

## Эпигенетическая регуляция экспрессии генов в вирус-ассоциированных опухолях человека

Н.П. Киселёва, Ф.Л. Киселёв

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

**Контакты:** Наталия Петровна Киселёва [natalia-kis@yandex.ru](mailto:natalia-kis@yandex.ru)

*Опухоли, ассоциированные с вирусами, составляют около 20 % всех опухолей человека. До недавнего времени при исследовании молекулярных механизмов вирусного канцерогенеза основные усилия были направлены на генетические нарушения, вызываемые онкогенными вирусами в клетке. Успехи, достигнутые в понимании механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов, стимулировали исследования взаимодействия вирусов и клетки-хозяина на эпигенетическом уровне. В обзоре рассмотрены общие закономерности взаимодействия онкогенных вирусов с эпигенетической системой регуляции функционирования генома и специфические для каждого вируса особенности этого взаимодействия в процессе установления латентной инфекции и опухолевой трансформации. Исследования регуляции экспрессии вирусного генома эпигенетической системой клетки и, с другой стороны, нарушений этой системы вирусами вносят вклад в понимание механизмов вирусного канцерогенеза, выявление новых маркеров прогрессии опухолей и мишеней для таргетной терапии.*

**Ключевые слова:** онкогенные вирусы, метилирование ДНК, модификации гистонов, микроРНК

### Epigenetic regulation of gene expression in virus-associated human tumors

N.P. Kisseljova, F.L. Kissel'ov

Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center", Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

*Viruses are associated with nearly 20 % of human cancers worldwide. Until recently genetic abnormalities generated by oncogenic viruses in cells were the main object of studies. Understanding of the importance of epigenetics in the regulation of gene expression prompted the investigation of virus and host interactions at the epigenetic level. We review aspects such as common features of oncogenic virus interactions with cell epigenetic system and virus-specific peculiarities of these interactions. Knowledge of the regulation of virus genomes by cell epigenetic system and disturbances of this system by viruses should provide us with markers for following cancer progression, as well as new tools for cancer therapy.*

**Key words:** oncogenic viruses, DNA methylation, histone modification, microRNA

В настоящее время можно считать установленным, что на долю опухолей, ассоциированных с вирусами, приходится около 20 % всех опухолей человека. К онкогенным вирусам относятся как ДНК-содержащие, так и РНК-содержащие вирусы (см. таблицу).

Онкогенные вирусы, принадлежащие к разным семействам, используют во многом сходную стратегию для инициации канцерогенеза. Среди этих общих свойств можно назвать нарушения работы клеточных сигнальных путей, контролирующих пролиферацию, дифференцировку, целостность генома, миграцию клеток, апоптоз, иммунный ответ. Механизмы реализации онкогенного потенциала вирусов, включающие взаимодействие вирусных белков с клеточными белками — компонентами сигнальных путей, а для ряда вирусов встраивание генома вируса в геном клетки (интеграция), описаны в многочисленных обзорах [1–4]. В последнее время накопилось много данных, свидетельствующих о том, что онкогенные вирусы вмешиваются в работу клеточных эпигенетических механизмов, регулирующих экспрессию генов. Регулируют экспрессию генов, эпигенетические механизмы

обеспечивают образование, поддержание и передачу по наследству при делении тканеспецифического фенотипа клеток, обладающих идентичным геномом. Регуляция экспрессии генов — это сложный многоуровневый процесс, в котором эпигенетические механизмы взаимно координированы в нормальных клетках, а нарушение их и их координации является характерной чертой опухолевых клеток. Наиболее изученными в настоящее время уровнями эпигенетической регуляции являются метилирование ДНК, пост-трансляционные ковалентные модификации гистонов — основных компонентов ДНК / белкового комплекса (хроматина) и регуляция экспрессии генов некодирующими РНК.

Общим свойством онкогенных вирусов является обязательное присутствие и экспрессия вирусного генома в опухолевой клетке. Очевидно, что репликация и экспрессия генома онкогенных вирусов, который у всех вирусов не несет полной информации, необходимой для этих процессов, не может происходить без взаимодействия с клеточной системой эпигенетической регуляции функционирования генома. Взаимодействие вирусов с клеточными эпигенетическими

Вирусы, ассоциированные с опухолями человека<sup>a</sup>

Вирус	Семейство	Тип генома	Тип неоплазии
EBV <sup>b</sup>	Herpesviridae	ДНК	Лимфома Беркитта, болезнь Ходжкина, неходжкинские лимфомы, рак носоглотки, рак желудка
KSHV <sup>b</sup>	Herpesviridae	ДНК	Саркома Капоши, первичная выпотная лимфома
HPV <sup>c</sup>	Papillomaviridae	ДНК	Карциномы шейки матки, ротоглотки, аногенитального тракта
HBV <sup>d</sup>	Hepadnaviridae	ДНК	Гепатоцеллюлярные карциномы
HVC <sup>e</sup>	Flaviviridae	РНК	Гепатоцеллюлярные карциномы
HTLV <sup>*k</sup>	Retroviridae	РНК	T-клеточный лейкоз взрослых

<sup>a</sup> Приведены вирусы, для которых в литературе имеются сведения об ассоциированных с ними нарушениях эпигенетической системы регуляции экспрессии генов; <sup>b</sup> EBV от англ. Epstein-Barr virus – вирус Эпштейна-Барр; <sup>c</sup> KSHV от англ. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus – вирус саркомы Капоши; <sup>d</sup> HPV от англ. human papillomaviruses – вирусы папиллом человека; <sup>e</sup> HBV от англ. hepatitis B virus – вирус гепатита B; <sup>k</sup> HCV от англ. hepatitis C virus – вирус гепатита C; \*HTLV-1 от англ. human T-cell leukemia virus – вирус T-клеточного лейкоза человека.

механизмами имеет два аспекта. С одной стороны, вирусные геномы, представленные как ДНК, так и РНК, или промежуточный продукт жизненного цикла РНК-содержащих ретровирусов в виде ДНК-провируса, являются объектами воздействия клеточных эпигенетических механизмов (метилирование ДНК, прямой контакт вирусной РНК с клеточными микроРНК, а ДНК с клеточными гистонами в составе хроматина). С другой стороны, вирусные белки вмешиваются в работу клеточных эпигенетических механизмов, изменяя эпигеном клетки для обеспечения размножения, персистенции своего генома и ухода от иммунологического контроля. В настоящее время взаимодействие онкогенных вирусов с разными уровнями клеточной эпигенетической регуляции экспрессии генома исследовано в разной степени.

Исследования механизмов, которые позволяют вирусам не только избежать полной инактивации генома, но и использовать клеточную эпигенетическую систему для дифференциальной регуляции экспрессии собственных генов, находятся в начальной стадии. Взаимодействие вирусов и клеточных эпигенетических регуляторов имеет и общие черты, и специфические для каждого вируса особенности.

### Метилирование ДНК

Метилирование ДНК – это ковалентное присоединение метильной группы к цитозину в составе цепи ДНК после ее репликации. Оно осуществляется ферментами, узнающими цитозин в последовательности 5'-CpG-3' и сопровождается инактивацией транскрипции, если метилированию подвергаются промоторы или регуляторные районы генов. В вирионах онкогенных вирусов геном, представленный двунитевой ДНК, не метилирован и лишен взаимодействия с клеточными гистонами. В клетке вирусные ДНК подвергаются метилированию и образуют мини-хромосомы, которые включают не только регуляторные вирусные белки, но и клеточные гистоны. Метилирование чужеродной ДНК считается древней системой защиты клетки

от внедрения экзогенной информации, широко распространенной в растительном и животном мирах. Однако ДНК онкогенных вирусов в клетках млекопитающих избегают полного метилирования своего генома. Паттерн метилирования зависит от типа вируса, типа инфекции (литическая, латентная) и формы персистенции генома (в виде эписомы или в виде ДНК, интегрированной в геном хозяина) [5, 6]. Эти факты говорят о существовании сложных и специфических для каждого вируса взаимоотношений с клеточной системой метилирования ДНК. С другой стороны, все вирусы, представленные в таблице, активируют клеточные ДНК-метилтрансферазы (ферменты, катализирующие присоединение метильной группы к ДНК). В опытах *in vitro* для всех вирусов было показано, что трансфекция полных геномов вирусов или их онкогенов в клетки сопровождается активацией ДНК-метилтрансфераз и приводит к гиперметилированию клеточных генов-супрессоров и подавлению их транскрипции. Гиперметилирование генов-супрессоров, сопровождающееся инактивацией их транскрипции, описано для многих вирус-ассоциированных первичных опухолей человека в многочисленных экспериментальных и обзорных публикациях [7–14]. Набор метилированных клеточных генов может включать как общие для разных типов вирусов и типов клеток гены, так и различные. Какие механизмы обеспечивают избирательное гиперметилирование и инактивацию клеточных генов при общем увеличении активности ДНК-метилтрансфераз под действием вирусов, неизвестно.

### Ковалентные модификации гистонов

ДНК онкогенных вирусов в клетке физически взаимодействует с гистонами или в составе хромосом (при интеграции в клеточную ДНК), или в мини-хромосомах, образуемых вирусными кольцевыми ДНК и, таким образом, подчиняется клеточной системе регуляции доступности ДНК для всех белков, участвующих в процессах транскрипции, репликации,

рекомбинации. Многочисленные комбинации ацетилирования, метилирования, убиквитинирования и других ковалентных модификаций N-концевых аминокислот гистонов («гистоновый код») динамично меняются в результате деятельности ферментов, осуществляющих присоединение или удаление этих групп, в ответ на различные сигналы. В настоящий момент наиболее четко охарактеризован «гистоновый код» для двух транскрипционных состояний хроматина в неделящихся клетках: эухроматина (активное состояние) и гетерохроматина (неактивное состояние). Влияние модификаций гистонов на функционирование вирусного генома и взаимодействие вирусных белков с ферментами модификации гистонов исследованы в меньшей степени, чем метилирование ДНК. Это взаимодействие также имеет общие черты и вирус-специфические особенности (см. ниже). Общей чертой онкогенов всех вирусов является взаимодействие с гистоновыми ацетилазами P300 и CBP, которые являются коактиваторами транскрипции. Это взаимодействие сопровождается модуляцией транскрипции как вирусных, так и ряда клеточных генов [14–18]. Механизм, обеспечивающий селективную модуляцию транскрипции, в этом случае также неизвестен, как и при селективном подавлении транскрипции метилированием ДНК. Исследования взаимодействия вирусов с другими регуляторами состояния хроматина пока носят фрагментарный характер и будут рассмотрены для каждого вируса отдельно.

### МикроРНК

МикроРНК являются негативными регуляторами экспрессии генов. Все онкогенные вирусы изменяют паттерн экспрессии клеточных микроРНК. Для некоторых из них обнаружена регуляция экспрессии вируса клеточными микроРНК, специфичная для каждого вируса (см. ниже). Для двух членов семейства герпес-вирусов (EBV и KSHV) и для некоторых онкогенных типов HPV обнаружено существование вирусных микроРНК [19, 20]. Структура и свойства тех вирусных микроРНК, которые уже исследованы, не оставляют сомнений в том, что вирусы используют клеточную систему процессинга микроРНК и механизмы подавления ими экспрессии генов, а именно комплементарное взаимодействие микроРНК с нетранслируемым участком мРНК-мишени с последующей деградацией или предотвращением ее трансляции. Мишенями вирусных микроРНК являются как собственные вирусные мРНК, так и мРНК клеточных генов-супрессоров, генов, вовлеченных в иммунный ответ организма, и генов-модуляторов апоптоза.

Специфические для каждого вируса особенности взаимодействия с клеточной эпигенетической системой представлены ниже.

### Вирус Эпштейна–Барр (EBV)

Во время первичного инфицирования и латентной инфекции, сопровождающейся продукцией вирусных

частиц, экспрессируются все гены EBV, промоторы которых не метилированы [21]. После перенесенной инфекции в В-лимфоцитах периферической крови устанавливается латентная инфекция, и человек пожизненно становится носителем вируса. В зависимости от типа латентной инфекции, каждый из которых ассоциирован с развитием определенного вида лимфом или карцином, экспрессируется минимальный и разный набор вирусных генов, что коррелирует с деметилированным состоянием промоторов только этих генов. В настоящее время неизвестно, как устанавливается тот или иной тип метилирования вирусных промоторов при разных типах латентности. Интегрированность вируса в эпигенетическую систему клетки и использование ее для регуляции собственных генов демонстрирует тот факт, что при латентной инфекции вирусный транскрипционный фактор BZLF1 узнает свой сайт в промоторах других вирусных генов только в метилированном состоянии, реактивирует транскрипцию соответствующих генов и реиницирует литическую инфекцию [22]. Показано, что репрессивные (метилирование гистонов H3 и H4 по определенным аминокислотным остаткам) и активирующие метки гистонов (ацетилирование H3 и H4) по-разному распределены в промоторах вирусных генов при разных типах латентности и вовлечены в поддержание латентной инфекции [5, 6]. В поддержании латентной инфекции и трансформации существенную роль играют микроРНК, гены которых представлены в геноме EBV в виде двух кластеров *miRBART* и *miRBHRF* [19]. Паттерн экспрессии вирусных микроРНК варьирует в зависимости от типа клеток мишеней (эпителиальные клетки или В-лимфоциты) и типа латентной инфекции. Недавно было обнаружено, что при экспрессии кластера *miRBART* в первичных В-лимфоцитах наблюдается увеличение их пролиферации, выживаемости и блокирование апоптоза [23]. Очевидно, что мишенями этих микроРНК должны быть мРНК клеточных генов — участников этих процессов. Эти данные указывают на участие микроРНК кластера *miRBART* в поддержании тех лимфом, в которых не удается обнаружить экспрессию онкогенов EBV. Эти микроРНК могут быть хорошими мишенями для разработки таргетной терапии EBV-ассоциированных лимфом.

Доказательства изменений метилирования клеточных генов вирусом были получены в опытах на клеточных культурах. Было показано, что инфекция EBV в относительно короткий срок индуцирует метилирование ДНК *de novo* и подавление экспрессии многих генов супрессоров в клетках эпителиального происхождения. Среди этих генов были обнаружены регуляторы клеточного цикла и транскрипции, гены, вовлеченные в иммунный ответ [15, 24]. Метилирование и инактивация генов-супрессоров, изменение паттерна экспрессии клеточных микроРНК описаны также в EBV-позитивных неоплазиях [12, 25–27].

Таким образом, EBV активно вмешивается в эпигенетическую регуляцию экспрессии генов на всех уровнях: активация ДНК-метилтрансфераз и метилирование клеточной ДНК, использование метилирования ДНК для регуляции собственных генов, взаимодействие с гистоновыми ацетилтрансферазами, подавление экспрессии клеточных генов с помощью вирусных микроРНК, изменение паттерна экспрессии клеточных микроРНК.

### **Вирус саркомы Капоши (KSHV/HHV-8)**

Для вируса саркомы Капоши, как и другого онкогенного члена семейства герпес-вирусов (EBV), характерно существование двух форм инфекции – литической и латентной. Структура генома вируса саркомы Капоши и экспрессия генов зависит от формы инфекции. При литической инфекции двухцепочечная ДНК существует в линейной форме, не метилирована, и все гены вируса экспрессируются [28]. При латентной форме инфекции геном вируса образует циркулярную эписому за счет замыкания GC-богатых концевых повторов. При этом наблюдается экспрессия небольшого числа вирусных генов, в том числе генов *vFLIP* и *LANA*, экспрессия которых регулируется эпигенетически [29]. Продукты этих генов непосредственно взаимодействуют с гистонами, ферментами, модифицирующими гистоны, и ДНК-метилтрансферазами, инактивируют клеточные гены-супрессоры и блокируют индукцию апоптоза [14, 18, 30, 31]. Механизмы, определяющие переходы между двумя формами инфекции, полностью не установлены. Известно только, что после длительной латентной инфекции литическая форма репликации генома может быть вызвана изменившимися физиологическими условиями (гипоксия и гипотермия) или воздействием химических агентов, индуцирующих изменения метилирования ДНК и структуры хроматина, такими как 5-азациитидин, бутират натрия и ТРА (от англ. tetradecanoylphorbol acetate). Эти факты указывают на несомненное участие эпигенетических механизмов в регуляции форм латентности [28, 29].

KSHV является пока единственным вирусом, для мини-хромосомы которого проведен полногеномный анализ модификаций гистонов и паттерна метилирования ДНК на разных этапах инфекции. Было обнаружено, что характерный для латентной инфекции паттерн модификаций гистонов устанавливается уже на первых этапах инфекции, тогда как метилирование ДНК нарастает постепенно и медленно [29]. Эти исследования говорят о том, что по крайней мере для этого вируса ключевую роль в установлении латентной инфекции играют модификации гистонов, метилирование ДНК, по-видимому, необходимо для поддержания латентной инфекции. Как уже упоминалось выше, в KSHV способен эпигенетически подавлять экспрессию клеточных генов и экспрессирует собственные микроРНК, которые негативно регулируют экспрес-

сию таких клеточных генов, как *каспаза 3* (регулятор апоптоза), *p21* (ингибитор циклинзависимых киназ), *RBL2* (репрессор ДНК-метилтрансфераз) и другие [14, 19]. Пока только для этого вируса обнаружена интересная стратегия взаимодействия с клеточной системой микроРНК. KSHV кодирует микроРНК (miR-K-12-11), которая способна инактивировать те же мРНК-мишени, что и клеточная микроРНК oncomiR-155 [32]. Повышенная экспрессия miR-155 обнаружена во многих опухолях.

Итак, KSHV использует все уровни эпигенетической регуляции не только для функционирования собственного генома, но и для изменений экспрессии клеточных генов.

### **Вирусы папиллом человека (HPV)**

В случае бессимптомного носительства вируса (отсутствует экспрессия каких-либо вирусных генов) регуляторный район LCR (от англ. long control region) эписомы онкогенных типов HPV16 и HPV18 сильно метилирован в клетках эпителия шейки матки [33]. При литической инфекции жизненный цикл HPV тесно связан с дифференцировкой эпителия, в разных слоях которого экспрессируется разный набор вирусных генов. LCR метилирован в небольшой степени, и статус метилирования разных участков LCR (промотор, энхансер) изменяется по-разному в процессе дифференцировки [34]. Механизм координации паттерна метилирования LCR с клеточной дифференцировкой неизвестен, однако благодаря этому процессу в клетках эпителия происходит поочередная экспрессия вирусных генов, что, по-видимому, облегчает уход инфицированной клетки от иммунологического контроля. При злокачественной трансформации нарушается жизненный цикл вируса, прекращается продукция вирусных частиц и утрачивается связь метилирования вирусной ДНК с дифференцировкой эпителия. Пусковым механизмом трансформации кератиноцитов считается повышение экспрессии онкогенов E6 и E7 по сравнению с их экспрессией в жизненном цикле вируса. В предраковых поражениях и карциномах с эписомальной формой генома HPV наблюдается метилирование LCR, в том числе в сайтах связывания вирусного негативного регулятора транскрипции E2, что сопровождается транскрипционной активацией LCR и усилением транскрипции онкогенов E6 и E7 [35]. Каким образом устанавливается и поддерживается паттерн метилирования LCR в эписоме при трансформации, неизвестно. В случае интеграции вирусной ДНК в геном клетки метилирование LCR приобретает зависимость от транскрипционного состояния сайта интеграции (транскрипционно активный или неактивный хроматин) [34, 36]. Таким образом, метилирование генома HPV может запускать дерегуляцию экспрессии онкогенов E6 и E7 на начальном этапе канцерогенеза (эписомальная форма вирусного генома) и контролировать избыточную экспрессию вирус-

ных генов при интеграции множественных копий HPV в геном клетки. Как и другие онкогенные вирусы, HPV стимулируют активность ДНК-метилтрансфераз DNMT1, DNMT3a и DNMT3b при трансфекции полного генома онкогенных типов HPV в кератиноциты. Показано, что онкобелок E7 HPV16 прямо взаимодействует с DNMT1 и активирует ее [37, 38]. При этом активация DNMT сопровождается метилированием и инактивацией генов-супрессоров как в культуре клеток, так и в HPV-позитивных предраковых поражениях и карциномах шейки матки [8, 9, 38].

Онкогены HPV взаимодействуют с ферментами модификаций гистонов, и трансформация кератиноцитов человека под действием E6/E7 сопровождается снижением общего уровня репрессивной модификации H3K27me3 и ее перераспределением в геноме клетки [39].

Недавно было обнаружено, что некоторые онкогенные типы HPV кодируют собственные микроРНК [20]. Экспериментальных доказательств взаимодействия этих микроРНК с какими-либо клеточными или вирусными мРНК пока не получено, однако среди предполагаемых мишеней находятся мРНК генов, регулирующих клеточный цикл, активацию Т-клеток, адгезию и миграцию клеток. Изменения экспрессии клеточных микроРНК обнаружены как на ранних этапах инфекции HPV, так и во многих HPV-ассоциированных опухолях (карциномы шейки матки, опухоли ротоглотки). Недавно было обнаружено, что трансфекция эписомальной формы HPV31 в кератиноциты человека подавляет экспрессию miR-145 и miR-203 [40]. Обе микроРНК экспрессируются в процессе дифференцировки кератиноцитов. По-видимому, miR-145 выполняет функцию защиты клетки от инфекции, ее мишенью является 3'-нетранслируемый участок РНК гена *E1*, регулятора репликации вирусной ДНК, и ее повышенная экспрессия подавляет амплификацию вирусной ДНК. miR-203 подавляет пролиферативную активность дифференцирующихся клеток. Это первое исследование, обнаружившее механизмы, с помощью которых HPV модулирует клеточную дифференцировку для обеспечения репликации генома в дифференцирующихся клетках.

### Вирус гепатита В (HBV)

В вирусной частице геном HBV представлен частично двухцепочечной ДНК, состоящей из длинной и укороченной цепей ДНК. В клетке через процесс обратной транскрипции образуется ковалентно-замкнутая кольцевая двухцепочечная ДНК, содержащая всю информацию длинной цепи вириона. Этот промежуточный продукт образует вирусную мини-хромосому, он необходим для репликации ДНК и содержит четыре старта транскрипции вирусных генов. При хроническом гепатите они практически не метилированы. Увеличение метилирования до некоторой степени наблюдается при циррозе печени, что коррелирует со

снижением продукции вирионов. Еще большая степень метилирования наблюдается в HBV-ассоциированных карциномах печени и клеточных линиях карцином [6, 41]. При этом промотор экспрессируемого в карциномах вирусного гена X (кодирует трансактиватор HBx) остается неметилированным. О механизме поддержания дифференцированного метилирования вирусной ДНК известно только, что статус, перmissive для активной транскрипции HBx, обеспечивается при участии корового белка вируса HBc. HBc является компонентом вирусной мини-хромосомы. Его связывание с промотором HBx ассоциировано с гипометилированием ДНК, связыванием гистоновой ацетилтрансферазы CBP и истощением гистоновой деацетилазы HDAC1 в этом районе [42]. В свою очередь HBx, по-видимому, участвует в поддержании активирующих модификаций гистона H3 в составе мини-хромосомы HBV.

Как и другие онкогенные вирусы, HBV модифицирует клеточный эпигеном. При трансфекции в клетки в составе экспрессирующихся векторов HBx модулирует активность трех клеточных ДНК-метилтрансфераз DNMT1, DNMT3a и DNMT3b [43–45]. Трансфекция HBx в клетки вызывает подавление экспрессии микроРНК miR-101, которая является негативным регулятором DNMT3a [43]. В культуре клеток HBx вызывает изменение экспрессии микроРНК, обладающих функциями как опухолевых супрессоров, так и онкогенов, что наблюдается также и в HBV-позитивных гепатомах [43, 47]. Также показано, что HBx взаимодействует с гистоновой деацетилазой HDAC, инициирует гиперметилирование промоторов и инактивацию транскрипции генов иммунного ответа и генов, вовлеченных в апоптоз [43, 46]. Гиперметилирование и подавление транскрипции этих генов наблюдаются также *in vivo* в HBV-позитивных гепатомах [47].

Недавно было обнаружено, что гепатоцит-специфичная miR-122 негативно регулирует экспрессию и репликацию HBV. miR-122 экспрессируется в нормальных клетках печени и играет важную роль в их метаболизме и обеспечении нормальных функций. Было установлено, что в гепатоцитах, инфицированных HBV *in vitro*, негативная регуляция осуществляется за счет прямого связывания miR-122 с консервативным районом мРНК HBV, кодирующей вирусные полимеразу и коровый белок. В HBV-позитивных гепатомах уровни экспрессии miR-122 и вирусного генома связаны обратной корреляцией [50].

Таким образом, эти исследования демонстрируют взаимодействие HBV со всеми уровнями эпигенетической регуляции клетки для обеспечения успешной инфекции и злокачественной трансформации.

### Вирус гепатита С (HCV)

В жизненном цикле HCV, РНК-содержащего вируса гепатита С, не происходит образования промежуточной формы вирусного генома в виде кДНК, следовательно, невозможны интеграция генома вируса

в геном клетки и его контроль такими механизмами, как метилирование ДНК и модификации гистонов. В то же время подобно HBV и другим онкогенным вирусам, HCV активирует клеточные ДНК-метилтрансферазы DNMT1 и DNMT3b, которые, как было показано, необходимы для его репликации. Эктопическая экспрессия корового белка HCV в гепатоцитах сопровождается не только повышением экспрессии DNMT1 и DNMT3b, но и гиперметилированием промоторов таких генов-супрессоров, как *E-кадхерин* и *p16<sup>INK4a</sup>* [51]. Как и все онкогенные вирусы, HCV взаимодействует с клеточными микроРНК, и это взаимодействие также имеет вирус-специфические особенности. Клеточные микроРНК можно разделить на 2 группы: микроРНК, экспрессия которых изменена в HCV-инфицированных клетках, и микроРНК, которые модулируют экспрессию вируса и могут быть перспективными мишенями для антивирусной терапии [52]. Среди последних в наибольшей степени изучена гепатоцит-специфичная miR-122, которая позитивно регулирует экспрессию и репликацию HCV, прямо взаимодействуя с геномной РНК и стабилизируя ее, в отличие от ее способности негативно регулировать HBV [53]. Антагонист этой микроРНК (Miravirsen (SPC3649), Santaris Pharma A/S) показал обнадеживающие результаты при испытаниях на HCV-инфицированных обезьянах, и в настоящее время проходит стадию 2а клинических испытаний для лечения пациентов, хронически инфицированных HCV, но не HBV [54].

Таким образом, взаимодействие РНК-содержащего вируса гепатита С с эпигенетической системой клетки, хотя и отличается в деталях от ДНК-содержащих вирусов в силу различий их геномов, включает те же составляющие: изменение эпигенома клетки (паттерн микроРНК, статус метилирования ДНК) и регуляцию вирусного генома клеточными эпигенетическими механизмами.

### Вирус Т-клеточного лейкоза (HTLV-1)

Геном РНК-содержащего вируса HTLV-I, как у всех ретровирусов, в инфицированных клетках существует в виде провируса — интегрированной в геном клетки двухцепочечной ДНК-копии, которая контактирует с нуклеосомами, так же как клеточная ДНК. Было установлено, что метилирование провируса появляется на стадии носительства вируса и увеличивается у больных Т-клеточным лейкозом взрослых [55]. При этом как у носителей, так и у больных всегда отсутствует метилирование одного из двух регуляторных районов LTR, расположенных по концам провируса, а именно 3'-LTR, который регулирует транскрипцию гена *HBZ*, транскрибируемого с минус-цепи провируса. Продукт гена *HBZ* является негативным регулятором Tax-опосредованной транскрипции вирусных генов, транскрибируемых с 5'-LTR, в том числе и самого Tax [56]. Экспрессия вирусного онкогена Tax считается необходимой и для персистенции инфекции, и для инициации

трансформации [56]. В то же время 5'-LTR метилирован приблизительно в 50 % случаев, при этом степень метилирования варьирует как при хронической инфекции, так и при лейкозе. Онкобелок Tax является главной мишенью цитотоксических лимфоцитов. По-видимому, под влиянием селективного давления со стороны иммунной системы экспрессия Tax ограничена во многих лейкозах. Ограничение экспрессии может осуществляться с помощью разных механизмов: за счет метилирования 5'-LTR, часто наблюдаемых делеций 5'-LTR, регуляции со стороны HBZ и, возможно, других негативных регуляторов [57]. В то же время белок Tax образует комплексы с гистоновыми ацетилазами и деацетилазами, ДНК-метилтрансферазами, с метилцитозин-связывающим белком MBD2 и может активировать транскрипцию с метилированного 5'-LTR [58–60]. Эти исследования говорят о сложном взаимодействии HTLV-I с системой метилирования ДНК клетки. При интеграции в неактивный хроматин метилирование провируса сопровождается гипоацетилизацией гистонов, ассоциированных с ним (отсутствие ацетилирования гистонов характерно для гетерохроматина). Однако частота интеграции провируса в транскрипционно активный хроматин у больных лейкозом значительно выше, чем у носителей вируса [61]. По-видимому, сайт интеграции провируса (транскрипционно активный или неактивный хроматин) может предопределять риск развития лейкоза.

В ряде исследований было обнаружено изменение паттерна экспрессии микроРНК в HTLV-I-позитивных клетках [62]. Относительно механизма взаимодействия HTLV-I с клеточной системой микроРНК известно, что онкобелок Tax способен связываться с РНК-азой Discer, необходимой для биогенеза микроРНК, и уменьшать ее активность [63].

Таким образом, так же как и ДНК-содержащие вирусы, ретровирус HTLV-I взаимодействует со всеми уровнями эпигенетической регуляции экспрессии генов. Учитывая участие клеточной эпигенетической системы в ограничении экспрессии вирусных генов, предпринимаются попытки активировать транскрипцию вирусного генома, применяя ингибиторы ферментов модификации хроматина, и тем самым активировать иммунологический контроль и способствовать удалению HTLV-инфицированных клеток из организма. В экспериментах, проведенных на мышинной модели и в культуре HTLV-инфицированных лимфоцитов, было показано снижение «нагрузки» провируса HTLV под действием ингибиторов гистоновых деацетилаз, однако начавшиеся клинические испытания одного из ингибиторов гистоновых деацетилаз (valproate) пока не получили развития [64–66].

### Заключение

Исследования эпигенетики онкогенных вирусов открывают удивительно тонкую и сложную интеграцию вирусов в эпигенетическую систему клетки. По-види-

тому, как ДНК-содержащие, так и РНК-содержащие онкогенные вирусы успешно используют ограничение транскрипции вирусных генов, накладываемые метилированием ДНК, репрессивными модификациями гистонов и клеточными микроРНК, для ухода от иммунологического контроля, что способствует установлению персистенции вирусного генома в клетке хозяина. Многие из них инфицируют клетки-предшественники и используют для репликации и экспрессии своего генома программу дифференцировки этих клеток, ключевую роль в которой играют эпигенетические события. Нарушения этой сложной системы взаимодействий, возникающие в процессе длительной персистенции вирусов в организме хозяина, могут приводить

к злокачественной трансформации. Разные формы неоплазий, ассоциированные с онкогенными герпес-вирусами, также определяются, по-видимому, специфическим для каждой из неоплазий характером эпигенетических нарушений. Исследования механизмов взаимодействия каждого онкогенного вируса с клеточной эпигенетической системой открывают возможности выявления специфических мишеней для предотвращения и терапии вирус-ассоциированных неоплазий. Первым успехом в этом направлении являются клинические испытания возможностей применения антагониста микроРНК miR-122 (Miravirsen (SPC3649), Santaris Pharma A/S) для лечения пациентов, инфицированных вирусом гепатита С.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Альштейн А.Д. Вирусный канцерогенез и роль вирусов в возникновении опухолей человека. В сб.: Канцерогенез. М.: Медицина, 2004. С. 251–274.
2. Киселев Ф.Л. Онкогенный потенциал вирусов и механизмы его проявления. В сб.: Канцерогенез. М.: Медицина, 2004. С. 274–287.
3. zur Hausen H. Infections causing human cancers. Wiley-VCH, Weinheim-New York, Publ, 2d edition, 2011.
4. McLaughlin-Drubin M.E. and Munger K. Viruses associated with human cancer. *Biochem Biophys Acta* 2008;1782:127–50.
5. Fernandez A.F., Rosales C., Lopez-Nieva P. et al. The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Res* 2009;19:438–51.
6. Fernandez A. and Esteller M. Viral epigenomes in human tumorigenesis. *Oncogene* 2010;29:1405–20.
7. Lambert M.P., Paliwal A., Vaissiere T. et al. Aberrant DNA methylation distinguishes hepatocellular carcinoma associated with HBV and HCV infection and alcohol intake. *J Hepatol* 2011;54:705–15.
8. Henken F.E., Wilting S.M., Overmeer R.M. et al. Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. *Br J Cancer* 2007;97:1457–64.
9. Senchenko V.N., Kisseljova N.P., Dmitriev A.A. et al. Novel tumor suppressor candidates on chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in cervical cancer. *Epigenetics* 2013;8:409–20.
10. Wilson G.A., Lechner M., Köferle A. et al. Integrated virus-host methylome analysis in head and neck squamous cell carcinoma. *Epigenetics* 2013;8:953–61.
11. Yamagishi M. and Watanabe T. Molecular hallmarks of adult T cell leukemia. *Front Microbiol* 2012;3:1–16.
12. Okada T., Nakamura M., Nishikawa J. et al. Identification of genes specifically methylated in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Cancer Sci* 2013;104:1309–14.
13. Niller H.H., Wolf H. and Minarovits J. Epigenetic dysregulation of the host cell genome in Epstein-Barr virus-associated neoplasia. *Semin Cancer Biol* 2009;19:158–64.
14. Paschos K. and Allday M. Epigenetic reprogramming of host genes in viral and microbial pathogenesis. *Trends Microbiol* 2010;18:439–47.
15. Ryan J.L., Jones R.J., Kenney S.C. et al. Epstein-Barr virus-specific methylation of human genes in gastric cancer cells. *Infect Agent Cancer* 2010;5:27–32.
16. Herceg Z. and Paliwal A. Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: How environmental factors influence the epigenome. *Mut Res* 2011;727:55–61.
17. Flanagan J. Host epigenetic modifications by oncogenic viruses. *Br J Cancer* 2007;96:183–8.
18. Ferrari R., Berk A.J. and Kurdastani S.K. Viral manipulation of the host epigenome for oncogenic transformation. *Nat Rev Genet* 2009;10:290–4.
19. Ramalingam D., Kieffer-Kwon P. and Ziegelbauer J.M. Emerging Themes from EBV and KSHV microRNA. *Targets Viruses* 2012;4:1687–710.
20. Qian K., Pietilä T., Rönty M. et al. Identification and Validation of Human Papillomavirus Encoded microRNAs. *PLoS One* 2013;8:e70202.
21. Woellmer A. and Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus and host cell methylation: regulation of latency, replication and virus reactivation. *Curr Opin Virol* 2013;3:260–5.
22. Bhende P.M., Seaman W.T., Delecluse H.J. et al. The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nat Genet* 2004;36:1099–104.
23. Vereide D.T., Seto E., Chiu Y-F. et al. Epstein-Barr virus maintains lymphomas via its miRNAs. *Oncogene* 2014;33:1258–64.
24. Caliskan M., Cusanovich D.A., Ober C. et al. The effects of EBV transformation on gene expression levels and methylation profile. *Human Mol Genet* 2011;20:1643–52.
25. Tsai C.N., Tsai C.L., Tse K.P. et al. The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNAmethyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10084–90.
26. Shinozaki A., Sakatani T., Ushiku T. et al. Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma. *Cancer Res* 2010;70:4719–27.
27. Motsch N., Pfuhl T., Mrazek J. et al. Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146. *RNA Biol* 2007;4:131–7.
28. Pantrya S.N. and Medveczky P.G. Epigenetic regulation of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus replication. *Semin Cancer Biol* 2009;19:153–7.
29. Lim C., Lee D., Seo T. et al. Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus functionally interacts with heterochromatin protein 1. *J Biol Chem* 2003;278:7397–405.
30. Guenther T. and Grundhoff A. The Epigenetic Landscape of Latent Kaposi. Sarcoma-Associated Herpesvirus Genomes. *PLoS Pathog* 2010;6:e100093524.
31. Di Bartolo D.L., Cannon V., Liu Y.F. et al. KSHV LANA inhibits TGF-beta signaling through epigenetic silencing of the TGF-beta type II receptor. *Blood* 2008;111:4731–40.
32. Gottwein E., Mukherjee N., Sachse C. et al. A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* 2007;450:1096–9.
33. Kalantari M., Calleja-Macias E., Tewari D., et al. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in

- asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol* 2004;7:12762–12772.
34. Kalantari M., Lee D., Calleja-Macias I.E. et al. Effects of cellular differentiation, chromosomal integration and 5-aza-2-deoxycytidine treatment on human papillomavirus-16 DNA methylation in cultured cell line. *Virology* 2008;374:292–303.
35. Vinokurova S., von Knebel-Doerberitz M. Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PLoS One* 2011;6:e24451.
36. Johannsen E. and Lambert P. Epigenetics of human papillomaviruses. *Virology* 2013;445:205–12.
37. Burgers W.A., Blanchon L., Pradhan S. et al. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene* 2007;26:1650–5.
38. Leonard S.M., Wei W., Collins S.I. et al. Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis* 2012;33:1286–93.
39. Longworth M.S., Wilson R. and Laimins L.A. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *Embo J* 2005;24:1821–30.
40. Melar-New M. and Laimins L. Human papillomaviruses modulate expression of microRNA 203 upon epithelial differentiation to control levels of p63 proteins. *J Virol* 2010;84:5212–21.
41. Kaur P., Paliwal A., Durantel D. et al. DNA Methylation of Hepatitis B Virus (HBV) Genome Associated with the Development of Hepatocellular Carcinoma and Occult HBV Infection. *J Infect Dis* 2010;202:700–4.
42. Guo Y.H., Li Y.N., Zhao J.R. et al. Hbc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics* 2011;6:720–6.
43. Tian Y., Yang W., Song J. et al. Hepatitis B Virus X Protein-Induced Aberrant Epigenetic Modifications Contributing to Human Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis. *Mol Cell Biol* 2013;33:2810–6.
44. Zheng D.L., Zhang L., Cheng N. et al. Epigenetic modification induced by hepatitis B virus X protein via interaction with de novo DNAmethyltransferase DNMT3A. *J Hepatol* 2009;50:377–87.
45. Zhu Y.Z., Zhu R., Fan J. et al. Hepatitis B virus X protein induces hypermethylation of p16(INK4A) promoter via DNA methyltransferases in the early stage of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *Viral Hepat* 2010;17:98–107.
46. Wei X., Xiang T., Ren G. et al. miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus X protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A. *Cell Signal* 2013;25:439–46.
47. Gao P., Wong C.C., Tung E.K. et al. Deregulation of microRNA expression occurs early and accumulates in early stages of HBV-associated multistep hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2011;54:1177–84.
48. Shon J.K., Shon B.H., Park I.Y. et al. Hepatitis B virus-X protein recruits histone deacetylase 1 to repress insulin-like growth factor binding protein 3 transcription. *Virus Res* 2009;139:14–21.
49. Su P.F., Lee T.C., Lin P.J. et al. Differential DNA methylation associated with hepatitis B virus infection in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2007;12:1257–64.
50. Chen Y., Shen A., Rider P.J. et al. A liver-specific microRNA binds to a highly conserved RNA sequence of hepatitis B virus and negatively regulates viral gene expression and replication. *FASEB J* 2011;25:4511–21.
51. Arzumanyan A., Reis H.M. and Feitelson M.A. Pathogenic mechanisms in HBV and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nature Rev Cancer* 2013;13:123–35.
52. Hoffmann T.W., Gilles D. and Abderrahmane B. MicroRNAs and hepatitis C virus: Toward the end of miR-122 supremacy. *BMC Virol* 2012;9:109.
53. Thibault P.A. and Wilson J.A. Targeting miRNAs to treat Hepatitis C Virus infections and liver pathology: Inhibiting the virus and altering the host. *Pharmacol Res* 2013;75:48–59.
54. Lanford R.E., Hildebrandt E.S., Petri A. et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010;327:198–201.
55. Taniguchi Y., Nosaka K., Yasunaga J. et al. Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. *BMC Retrovirology* 2005;2:64.
56. Matsuoka M. and Yasunaga J.I. Human T-cell leukemia virus type I: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. *Curr Opin Virol* 2010;3:1–8.
57. Takeda S., Maeda M., Morikawa S. et al. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* 2004;109:559–67.
58. Curren R., Van Duyne R., Jaworski E. et al. HTLV Tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Frontier Microbiol* 2013;3:1–8.
59. Kamoi K., Yamamoto K., Misawa A. et al. SUV39H1 interacts with HTLV-1 tax and abrogates tax transactivation of HTLV-1 LTR. *BMC Retrovirology* 2006;3:5.
60. Ego T., Tanaka Y. and Shimotohno K. Interaction of HTLV-1 Tax and methyl-CpG-binding domain 2 positively regulates the gene expression from the hypermethylated LTR. *Oncogene* 2005;24:1914–23.
61. Doi K., Wu X., Taniguchi Y. et al. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type I provirus integration sites in leukemic versus carrier states. *Blood* 2005;106:1048–1053.
62. Houzet L. and Jeang K.T. MicroRNAs and human retroviruses. *Biochim Biophys Acta* 2011;1809:686–93.
63. Abe M., Suzuki H., Nishitsuji H. et al. Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Rex protein with Dicer suppresses RNAi silencing. *FEBS Lett* 2010;58:4313–8.
64. Lezin A., Gillet N., Olindo S. et al. Histone deacetylase mediated transcriptional activation reduces proviral loads in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *Blood* 2007;110:3722–8.
65. Belrose G., Gross A., Olindo S. et al. Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSPT Lymphocytes. *Blood* 2011;118:2483–91.
66. Zimmerman B., Sargeant A., Landes K. et al. Efficacy of novel histone deacetylase inhibitor, AR42, in a mouse model of human T-lymphotropic virus type 1 adult T cell lymphoma. *Leukemia Res* 2011;35:1491–7.