

Роль метилирования регуляторного района вируса папиллом человека типа 16 в экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 в первичных опухолях шейки матки

П.М. Абрамов, А.Н. Катаргин, М.Д. Федорова, Н.П. Киселева, Л.С. Павлова, С.В. Винокурова
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Светлана Владимировна Винокурова vinokourova@mail.ru

Введение. Высокий уровень экспрессии онкогенов E6 и E7 вирусов папиллом человека (*human papillomaviruses, HPV*) является основным фактором инициации и прогрессии HPV-индуцированных опухолей. Инактивация функции негативного регулятора вирусной транскрипции и репликации – вирусного белка E2 – считается основным механизмом, приводящим к повышению экспрессии вирусных онкогенов. Известно, что в части HPV-положительных опухолей утрата функций E2 происходит вследствие разрыва открытой рамки считывания гена при интеграции вирусной ДНК в геном клетки. Установленная в опытах *in vitro* неспособность E2 связываться со своими сайтами в случае их метилирования позволяет предположить, что метилирование регуляторной области HPV может быть альтернативным механизмом блокировки функций E2 в опухолях, сохранивших его экспрессию.

Цель исследования – анализ метилирования регуляторного района HPV 16-го типа и экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 в клинических образцах рака шейки матки, экспрессирующих и неэкспрессирующих E2.

Результаты. Повышенный уровень метилирования регуляторного района, в том числе сайтов связывания E2, наблюдается в опухолях, экспрессирующих E2, по сравнению с опухолями, не экспрессирующими E2 ($p \leq 0,0001$). Снижение уровня метилирования промотора HPV 16-го типа в клеточной линии CaSki при обработке деметилирующим агентом сопровождается снижением уровня матричной РНК вирусных онкогенов E6 и E7, что подтверждает необходимость метилирования для эффективной транскрипции. Эти данные указывают на восстановление негативной регуляторной функции E2, экспрессирующегося в этих клетках, при деметилировании промотора.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить, что метилирование сайтов связывания E2 в регуляторной области HPV 16-го типа является важным механизмом, обеспечивающим высокий уровень экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 при сохранении экспрессии гена E2.

Ключевые слова: вирус папиллом человека, рак шейки матки, метилирование, регуляция экспрессии, вирусный онкоген E6, вирусный онкоген E7

Для цитирования: Абрамов П.М., Катаргин А.Н., Федорова М.Д. и др. Роль метилирования регуляторного района вируса папиллом человека типа 16 в экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 в первичных опухолях шейки матки. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):110–6.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-110-116

The role of HPV16 regulatory region methylation in viral oncogenes E6 and E7 expression in primary cervical cancer lesions

P.M. Abramov, A.N. Katargin, M.D. Fedorova, N.P. Kisseljova, S.V. Vinokurova
N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. Overexpression of the human papillomavirus oncogenes E6 and E7 is a major factor in initiation and progression of HPV-induced tumors. Inactivation of negative regulatory function of E2 protein – the main viral transcription and replication regulator – is considered to be an important mechanism leading to the viral oncogenes overexpression. It is known that the loss of E2 functions occurs due to disruption of E2 open reading frame during the viral DNA integration into a cell genome in a part of HPV-positive tumors. An alternative mechanism of E2 function blocking in tumors retained its expression can be methylation of the HPV regulatory region, since it is known that E2 is incapable to bind its methylated binding sites.

The study objective is to analyze methylation of the HPV16 regulatory region and expression of the viral E6 and E7 oncogenes in E2 expressing or non-expressing clinical samples of cervical cancer.

Results. It has been demonstrated that the level of the HPV16 URR methylation in E2-expressing lesions is significantly higher than that in non-expressing cervical cancer lesions. Demethylation of the HPV16 promoter in cervical cell line Caski is followed by decrease of the viral E6 and E7 oncogenes mRNA levels, supporting the hypothesis that methylation is necessary for effective E6 and E7 transcription and indicates on restitution of E2 regulatory function in E2-expressing cervical cancer cells.

Conclusion. These data suggest that methylation of E2 binding sites in HPV16 regulatory region blocking E2 protein binding represents an important mechanism ensuring high level of the viral E6 and E7 oncogenes expression.

Key words: human papillomavirus, cervical cancer, methylation, regulation of expression, viral oncogene E6, viral oncogenes E7

For citation: Abramov P.M., Katargin A.N., Fedorova M.D. et al. The role of HPV16 regulatory region methylation in viral oncogenes E6 and E7 expression in primary cervical cancer lesions. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):110–6.

Введение

Вирусы папиллом человека (human papillomaviruses, HPV) являются патогенными вирусами, инфицирующими плоскоклеточный эпителий. Длительная персистенция HPV высокого риска может вызывать развитие рака шейки матки, а также других онкологических заболеваний аногенитальной области и некоторых видов опухолей головы и шеи [1].

Повышение экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 (в десятки раз) – ключевой фактор в инициации процесса трансформации плоскоклеточного эпителия и прогрессировании заболевания [2, 3]. Дерегуляция экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7, в свою очередь, приводит к повышенной клеточной пролиферации и дестабилизации клеточного генома за счет многочисленных взаимодействий с клеточными факторами, из которых наиболее хорошо изученными являются опухолевые супрессоры p53 и pRb [4].

Регуляция экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 осуществляется за счет связывания многочисленных клеточных, а также вирусных транскрипционных факторов с регуляторной областью вирусного генома (upstream regulatory region, URR) [5]. Ключевым регулятором транскрипции вирусных онкогенов E6 и E7 является вирусный белок E2. В зависимости от концентрации и места связывания в URR он может выступать как в роли активатора, так и ингибитора вирусной транскрипции. E2 имеет 4 сайта связывания (E2 binding sites 1–4, 2BSs 1–4) в регуляторной области генома HPV (рис. 1а) [6]. Современная модель функционирования E2 как транскрипционного фактора во время нормального вирусного цикла предполагает, что белок E2 даже при малых концентрациях связывается с высокоаффинным сайтом E2BS1, тем самым активируя промотор, регулирующий ранние гены. Активация раннего промотора приводит к увеличению экспрессии ранних вирусных генов, включая вирусные онкогены E6 и E7, а также сам E2. С увеличением концентрации вирусного белка E2 он может взаимодействовать с низкоаффинными сайтами связывания (E2BS3 и E2BS4), что приводит к транскрипционной репрессии раннего промотора и, таким образом, поддерживает экспрессию вирусных онкогенов E6 и E7 на низком уровне [7, 8].

Нарушение E2-опосредованной регуляции вирусной транскрипции – основной механизм, приводящий к дерегуляции экспрессии вирусных онкогенов и,

тем самым, инициирующий процесс трансформации плоскоклеточного эпителия [9].

Предполагается, что интеграция вирусного генома HPV в геном человека, обычно происходящая

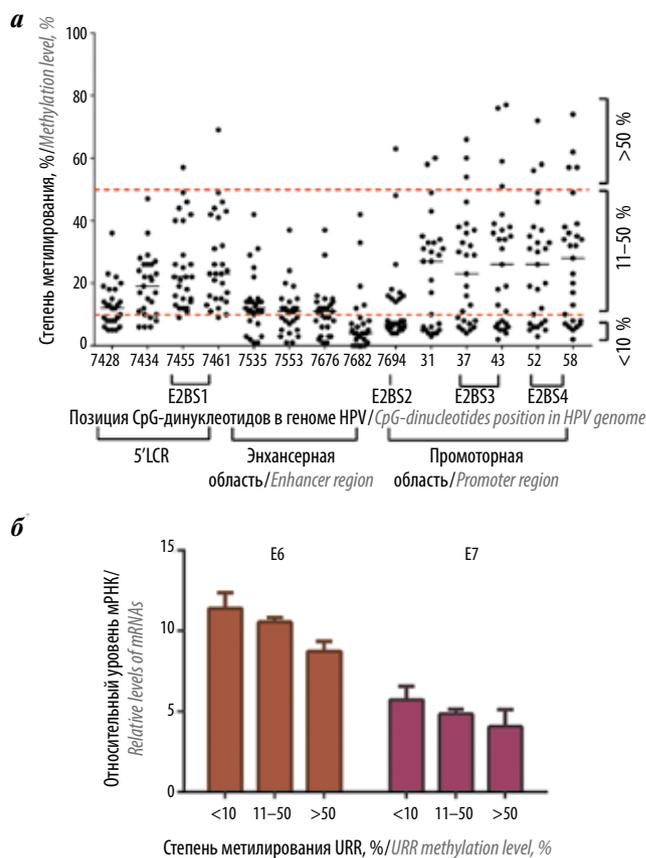


Рис. 1. Паттерн метилирования регуляторного района вируса папилломы человека (HPV) 16-го типа (а) и экспрессия онкогенов E6 и E7 в опухолях шейки матки (б): а – степень метилирования. Цифрами на оси абсцисс указаны позиции CpG-динуклеотидов в регуляторной области вирусного генома (URR) HPV 16-го типа; малыми скобками обозначены CpG-динуклеотиды, входящие в состав сайтов связывания E2 – E2BS1–4; пунктирными линиями обозначено разделение опухолей на 3 группы по уровню метилирования: 1) <10 %, 2) 11–50 %, 3) >50 %; б – относительный уровень мРНК онкогенов E6 и E7 в 3 группах. $p > 0,05$ по непараметрическому методу Фридмана и двухфакторному дисперсионному анализу (two-way ANOVA)

Fig. 1. Methylation pattern of the regulatory region of human papillomavirus type 16 (a) and expression of E6 and E7 oncogenes in cervical tumors (b): a – methylation level. Numbers under the X-axis denote positions of CpG-dinucleotides in URR of HPV type 16; small brackets denote CpG-dinucleotides in the E2 binding sites – E2BS1–4; dashed lines denote tumor separation in 3 groups depending on methylation level: 1) <10 %, 2) 11–50 %, 3) >50 %; б – relative level of mRNA E6 and E7 oncogenes in 3 groups. $p > 0.05$ by the non-parametric Friedman test and two-way ANOVA

с разрывом рамки считывания E2, является основным механизмом инактивации функции E2 [10]. Однако результаты последних исследований указывают на то, что кроме вирусной интеграции существуют другие механизмы ингибирования регуляторной функции E2.

Так, убедительно показано, что интеграция вирусного генома достаточно позднее событие в развитии рака шейки матки. Интеграция вируса даже в инвазивных опухолях не является необходимым для трансформации событием. Частота интеграции зависит от типа HPV и варьирует от 30 до 100 % [11]. Кроме того, существуют интегративные формы вируса в виде конкатемеров из полных копий вируса, ориентированных «голова-к-хвосту», в которых на достаточно высоком уровне экспрессируются гены E1 и E2 [12, 13].

Предполагается, что эпигенетические модификации генома HPV могут служить альтернативным механизмом, вовлеченным в дерегуляцию экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7. Промотор онкогенного HPV 16-го типа (HPV16), так же как и других HPV, не содержит типичных CpG-островков, метилирование которых обычно приводит к изменению структуры хроматина и инактивации промотора. Однако известно, что для всех типов HPV CpG-динуклеотиды не подвержены мутированию и всегда присутствуют в сайтах связывания вирусного регуляторного белка E2 [14], что указывает на важную функциональную роль метилирования этих сайтов в регуляции экспрессии вирусного генома.

Как было показано ранее, в экспериментах *in vitro*, метилирование в сайтах связывания E2 блокирует связывание белка E2 [15] и модулирует активность вирусного промотора и экспрессию вирусных онкогенов [16, 17]. Также обнаружено, что уровень метилирования в сайтах связывания E2, лежащих в регуляторном районе HPV, возрастает с прогрессированием рака шейки матки [18–21]. Для HPV16-положительных образцов рака ротоглотки установлена корреляция высокой степени метилирования вирусного регуляторного района с повышенной экспрессией вирусных онкогенов E6 и E7 [22].

Цель исследования – анализ метилирования регуляторного района HPV16 и транскрипции вирусных онкогенов E6 и E7 в клинических образцах рака шейки матки, экспрессирующих и не экспрессирующих E2.

Материалы и методы

Клинический материал и клеточные линии. Образцы плоскоклеточных карцином шейки матки получены в отделении гинекологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в результате оперативных вмешательств.

Проведение исследования одобрено Комитетом по этике при НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Коллекция исследованных образцов состояла из 27 HPV16-положительных плоскоклеточных карцином I, II

и III стадий. Диагноз опухолевой патологии установлен на основании клинической картины и гистологической верификации всех образцов в отделении патологической анатомии опухолей человека. HPV16-положительные клеточные линии рака шейки матки человека SiHa и CaSki (American Type Culture Collection, Rockville, MD) культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллином, стрептомицином и L-глутамином, в CO₂-инкубаторе при 5 % CO₂ и температуре 37 °C. Для анализа метилирования проводили обработку деметилирующим агентом 5-аза-2'-деоксицитидином (DAC, Sigma). Клетки сажали в 6-луночные планшеты и культивировали в течение 24 ч. Далее добавляли DAC в конечной концентрации 0,1; 0,5 и 1,0 мкМ и культивировали в течение 72 ч с ежедневным добавлением свежего деметилирующего агента. Через 72 ч клетки собирали для выделения ДНК и РНК. Выделение ДНК и РНК клеточных линий рака шейки матки человека SiHa и CaSki проводили с помощью наборов PureLink Genomic DNA и PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen) согласно рекомендации производителя. Измерение концентрации нуклеиновых кислот осуществляли на спектрофотометре NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ экспрессии генов. Анализ экспрессии вирусных генов E6, E7 и E2 проводили методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Перед реакцией обратной транскрипции РНК обрабатывали ДНКазой (Deoxyribonuclease I, Invitrogen). Для реакции обратной транскрипции использовали 1 мкг РНК и набор реактивов SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя с использованием смеси вырожденных гексамерных нуклеотидов (Литех, Россия). Для отрицательного контроля применяли рабочую смесь без добавления РНК.

Для постановки ПЦР в реальном времени использовали готовый набор qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), в который добавляли соответствующие праймеры и матрицу ДНК. Последовательности праймеров для генов E6, E7 и E2 приведены в публикациях [22, 23]. Исследование выполняли на приборе CFX96 (BioRad Laboratories, США). Программа проведения реакции для каждого из изучаемых генов была следующей: «горячий старт» 10 мин при температуре +95 °C; денатурация 20 с при температуре +95 °C; отжиг праймеров и синтез 60 с при температуре +60 °C. Экспрессию вирусных и клеточных генов вычисляли относительно гена «домашнего хозяйства» HPRT. Анализ относительной экспрессии после ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием ΔΔCt-метода.

Анализ метилирования. Анализ метилирования URR HPV16 проводили методом бисульфитного пиросеквенирования [24]. Бисульфитную обработку ДНК выполняли с помощью набора EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research). Амплификацию конвертированной ДНК проводили с готовой реакци-

онной смесью 5X MasDDTaqMIX-2025 (Dialat, Россия). Условия реакции ПЦР и последовательности праймеров описаны ранее [24]. Для пиросеквенирования использовали прибор PyroMark Q24 (QIAGEN, Германия) и вакуумную рабочую станцию PyroMark Q24 Vacuum Workstation (QIAGEN, Германия). Анализ пиrogramм исследуемых образцов осуществляли с помощью программного обеспечения PyroMark Q24 в режиме CpG.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ данных выполняли в программе GraphPad Prism 6.0 с использованием непараметрического метода Фридмана и двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) и непараметрического критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Метилирование регуляторного района HPV16 в клинических образцах карцином шейки матки. Вначале мы исследовали общий паттерн метилирования URR HPV16. Из имеющейся коллекции для анализа метилирования регуляторного района нами отобраны 27 образцов инвазивных карцином шейки матки с известным статусом генома HPV16 (эписомальным и интегративным). Всего проанализировано 14 CpG-динуклеотидов, расположенных в регуляторном районе HPV16 (см. рис. 1а). Из 5 CpG-динуклеотидов, расположенных в промоторной зоне, 4 находятся в сайтах связывания вирусного белка E2 (E2BS3 и E2BS4), 5 CpG-динуклеотида лежат в районе энхансера и 4 – в 5'-районе URR, 2 из которых находятся в сайте связывания вирусного белка E2 (E2BS1).

Как видно из рис. 1а, в промоторной области уровень метилирования для всех 5 CpG-динуклеотидов (CpG-динуклеотиды 31, 37, 43, 52 и 58) довольно высокий и варьирует от 5 до 80 % (медиана 30 %).

Несмотря на высокую гетерогенность метилирования в этом районе, образцы четко разделяются на 3 группы: 1) с низким (<10 %); 2) средним (11–50 %); 3) высоким (>50 %) уровнем метилирования.

В энхансерной области (CpG-динуклеотиды 7535, 7553, 7676, 7682 и 7694) степень метилирования низкая и варьирует от 0 до 50 % (медиана 10 %). Степень метилирования в 5'URR варьирует от 5 до 70 % (медиана 20 %).

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы и показывают, что по крайней мере в части инвазивных карцином шейки матки (группы 2 и 3) уровень метилирования промотора HPV16 довольно высокий [19–21, 24].

Анализ уровня экспрессии вирусных онкогенов и степени метилирования промоторной области HPV16. Относительную экспрессию вирусных онкогенов E6 и E7 сравнивали методом количественной ПЦР в реальном времени в 3 группах опухолей с разным уровнем метилирования промотора: <10, 11–50 и >50 % (рис. 1б). При статистической оценке не выявлено

достоверных различий между экспрессией вирусных онкогенов E6 и E7 в группах с разной степенью метилирования промотора HPV16. Полученные данные указывают на то, что высокий уровень экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 наблюдается во всех образцах независимо от степени метилирования вирусного промотора. Поскольку, как уже говорилось выше, блокирование связывания E2 метилированием его сайтов является прочно установленным фактом [15] и приводит к нарушению E2-опосредованной регуляции вирусной транскрипции [16, 17], можно считать, что в группе с низким уровнем метилирования регуляторная функция E2 подавляется, по-видимому, другим механизмом. Инактивация регуляторной функции E2 может происходить за счет мутаций в рамке считывания E2, а также за счет мутаций в сайтах связывания белка E2, что встречается достаточно редко [25]. Более частым механизмом является разрыв рамки считывания E2 в результате интеграции вирусного генома с полной утратой экспрессии E2 [10].

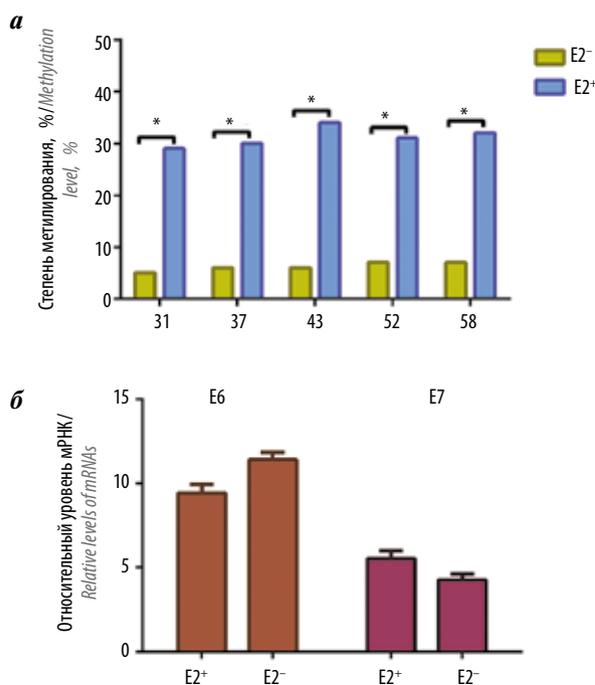


Рис. 2. Сравнение уровней метилирования промоторного района регуляторной области вирусного генома (URR) (а) и экспрессии онкогенов E6 и E7 в опухолях шейки матки (б) с разным статусом E2: а – степень метилирования. Цифрами на оси абсцисс указаны позиции CpG-динуклеотидов в промоторе вируса папиллом человека (HPV) 16-го типа; «E2–» – нет экспрессии E2, «E2+» – есть экспрессия E2; * $p \leq 0,0001$ по непараметрическому критерию Манна–Уитни; б – относительный уровень мРНК онкогенов E6 и E7 в группах E2+ и E2–

Fig. 2. Comparison of methylation level of URR (a) and expression of E6 and E7 oncogenes in cervical tumors (b) with different E2 statuses: a – methylation levels. Numbers under the X-axis denote positions of CpG-dinucleotides within URR of HPV type 16; «E2–» – absence of E2 expression, «E2+» – presence of E2 expression; * $p \leq 0.0001$ by the non-parametric Mann–Whitney U test; б – relative levels of E6 and E7 oncogenes mRNAs in the E2+ and E2– groups

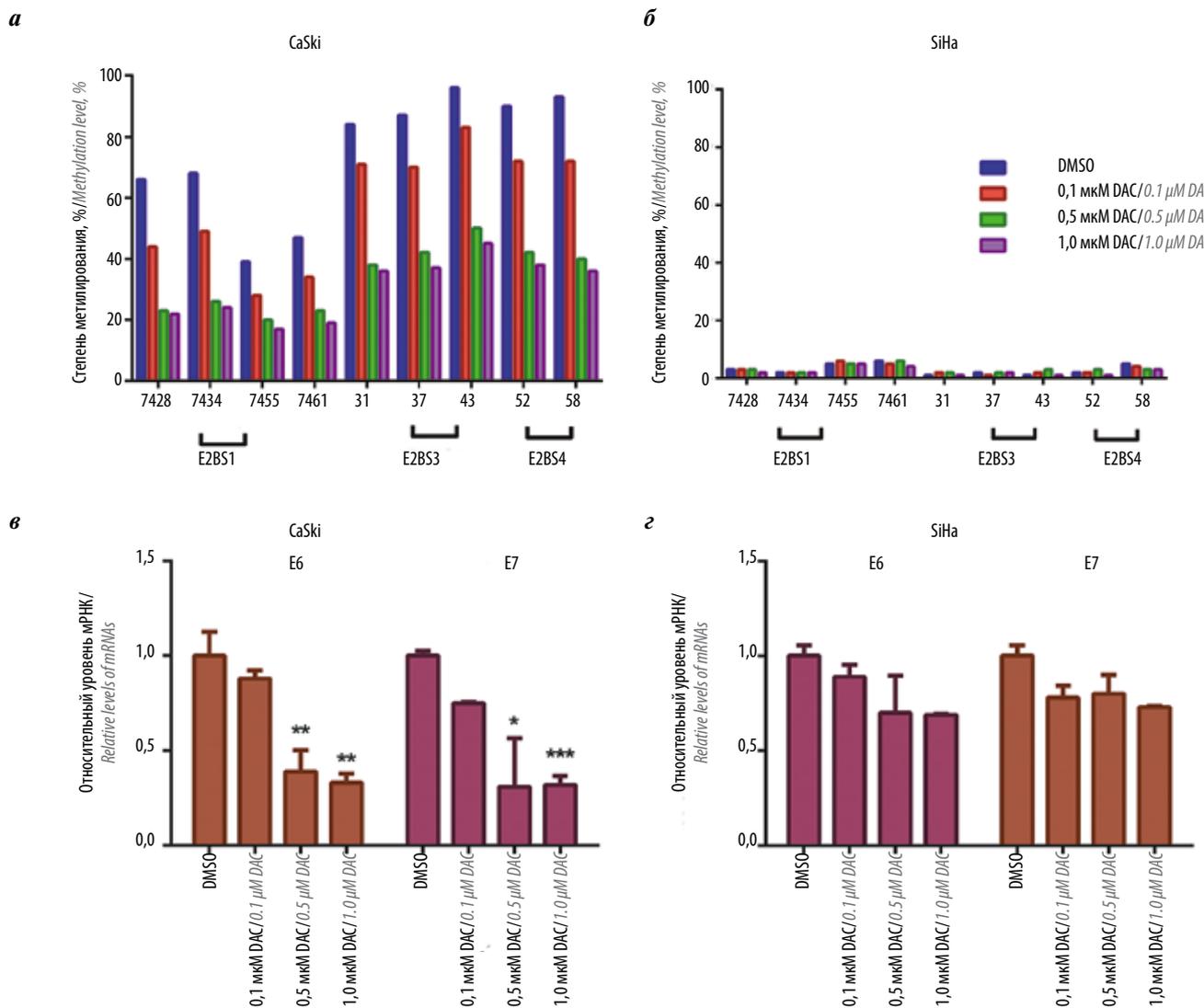


Рис. 3. Уровень метилирования в регуляторной области вирусного генома (URR) HPV 16-го типа (а, б) и экспрессии онкогенов E6 и E7 (в, г) в клеточных линиях CaSki и SiHa после обработки деметилирующим агентом DAC: а, б – степень метилирования. Цифрами на оси абсцисс указаны позиции CpG-динуклеотидов в URR HPV 16-го типа; малыми скобками обозначены CpG-динуклеотиды, входящие в состав сайтов связывания E2 – E2BS1–4; в, г – относительный уровень мРНК онкогенов E6 и E7 при различных концентрациях DAC по сравнению с контролем (DMSO). * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ по непараметрическому критерию Манна–Уитни

Fig. 3. Methylation level of HPV16 URR (а, б) and E6 and E7 oncogene expression levels (в, г) in the CaSki and SiHa cell cultures treated with DAC demethylation agent: а, б – methylation level. Numbers on the X-axis denote positions of CpG-dinucleotides in the URR of HPV type 16; small brackets denote CpG-dinucleotides in the E2 binding sites – E2BS1–4; в, г – relative levels of mRNAs of E6 and E7 oncogenes for different concentrations of DAC compared to control (DMSO). * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ by the non-parametric Mann–Whitney U test

Анализ уровня метилирования промоторной области HPV16 в опухолях с экспрессией E2 и без нее. В связи с вышесказанным мы предположили, что в опухолях при сохранении экспрессии E2 его регуляторная роль может быть заблокирована метилированием сайтов связывания, а при отсутствии интактной рамки считывания E2 уровень метилирования должен быть низким, так как этот механизм блокировки являлся бы избыточным для данной группы опухолей.

Клинические образцы были разделены на 2 группы с учетом наличия экспрессии вирусного гена E2.

Уровень метилирования всех 5 CpG-динуклеотидов промоторной зоны HPV16 оказался достоверно выше

в образцах, экспрессирующих E2, по сравнению с образцами с отсутствием экспрессии E2 ($p < 0,001$) (рис. 2а).

Поскольку по уровню экспрессии мРНК онкогенов E6 и E7 все опухоли достоверно не различались друг от друга (рис. 2б), то и сравнение уровней мРНК в группах опухолей, экспрессирующих и не экспрессирующих E2, не выявило достоверных различий ($p > 0,05$). Эти данные указывают на отсутствие отрицательного действия E2 на транскрипцию в обеих группах опухолей.

Таким образом, повышение метилирования промотора характерно для опухолей, сохранивших экспрессию E2.

Подавление экспрессии онкогенов *E6* и *E7* HPV16 деметилирующим агентом DAC *in vitro*. Для того чтобы подтвердить регулируемую роль метилирования URR HPV16 на экспрессию онкогенов HPV *E6* и *E7*, мы использовали 2 HPV16-положительные клеточные линии карцином шейки матки, моделирующие 2 исследованные группы опухолей: CaSki с высоким уровнем метилирования URR и экспрессирующую E2 и SiHa с низким уровнем метилирования URR, в которой целостность рамки считывания гена *E2* нарушена в процессе интеграции вирусного генома.

Клетки обрабатывали деметилирующим агентом 5-аза-2'-деоксицитидином (DAC), и после инкубации проводили анализ метилирования URR, а также анализ уровня экспрессии вирусных онкогенов *E6* и *E7*. В анализ метилирования были включены 9 CpG-динуклеотидов, лежащих в промоторе, а также в 5'-URR HPV16 (рис. 3а, б).

Обработка клеточной линии CaSki в течение 72 ч в 2 раза снижает уровень метилирования для всех 9 CpG-динуклеотидов при 0,5 и 1,0 мкМ концентрациях DAC. Для клеточной линии SiHa с низким уровнем метилирования URR HPV16 обработка DAC не приводила к дальнейшему уменьшению метилирования этого района (см. рис. 3а, б). Все данные были получены не менее чем в 3 независимых экспериментах.

Достоверное снижение (более чем в 2 раза) уровней мРНК вирусных онкогенов *E6* и *E7* после обработки DAC наблюдалось в клеточной линии CaSki (рис. 3в). В клеточной линии SiHa снижения уровня экспрессии *E6* и *E7* по сравнению с необработанным контролем

не обнаружено ($p > 0,05$), что, по-видимому, связано с отсутствием метилирования в URR HPV16 в этой клеточной линии (рис. 3г).

Деметилирование промотора HPV16 в клеточной линии CaSki сопровождается снижением уровня мРНК вирусных онкогенов *E6* и *E7*. Можно предположить, что снижение метилирования URR приводит к увеличению связывания вирусного белка E2 и тем самым приводит к восстановлению его ингибиторной функции. Таким образом, метилирование URR необходимо для эффективной транскрипции вирусных онкогенов *E6* и *E7* в условиях экспрессии негативного регулятора. Снижение экспрессии вирусных онкогенов *E6* и *E7* при деметилировании промотора отличается от канонической схемы регуляции транскрипции метилированием CpG-островков в промоторах генов, которое в большинстве случаев сопровождается подавлением транскрипции.

Заключение

Регуляция экспрессии онкогенов *E6* и *E7* HPV16 клеточной системой метилирования ДНК носит сложный характер. Нами показано, что метилирование промоторной области HPV16 наблюдается в большинстве опухолей, экспрессирующих вирусный метилчувствительный негативный регулятор транскрипции ген *E2*, но отсутствует в большинстве опухолей, утративших его экспрессию. В культуре клеток, экспрессирующих E2, показано, что регуляция экспрессии онкогенов *E6* и *E7* осуществляется по альтернативному механизму, а для его поддержания необходимо метилирование регуляторной области HPV16.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Doorbar J., Egawa N., Griffin H. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol* 2015;25 Suppl 1:2–23. DOI: 10.1002/rmv.1822. PMID: 25752814.
2. Chen J., Xue Y., Poidinger M. et al. Mapping of HPV transcripts in four human cervical lesions using RNAseq suggests quantitative rearrangements during carcinogenic progression. *Virology* 2014;462–463:14–24. DOI: 10.1016/j.virol.2014.05.026. PMID: 25092457.
3. zur Hausen H. Human papillomavirus & cervical cancer. *Indian J Med Res* 2009;130(3):209. PMID: 19901427.
4. Moody C.A., Laimins L.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010;10(8):550–60. DOI: 10.1038/nrc2886. PMID: 20592731.
5. Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* 2009;384(2):375–9. DOI: 10.1016/j.virol.2008.11.014. PMID: 19064276.
6. Bedrosian C.L., Bastia D. The DNA-binding domain of HPV-16 E2 protein interaction with the viral enhancer: protein-induced DNA bending and role of the nonconserved core sequence in binding site affinity. *Virology* 1990;174(2):557–75. PMID: 2154890.
7. Hegde R.S. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002;31:343–60. DOI: 10.1146/annurev.biophys.31.100901.142129. PMID: 11988474.
8. Steger G., Corbach S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol* 1997;71(1):50–8. PMID: 8985322.
9. Woodman C.B., Collins S.I., Young L.S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007;7(1):11–22. DOI: 10.1038/nrc2050. PMID: 17186016.
10. Pett M., Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 2007;212(4):356–67. DOI: 10.1002/path.2192. PMID: 17573670.
11. Vinokurova S., Wentzensen N., Kraus I. et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* 2008;68(1):307–13. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2754. PMID: 18172324.
12. Klaes R., Woerner S.M., Ridder R. et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 1999;59(24):6132–6. PMID: 10626803.
13. Wentzensen N., Vinokurova S., von Knebel Doeberitz M. Systematic re-

- view 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. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0009. PMID: 15172997.
14. Sanchez I.E., Dellarole M., Gaston K. et al. Comprehensive comparison of the interaction of the E2 master regulator with its cognate target DNA sites in 73 human papillomavirus types by sequence statistics. *Nucleic Acids Res* 2008;36(3):756–69. DOI: 10.1093/nar/gkm1104. PMID: 18084026.
 15. Thain A., Jenkins O., Clarke A.R. et al. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *J Virol* 1996;70(10):7233–5. PMID: 8794373.
 16. Kim K., Garner-Hamrick P.A., Fisher C. et al. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol* 2003;77(23):12450–9. PMID: 14610169.
 17. 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0024451. PMID: 21915330.
 18. Badal S., Badal V., Calleja-Macias I.E. et al. The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology* 2004;324(2):483–92. DOI: 10.1016/j.virol.2004.04.002. PMID: 15207633.
 19. Badal V., Chuang L.S., Tan E.H. et al. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* 2003;77(11):6227–34. PMID: 12743279.
 20. Ding D.C., Chiang M.H., Lai H.C. et al. Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;147(2):215–20. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2009.08.023. PMID: 19819061.
 21. Kalantari M., Calleja-Macias I.E., Tewari D. et al. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol* 2004;78(23):12762–72. DOI: 10.1128/JVI.78.23.12762-12772.2004. PMID: 15542628.
 22. Reuschenbach M., Huebbers C.U., Prigge E.S. et al. Methylation status of HPV16 E2-binding sites classifies subtypes of HPV-associated oropharyngeal cancers. *Cancer* 2015;121(12):1966–76. DOI: 10.1002/cncr.29315. PMID: 25731880
 23. Stich M., Ganss L., Puschhof J. et al. 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) treatment downregulates the HPV E6 and E7 oncogene expression and blocks neoplastic growth of HPV-associated cancer cells. *Oncotarget* 2017;8(32):52104–17. DOI: 10.18632/oncotarget.10631. PMID: 28881717.
 24. Rajeevan M.S., Swan D.C., Duncan K. et al. Quantitation of site-specific HPV 16 DNA methylation by pyrosequencing. *J Virol Methods* 2006;138(1–2):170–6. DOI: 10.1016/j.jviromet.2006.08.012. PMID: 17045346.
 25. Kukimoto I., Maehama T., Sekizuka T. et al. Genetic variation of human papillomavirus type 16 in individual clinical specimens revealed by deep sequencing. *PLoS One* 2013;8(11):e80583. DOI: 10.1371/journal.pone.0080583. PMID: 24236186.

Вклад авторов

П.М. Абрамов: выполнение эксперимента, статистический анализ данных, написание рукописи;
 А.Н. Катаргин, М.Д. Федорова: выполнение эксперимента;
 Н.П. Киселева: анализ экспериментальных данных, редактирование рукописи;
 Л.С. Павлова: сбор клинического материала;
 С.В. Винокурова: разработка дизайна исследования, анализ экспериментальных данных, написание рукописи.

Authors' contributions

P.M. Abramov: obtaining data for analysis, statistical analysis of the data, article writing;
 A.N. Katargin, M.D. Fedorova: obtaining data for analysis;
 N.P. Kisseljova: analysis of the obtained data, article editing;
 L.S. Pavlova: clinical samples collection
 S.V. Vinokurova: developing the research design, analysis of the obtained data, article writing.

ORCID авторов/ORCID of authors

П.М. Абрамов/P.M. Abramov: <https://orcid.org/0000-0002-7995-3490>
 А.Н. Катаргин/A.N. Katargin: <https://orcid.org/0000-0002-7405-0671>
 М.Д. Федорова/M.D. Fedorova: <https://orcid.org/0000-0002-8813-7516>
 Н.П. Киселева/N.P. Kisseljova: <https://orcid.org/0000-0003-0236-4548>
 Л.С. Павлова/L.S. Pavlova: <https://orcid.org/0000-0003-3993-4823>
 С.В. Винокурова/S.V. Vinokurova: <https://orcid.org/0000-0003-1615-3928>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 22.10.2018. **Принята к публикации:** 12.11.2018.

Article received: 22.10.2018. **Accepted for publication:** 12.11.2018.