os SNPs ("All variants"), reduziram drasticamente a atividade da via

NF- $\kappa$ B, sob estímulo TNF- $\alpha$ , em comparação com o grupo-controle para a atividade NF- $\kappa$ B (Figura 1). No entanto, nenhum dos genes E7 com apenas um SNP mostrou um distúrbio significativo da via NF- $\kappa$ B. A variante N29S obteve uma expressão de mRNA cerca de 9 vezes maior do que a do gene E7 de referência, sem SNPs ("16 E7 Reference"), enquanto nenhuma das outras variantes de E7 contendo apenas um SNP (I76I e T78T) exibiu nível de expressão de RNAm maior que 2 vezes o do gene E7 de referência (Figura 2). Embora mais de 20 SNPs tenham sido descritos para as variantes de E7 do HPV-16 (Boumba et al., 2015, Fujinaga et al., 1994, Vaeteewoottacharn et al., 2003), e alguns deles tenham sido associados ao CIN de alto grau (Wu et al., 2006), pouco pode ser entendido sobre o sua consequência funcional. É possível que um único polimorfismo possa afetar a função biológica de uma proteína inteira.

**Figura 1** – O efeito da expressão de E7 de HPV-16 sobre a atividade de NF- $\kappa$ B. As barras representam a média de cada condição realizada em duplicado. As barras de erro indicam um erro padrão médio.



**Figura 2** – Expressão de mRNA das variantes do ongene E7.



Estudos demonstraram que a proteína E7 do HPV-16 interfere com a sinalização NF- $\kappa$ B, causando redução na atividade relacionada à sinalização de NF- $\kappa$ B em células U2OS (Spitkovsky et al., 2002). Nossos dados corroboram com Byg et al. (2012), que observou que, mesmo sob uma estimulação TNF- $\alpha$ , as células que expressam o E7 eram menos responsivas, exibindo uma sinalização NF- $\kappa$ B atenuada. Em nosso trabalho, o forte efeito supressor sobre a via NF- $\kappa$ B observado apenas sob a expressão simultânea de três variantes E7 (N29S, I76I e T78T), pode sugerir uma atividade estritamente sinérgica. Finalmente, o mecanismo pelo qual os polimorfismos do gene E7 reduzem uma

importante via de sinalização pró-inflamatória ainda requer estudos adicionais.

#### 4. CONCLUSÃO

As variantes do gene E7 de HPV-16 nas quais os três polimorfismos estão presentes podem exercer um forte efeito supressor na via NF- $\kappa$ B em pacientes positivos para as mesmas, com implicações para a persistência da infecção e sua progressão.

#### 5. REFERÊNCIAS

- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Doorslaer KV, Hausen HZ, Villiers EM. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic **Amendments**. *Virology* 401:70–79. 2010.
- Boumba LMA, Assoumou SZ, Hilali L, Mambou JV, Moukassa D, Ennaji MM. Genetic variability in E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus Type 16 from Congolese cervical cancer isolates. **PLoS One** 9:e100746. 2014.
- Byg LM, Vidlund J, Vasiljevic N, Clausen D, Forslund O, Norrild B. NF- $\kappa$ B signalling is attenuated by the E7 protein from cutaneous human papillomaviruses. **Virus Res.** 169(1):48-53. 2012.
- Fujinaga Y, Okazawa K, Nishikawa A, Yamakawa Y, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. **Virus Genes.** 9:85-92. 1994.
- Jackson R, Rosa BA, Lameiras S, Cuninghame S, Bernard J, Floriano WB, Lamberts PF, Nicolas A, Zehbe I. Functional variants of human papillomavirus type 16 demonstrate host genome integration and transcriptional alterations corresponding to their unique cancer epidemiology. **BMC Genomics** 17:851. 2016.
- Spitkovsky D, Hehner SP, Hofmann TG, Moller A, Schmitz ML. The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF-kappa B activation by targeting the Ikappa B kinase complex. **Biol Chem.** 277: 25576–25582. 2002.
- Vaeteewoottacharn K, Jearanaikoon P, Ponglikitmongkol M. Co-mutation of HPV16 E6 and E7 genes in Thai squamous cervical carcinomas. **Anticancer Res.** 23(2C):1927-31. 2003.
- WU, Y; CHEN, Y; LI, L; YU, G; HE, Y. Analysis of mutations in the E6 / E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. **Journal of General Virology**, 87, 1181–1188. 2016.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).