

Генетические и эпигенетические механизмы регуляции вирусов папиллом человека

С. В. Винокурова

НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОИЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Светлана Владимировна Винокурова vinokourova@mail.ru

Инфекция вирусом папиллом человека (*human papillomavirus, HPV*) высокого канцерогенного риска является этиологическим фактором некоторых видов опухолей аногенитальной области и опухолей головы и шеи. Многочисленные эпидемиологические исследования показали связь длительно персистирующей инфекции HPV высокого канцерогенного риска с последующим развитием рака шейки матки и опухолей других локализаций. Экспериментальные данные с использованием цервикальных клеточных моделей и клинических образцов опухолей шейки матки продемонстрировали, что более чем в 99 % клинических образцов рака шейки матки вирусные онкогены E6 и E7 сохраняются и экспрессируются. Вирусные онкогены могут трансформировать кератиноциты в экспериментах *in vitro*; их ингибирование приводит к подавлению неопластического роста клеток. Молекулярные механизмы иммортализации и трансформации вирусными онкогенами E6 и E7 достаточно хорошо исследованы. Однако остаются неясными механизмы дерегуляции экспрессии вирусных онкогенов, приводящие к переходу от продуктивного вирусного цикла к трансформации плоскоклеточного эпителия. В настоящем обзоре описано современное представление о продуктивном вирусном цикле и обсуждаются потенциальные молекулярные механизмы, вызывающие инициацию процесса трансформации нормального эпителия в неопластические предраковые поражения. Выяснение молекулярных механизмов, необходимых для неопластической трансформации HPV-инфицированных нормальных клеток в опухолевые, может предоставить основу для концептуально новых терапевтических подходов лечения HPV-ассоциированных опухолей.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, вирус папилломы высокого канцерогенного риска, HPV-ассоциированная опухоль, рак шейки матки, интеграция вирусного генома, метилирование вирусного генома

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-2-18-25

Genetic and epigenetic mechanisms of regulation of human papillomavirus

S. V. Vinokurova

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Infections with high-risk human papillomaviruses (HPV) are the etiological factor of certain types of human cancers in anogenital tract and head and neck cancers. Extensive epidemiological studies demonstrated the association of persistent high-risk HPV infection and the later development of cervical and other cancers. Experimental data using cell lines models and cervical cancers demonstrate that in more than 99 % of clinical samples the viral E6 and E7 genes are retained and expressed. These genes can transform human cells and inhibition of their expression in cancer cells results in loss of neoplastic growth properties. Molecular mechanisms of immortalization and transformation by E6 and E7 have extensively been investigated. However, the mechanism of E6 and E7 deregulation that triggers the shift from permissive infection to neoplastic transforming infection is still unclear. This review describes the current knowledge about the viral life cycle and discusses the molecular mechanisms that potentially allow the virus to escape its normal control and may trigger neoplastic progression. The molecular clarification of these events required for transformation of HPV-infected cells into cancer will provide a basis for conceptually novel diagnostic and therapeutic strategies and approaches.

Key words: human papillomavirus, high-risk papillomavirus, HPV-associated cancer, cervical cancer, viral genome integration, viral genome methylation

Вирусы папиллом и их ассоциация с болезнями человека

Вирусы папиллом относятся к семейству *Papillomaviridae*, являются эпителиотропными вирусами и представляют собой одну из наиболее гетерогенных групп вирусов, которые инфицируют как человека, так и животных. В настоящее время известно более 189 типов вирусов папиллом, из них 120 относятся к вирусам папиллом человека (*human papillomaviruses, HPV*) [1].

HPV инфицируют базальные клетки плоскоклеточного эпителия кожных или слизистых покровов ротовой и генитальной областей. В связи с этим их подразделяют на кожные и мукозальные. Из 189 типов HPV около 40 инфицируют слизистый эпителий генитального тракта [1]. По степени риска развития онкологических заболеваний их подразделяют на 2 основные группы: высокого (*high-risk human papillomaviruses*,

HR-HPV) и низкого (low-risk human papillomaviruses, LR-HPV) канцерогенного риска. К HR-HPV относят HPV 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 и 70-го типов, к LR-HPV – 6, 11, 42, 43 и 44-го типов [2].

Наиболее частые проявления инфекции, вызванные HPV, поражающими кожный эпителий, – бородавки и папилломы [3]. К доброкачественным поражениям слизистого эпителия генитальной области относятся остроконечные кондиломы, которые вызываются LR-HPV, такими как HPV 6-го и 11-го типов. Однако и другие типы HPV, включая HPV 2, 16 и 18-го типов, могут вызывать образование генитальных кондилом.

Пристальное внимание исследователей к HPV связано с HPV-ассоциированными опухолями, наиболее значимыми из которых являются рак шейки матки, опухоли аногенитальной области и ротоглотки [4–6]. Ассоциация HPV с опухолевыми заболеваниями человека наиболее хорошо изучена для рака шейки матки. Частота обнаружения HR-HPV в инвазивных опухолях шейки матки составляет около 99 %, в опухолях ануса – 96 %, вульвы – 90 %, влагалища – 85 %.

Только 50 % опухолей ротоглотки ассоциированы с HR-HPV, преимущественно с HPV 16-го типа. HPV-ассоциированные карциномы ротоглотки представляют собой отдельную группу опухолей, отличающуюся по молекулярно-биологическим и клиническим характеристикам от HPV-негативных опухолей [3]. В настоящее время также активно обсуждается роль HPV в инициации некоторых видов рака кожи человека [7].

Структура генома вируса папилломы человека

Вирусные частицы имеют у всех HPV сходную безоболочечную икосаэдрическую структуру диаметром 50–60 нм. Геном HPV представляет собой двуцепочечную кольцевую молекулу ДНК (эписому) размером около 8000 пар оснований, которая содержит 8–10 рамок считывания (рис. 1). В геноме HPV выделяют несколько основных районов: некодирующий регуляторный участок (upstream regulatory region, URR), участок, кодирующий ранние гены *E1–E5* (*E* – early genes), и участок, кодирующий поздние гены *L1* и *L2* (*L* – late genes) [8, 9]. Рамки считывания в вирусном геноме разделяют на ранние и поздние в зависимости от времени начала экспрессии в период нормального вирусного цикла.

Ранние гены *E1* и *E2* вовлечены в контроль вирусной репликации. *E1* кодирует вирусоспецифическую ДНК-хеликазу, необходимую для вирусной репликации. *E2*, который может связываться как с вирусной, так и с клеточной ДНК, является ключевым регулятором вирусной транскрипции и репликации, а также гарантирует правильное распределение вирусных геномов в каждую из дочерних клеток во время деления. Продукт гена *E5* обеспечивает механизмы иммунной эвазии и оптимизации эффективности амплификации генома. Белок *E4* играет важную роль в созревании

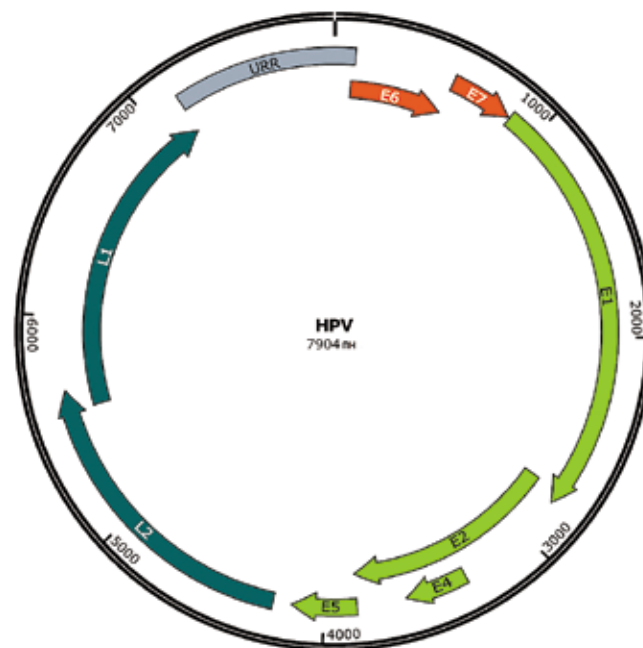


Рис. 1. Структура генома вируса папилломы. Гены обозначены стрелками, указывающими направление считывания. *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* и *E7* – ранние гены, *L1* и *L2* – поздние гены. URR – регуляторная последовательность вирусного генома

вирусных частиц и высвобождению вируса с поверхности эпителия. *E6* и *E7* являются вирусными онкобелками и играют ключевую роль в период нормального продуктивного вирусного цикла, взаимодействуя с белками-супрессорами клеточного цикла *p53* и *pRB* в инфицированном эпителии [4, 10].

Поздние гены *L1* и *L2* кодируют малый и главный капсидные белки.

URR располагается между *L1* и началом ранней области, содержит промоторные элементы, сайты связывания факторов транскрипции (включая палиндромные последовательности, распознаваемые вирусным белком *E2*) и вирусную точку начала репликации, с которой связывается *E1* [3].

Различные виды вирусной инфекции: латентная, продуктивная и трансформирующая

Способность различных типов HPV осуществлять продуктивный вирусный цикл зависит от процесса дифференцировки плоскоклеточного эпителия. Общие принципы организации вирусного цикла сходны для всех HPV. Для инфицирования HPV необходимы микротравмы и повреждения эпителия, приводящие к инфицированию базальных и парабазальных митотически активных клеток эпителия, способных поддерживать персистенцию вируса [11]. Далее наступает фаза первоначальной амплификации вирусного генома для поддержания небольшого (50–100) количества копий вирусной эписомы в клетках. На этой стадии, называемой латентной инфекцией, вирус не вызывает цитопатологических эффектов в инфицированном эпителии и клинически не проявляется, экспрессия ви-

русных генов отсутствует или находится на очень низком уровне (рис. 2) [12].

Однако в некоторых инфицированных клетках происходит активация экспрессии вирусных генов и запуск механизмов вирусной репликации и инициации продуктивной вирусной инфекции. Клиническое проявление продуктивной инфекции – возникновение межэпителиальных неоплазий I степени (для шейки матки – цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки I степени (cervical intraepithelial neoplasia, CIN1)). Молекулярные механизмы, контролирующие латентную и продуктивную инфекции, в настоящее время недостаточно изучены [13]. С началом вирусной экспрессии ранний промотор (p97 для HPV 16 и 31-го типов, p107 для HPV 18-го типа) регулирует экспрессию вирусных онкобелков, а также белков, вовлеченных в репликацию *E1* и *E2*, поддерживая их низкий и сбалансированный уровень [14]. Сбалансированная экспрессия ранних генов (*E1*, *E2*, *E6*, *E7*) позволяет поддерживать низкий, но четко контролируемый уровень вирусной репликации, которая на этом этапе синхронизирована с делением клеток эпителия хозяина [10].

В этой связи вирусный белок *E2* работает как мультифункциональный полипептид, играющий критическую роль в вирусной репликации и регуляции транскрипции с раннего промотора [15]. *E2* имеет 4 консервативных сайта связывания (*E2* binding sites, *E2BS*) в *URR* с различной аффинностью. При низких концентрациях *E2*, связываясь с высокоаффинным сайтом *E2BS-1*, активирует транскрипцию с раннего промотора, приводящую к увеличению экспрессии ранних

генов *E6* и *E7*, и самого *E2*. При высоких концентрациях *E2* связывается с низкоаффинными проксимальными сайтами *E2BS-2*, *-3* и подавляет активность раннего промотора за счет вытеснения клеточных *Sp1*- и *TBP*-активирующих транскрипционных факторов с их сайтов связывания [16, 17].

Таким образом, при нормальном вирусном цикле осуществляется тонкая регуляция активности раннего промотора и поддерживается равновесие в экспрессии вирусных онкогенов *E6* и *E7* [18–20].

Вирусные онкобелки *E6* и *E7* при нормальном вирусном цикле вовлечены в поддержание репликации эписомального вирусного генома за счет взаимодействия с регуляторами клеточного цикла, такими как *p53*-, *pRB*- и *PDZ*-доменсодержащими белками и многими другими клеточными факторами [21].

Механизм репликации находится в активном состоянии в пролиферирующих базальных клетках эпителия, тогда как в постмитотических дифференцирующихся клетках промежуточного поверхностного слоя эпителия «репликативная машина» клетки не работает [22]. HPV обладают способностью преодолевать блокировку синтеза ДНК, происходящую во время дифференцировки плоскоклеточного эпителия [23]. Для завершения вирусного цикла HPV должны воспроизвести свой геном и упаковать его в вирусные частицы. Для этого необходимы активация как раннего, так и позднего промоторов, и повышение экспрессии вирусных белков (*E1*, *E2*, *E4* и *E5*), вовлеченных в репликацию и созревание вирусного капсида [24]. Это происходит в промежуточных и верхних слоях эпителия, где про-

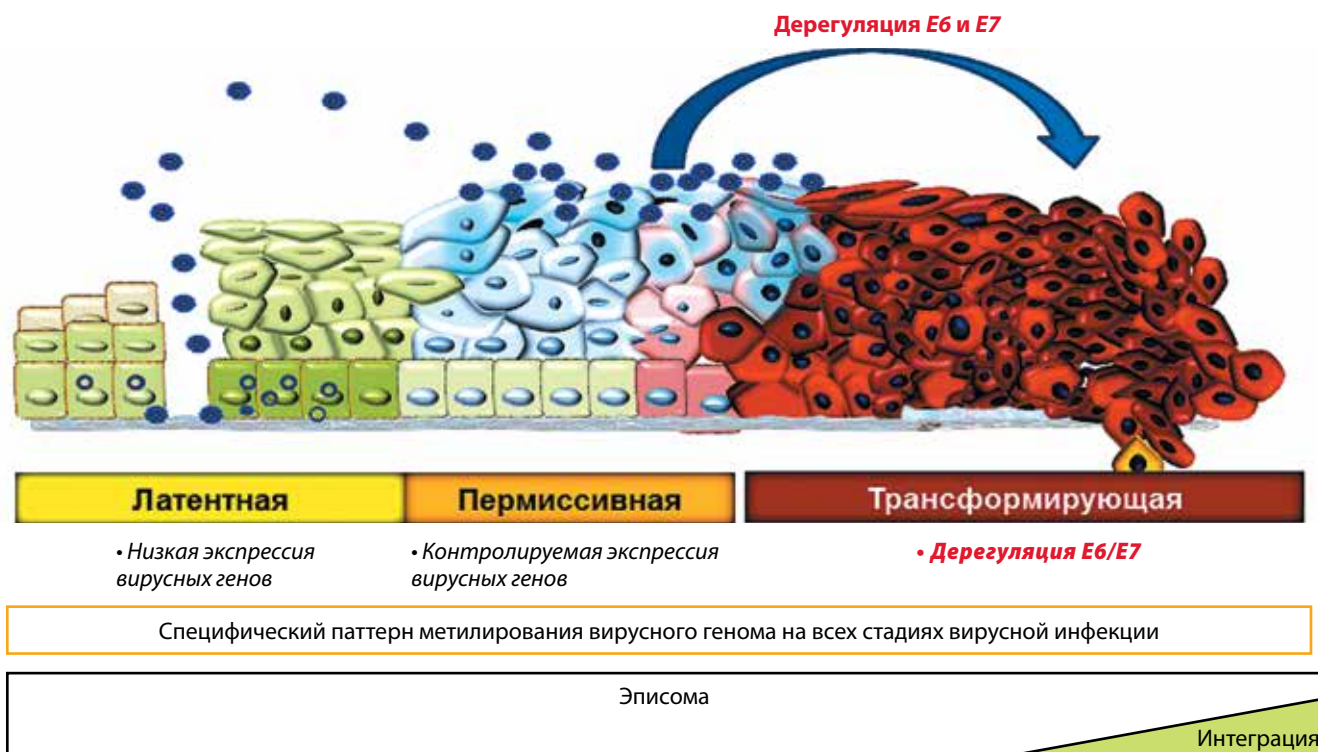


Рис. 2. Схематическое представление различных типов вирусной инфекции [13]

цесс дифференцировки уже начался. Как только инфицированные клетки достигают стадии терминальной дифференцировки, в поверхностных слоях эпителия вирусные капсидные белки L1 и L2 обеспечивают сборку вирусных частиц [25, 26]. HPV не являются литическими вирусами, и высвобождение новообразованных вирусных частиц происходит вместе с физиологическим слущиванием верхних слоев плоскоклеточного эпителия.

HPV-инфекция может прогрессировать в определенных клетках в трансформирующую инфекцию и, в конечном счете, в инвазивные опухоли (см. рис. 2). Процесс трансформации происходит преимущественно в специфической зоне перехода плоскоклеточного и цилиндрического эпителия (зона трансформации шейки матки). Особая предрасположенность зоны трансформации шейки матки к развитию опухолей, возможно, связана с тем, что в этой зоне находятся кубические стволовые клетки, которые, как полагают, могут быть наиболее чувствительны к трансформации после инфекции HR-HPV [27].

Ключевой механизм перехода продуктивной инфекции HR-HPV в трансформирующую – повышение экспрессии вирусных трансформирующих белков E6 и E7 в базальных и парабазальных клетках плоскоклеточного эпителия. Высокий уровень онкобелков HR-HPV E6 и E7 в клетках нарушает антипролиферативный клеточный механизм и индуцирует хромосомную нестабильность [28, 29], что является ключевым событием, запускающим каскад канцерогенной прогрессии [9].

Молекулярные механизмы, приводящие к неконтролируемой экспрессии вирусных генов, в настоящее время недостаточно ясны. Существует несколько различных концепций, объясняющих нарушение регуляции экспрессии вирусных генов.

Генетическая регуляция

Наиболее распространенная до недавнего времени концепция предполагает, что интеграция генома HPV и разрыв рамки считывания E2 приводят к нарушению регуляторной функции E2 [30, 31]. Поскольку высокий уровень E2 ингибирует транскрипционную активность URR HPV, интеграция вирусного генома приводит к нарушению негативного контроля и повышенной экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 на ранней стадии вирусной трансформации [15]. Однако эта концепция противоречит недавним исследованиям, показавшим, что даже злокачественные инвазивные HPV-ассоциированные опухоли содержат вирусный геном в эписомальной, а не интегрированной форме [32–34] и экспрессируют полноразмерный белок E2 [35]. Более того, интеграция вирусного генома является поздним событием в прогрессии пренеопластических интраэпителиальных поражений в инвазивные опухоли [32, 33].

Если интеграция вирусного генома – инициирующее событие в дерегуляции экспрессии генов E6 и E7,

то интеграция HPV должна существенно предшествовать переходу из перmissивной в трансформирующую инфекцию. Трансформирующая инфекция возникает на ранних этапах развития предопухолевых состояний, таких как CIN1. Это подтверждается иммуногистохимическими исследованиями с использованием p16^{INK4a}, суррогатного маркера трансформирующей инфекции HR-HPV [36, 37]. p16^{INK4a}-положительные клетки появляются уже в CIN1 как субклоны в перmissивных реплицирующих HPV-поражениях [36, 38]. Эти клетки представляют собой ранние стадии HPV-индуцированной трансформации, которые, разрастаясь, дают начало прогрессирующим поражениям II и III степени (CIN2 и CIN3) и, в конечном счете инвазивным опухолям. Идентификация p16^{INK4a}-положительных клонов значительно раньше интеграции вирусного генома доказывает, что последняя является не причиной, а следствием дерегуляции вирусных онкогенов и связанной с этим процессом трансформации. Таким образом, возможно, какие-то альтернативные механизмы принимают участие в нарушении контролируемой экспрессии вирусных онкогенов и инициируют процесс перехода из перmissивной инфекции HPV в трансформирующую. На основании последних данных можно предположить, что эпигенетические модификации вирусного генома, например ДНК-метилирование, могут участвовать в механизме регуляции вирусного генома.

Эпигенетические механизмы регуляции

ДНК-метилирование – важный эпигенетический механизм регуляции транскрипционной активности генома. Метилирование цитозина в положении 5' в составе CpG-динуклеотидов является одной из наиболее распространенных модификаций ДНК, около 70 % динуклеотидов в геноме человека метилированы [39]. CpG-динуклеотиды недостаточно представлены в геноме, за исключением коротких последовательностей ДНК, известных как CpG-островки. CpG-островки – GC-богатые последовательности (> 50 % CpG) ДНК длиной от 200 до нескольких тысяч пар нуклеотидов, часто ассоциированные с промоторами и первыми экзонами клеточных генов. В отличие от основной части ДНК CpG-сайты в островках преимущественно неметилированы [40]. Функциональные исследования демонстрируют, что гиперметилирование CpG-островков в составе промоторов генов связано с транскрипционной репрессией гена [41–43].

Контроль экспрессии генов за счет эпигенетических модификаций различных ДНК-последовательностей является фундаментальным процессом, который влияет на эмбриональное развитие, клеточную дифференцировку и старение и другие ключевые биологические процессы [44]. Кроме того, изменения и нарушения эпигенетических регуляторных механизмов, особенно метилирования ДНК, играют существенную

роль в возникновении и прогрессировании опухолей [45, 46].

За последние годы расширилось понимание роли межгенного метилирования (intra-genic methylation, IGM) ДНК и метилирования кодирующих участков гена («тела гена») в регуляции и эффективности транскрипции. Показано, что метилирование кодирующих участков гена положительно коррелирует с уровнем экспрессии [47]. Предполагается, что IGM может подавлять инициацию транскрипции с альтернативных сайтов [48], модифицировать эффективность транскрипции с помощью РНК-полимеразы II и транскрипционных комплексов [49], изменять положение нуклеосом [50] и влиять на сплайсинг [51–53]. Таким образом, метилирование отдельных участков генома может приводить как к супрессии, так и к активации генов в зависимости от локализации метилирования ДНК. В целом геном опухолевых клеток имеет тенденцию к гипометилированию наряду с гиперметилированием промоторов генов и специфических IGM-сайтов [54, 55].

Метилирование генома вируса папилломы

Многочисленные исследования позволяют предположить, что метилирование ДНК – один из важнейших регуляторных механизмов экспрессии генов HPV на различных стадиях вирусной инфекции: нормального вирусного цикла и вирусной трансформации.

Потенциальные мишени для ДНК-метилирования – CpG-динуклеотиды – недостаточно представлены в геноме вируса папиллом, что является эволюционным механизмом, выработанным вирусами для противодействия клеточному защитному механизму метилирования чужеродного генетического материала [56, 57]. Однако анализ распределения CpG-динуклеотидов и CpG-островков среди 92 различных типов HPV указывает на специфическую локализацию CpG в различных участках вирусного генома, таких как ранние и поздние гены, и на существующие различия между мукозальными и кожными HPVs и HR-HPV и LR-HPV [57]. Эти данные показывают возможные различия в чувствительности к метилированию различных типов HPV, отличающихся тропизмом и канцерогенным риском. Более того, детальное исследование сайтов связывания вирусного белка E2 среди 73 типов HPV демонстрирует существование очевидного давления эволюционного отбора, способствующего сохранению CpG-динуклеотидов в сайтах связывания E2 для всех типов HPV, что указывает на функциональную значимость метилирования этих сайтов для нормального вирусного цикла [58].

Первое доказательство того, что метилирование ДНК – важный регуляторный механизм, модулирующий HPV-экспрессию, было получено в экспериментах *in vitro*, демонстрирующих, что транскрипционная активность HPV 18-го типа URR подавляется метили-

рованием [59]. Позже было показано, что способность белка E2 связываться с консенсусным сайтом *in vitro* блокируется метилированием CpG-динуклеотидов [60]. Эти данные позволяют предположить, что метилирование препятствует регуляторной функции E2 за счет блокирования связывания с E2BS и изменяет транскрипцию ранних генов, включая вирусные онкогены E6 и E7 [61, 62].

Многочисленные исследования продемонстрировали увеличение метилирования специфических CpG в процессе прогрессии CIN [62–66]. Гиперметилирование определенных CpG-сайтов в последовательностях L1, L2 и E2/E4 HPV 16-го типа предлагают использовать как диагностический, так и прогностический маркеры прогрессии предраковых цервикальных поражений [67, 68]. Сходные результаты, полученные для других типов HPV (18, 31 и 45-го типов), указывают на то, что метилирование последовательностей L1 и L2 канцерогенных типов HPV является общим свойством, которое потенциально может быть использовано как диагностический маркер для детекции предраковых цервикальных поражений [67].

Эти данные позволяют предположить, что метилирование генома HPV может играть существенную роль в контроле вирусной транскрипции и репликации во время продуктивного вирусного цикла и неопластической трансформации.

В процессе поиска эпигенетических механизмов регуляции экспрессии и репликации эписомальной формы генома HPV было установлено, что паттерн метилирования HPV 16-го типа специфически меняется в жизненном цикле вируса в процессе дифференцировки плоскоклеточного эпителия, а также при трансформирующей инфекции (рис. 3) [69]. При трансформации эпителия было обнаружено существенное увеличение метилирования дистального (E2BS-1) и проксимальных (E2BS-3 и -4) сайтов связывания вирусного белка E2. В культуре клеток было подтверждено, что метилирование дистального сайта связывания E2 (E2BS-1) приводит к существенной активации раннего промотора и увеличению экспрессии вирусных онкогенов. При трансформирующей инфекции метилирование HPV 16-го типа URR (особенно метилирование E2BS-1, -3 и -4) зависит от статуса HPV [70].

Кроме того, на модели HPV 31-го типа было показано, что активация раннего и позднего промоторов зависит от изменения модификаций гистонов во время дифференцировки кератиноцитов [71].

Таким образом, участие не только генетических (мутационных), но и эпигенетических событий в нарушении экспрессии вирусных генов в канцерогенезе не вызывает сомнений.

Выявление механизмов дерегуляции вирусных онкогенов имеет значение не только для понимания механизмов канцерогенеза, но и для разработки диагностических и медикаментозных подходов в лечении

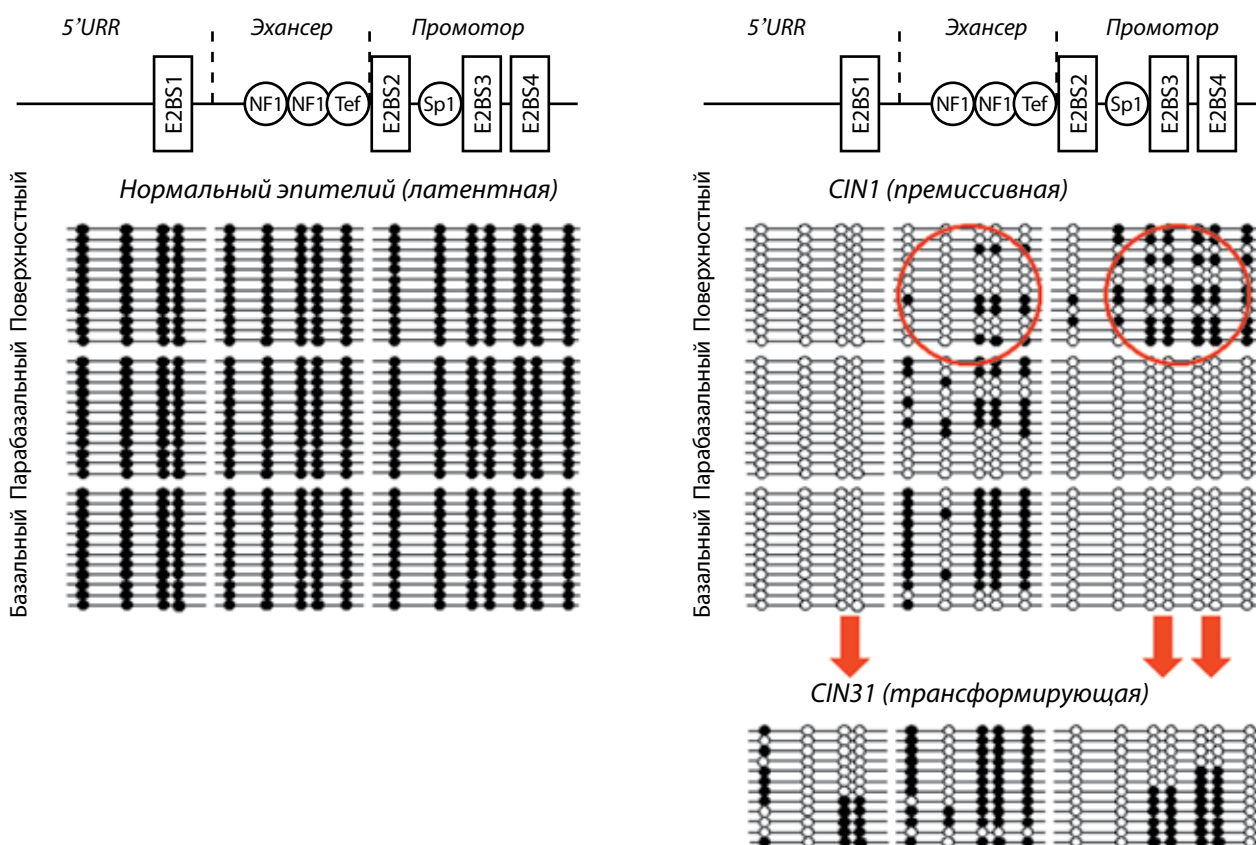


Рис. 3. Изменение паттерна метилирования во время латентной, продуктивной и трансформирующей инфекции [по 69]. Статус метилирования регуляторного участка HPV 16-го типа определяли методом бисульфитного секвенирования. Из микродиссецированного эпителия шейки матки с различной степенью дифференцировки: базальный (низкодифференцированный), парабазальный и поверхностный (терминально дифференцированный) были получены 12 клонов. В регуляторном участке HPV 16-го типа расположены 16 CpG-динуклеотидов. Белые и черные круги – неметилированные и метилированные CpG соответственно. При латентной инфекции все 16 CpG гиперметилированы независимо от степени дифференцировки эпителия. При пермиссивной инфекции паттерн метилирования существенно отличается от латентной инфекции. В низкодифференцированных базальных клетках эхансер частично метилирован, и в процессе дифференцировки происходит деметилирование вирусного эхансера. Вирусный промотор в базальных и парабазальных клетках неметилирован. В высокодифференцированных поверхностных слоях эпителия происходит гиперметилирование промотора, которое, возможно, связано с супрессией раннего промотора в поверхностных слоях эпителия. Процесс трансформации эпителия ассоциирован с метилированием 3 из 4 сайтов связывания вирусных регуляторных белков E2BS-1, -3 и -4, указанных красными стрелками

предопухолевых стадий развития рака шейки матки и других HPV-ассоциированных опухолей. В связи с этим перспективным и актуальным является изучение роли метилирования ДНК в регуляции генома HPV. Деметилирующие агенты могут стать новыми и сравнительно дешевыми препаратами для лечения интра-

эпителиальных неоплазий и профилактики развития рака шейки матки и других HPV-ассоциированных заболеваний.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 15-04-07769а.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bernard H. U., Burk R. D., Chen Z. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010;401(1):70–9.
- Munoz N., Bosch F. X., de Sanjose S. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348(6):518–27.
- Doorbar J., Egawa N., Griffin H. et al. Human papillomavirus molecular biology

- and disease association. *Rev Med Virol* 2015;25:2–23.
- Doorbar J., Quint W., Banks L. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012;30:55–70.
- 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 lines. *Virology* 2008;374(2):292–303.
- Goon P., Sonnex C., Jani P. et al. Recurrent respiratory papillomatosis: an overview of current thinking and treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;265(2):147–51.
- Howley P. M., Pfister H. J. Beta genus papillomaviruses and skin cancer. *Virology* 2015;479–480:290–6.

8. Howley P.M. Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2006;117:113–26.
9. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:690–8.
10. Chow L.T., Broker T.R., Steinberg B.M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS* 2010;118(6–7):422–49.
11. Schiller J.T., Day P.M., Kines R.C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* 2010;118:S12–7.
12. Doorbar J. Latent papillomavirus infections and their regulation. *Curr Opin Virol* 2013;3(4):416–21.
13. Doeberitz M., Vinokurova S. Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Arch Med Res* 2009;40(6):435–42.
14. Kajitani N., Satsuka A., Kawate A., Sakai H. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front Microbiol* 2012;3:152.
15. Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* 2009;384(2):375–9.
16. Demeret C., Desaintes C., Yaniv M., Thierry F. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol* 1997;71(12):9343–9.
17. Dostatni N., Lambert P.F., Sousa R. et al. 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.
18. Dong G., Broker T.R., Chow L.T. Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol* 1994;68(2):1115–27.
19. Rapp B., Pawellek A., Kraetzer F. 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;71:6956–66.
20. 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.
21. Hebner C.M., Laimins L.A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 2006;16(2):83–97.
22. Cheng S., Schmidt-Grimminger D.C., Murant T. et al. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* 1995;9(19):2335–49.
23. Bodily J., Laimins L.A. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol* 2011;19(1):33–9.
24. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005;32(Suppl 1):7–15.
25. Meyers C., Mayer T.J., Ozbun M.A. Synthesis of infectious human papillomavirus type 18 in differentiating epithelium transfected with viral DNA. *J Virol* 1997;71(10):7381–6.
26. Ozbun M.A., Meyers C. Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol* 1997;71(7):5161–72.
27. Gariglio P., Gutierrez J., Cortes E., Vázquez J. The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. *Arch Med Res* 2009;40(6):449–65.
28. Duensing A., Spardy N., Chatterjee P. et al. Centrosome overduplication, chromosomal instability, and human papillomavirus oncoproteins. *Environ Mol Mutagen* 2009;50(8):741–7.
29. Moody C.A., Laimins L.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010;10(8):550–60.
30. Pett M., Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 2007;212(4):356–67.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Samoylova E.V., Shaikhaiev G.O., Petrov S.V. et al. HPV infection in cervical-cancer cases in Russia. *Int J Cancer* 1995;61(3):337–41.
35. Arias-Pulido H., Peyton C.L., Joste N.E. et al. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 2006;44(5):1755–62.
36. Sano T., Oyama T., Kashiwabara K. et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998;153(6):1741–8.
37. Wentzensen N., von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers* 2007;23(4):315–30.
38. Klaes R., Friedrich T., Spitkovsky D. et al. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92(2):276–84.
39. Bird A. DNA methylation de novo. *Science* 1999;286(5448):2287–8.
40. Bird A.P. The relationship of DNA methylation to cancer. *Cancer Surv* 1996;28:87–101.
41. Boyes J., Bird A. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 1991;64:1123–34.
42. Kass S.U., Pruss D., Wolffe A.P. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 1997;13:444–9.
43. Siegfried Z., Eden S., Mendelsohn M. et al. DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet* 1999;22(2):203–6.
44. Shiota K. DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals. *Cytogenet Genome Res* 2004;105(2–4):325–34.
45. Lund A.H., van Lohuizen M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 2004;18(19):2315–35.
46. Baylin S.B., Ohm J.E. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006;6(2):107–16.
47. Shenker N., Flanagan J.M. Intragenic DNA methylation: implications of this epigenetic mechanism for cancer research. *Br J Cancer* 2012;106(2):248–53.
48. Maunakea A.K., Nagarajan R.P., Bilenky M. et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 2010;466(7303):253–7.
49. Lorincz M.C., Dickerson D.R., Schmitt M., Groudine M. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11(11):1068–75.
50. Choi J.K., Bae J.B., Lyu J. et al. Nucleosome deposition and DNA methylation at coding region boundaries. *Genome Biol* 2009;10(9):R89.
51. Diniz S.N., Pendelowski K.P., Morgun A. et al. Tissue-specific expression of IL-15RA alternative splicing transcripts and its regulation by DNA methylation. *Eur Cytokine Netw* 2010;21(4):308–18.
52. Oberdoerffer S. A conserved role for intragenic DNA methylation in alternative pre-mRNA splicing. *Transcription* 2012;3(3):106–9.
53. Shukla S., Kavak E., Gregory M. et al. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* 2011;479(7371):74–9.
54. Salem C., Liang G., Tsai Y.C. et al. Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer. *Cancer Res* 2000;60(9):2473–6.
55. Smith I.M., Mydlarz W.K., Mithani S.K., Califano J.A. DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage. *Int J Cancer* 2007;121(8):1724–8.
56. Karlin S., Doerfler W., Cardon L.R. Why is CpG suppressed in the genomes

- of virtually all small eukaryotic viruses but not in those of large eukaryotic viruses? *J Virol* 1994;68(5):2889–97.
57. Galvan S.C., Martinez-Salazar M., Galvan V.M. et al. Analysis of CpG methylation sites and CGI among human papillomavirus DNA genomes. *BMC Genomics* 2011;12:580.
58. Sanchez I.E., Dellarole M., Gaston K., de Prat Gay G. 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.
59. Rosl F., Arab A., Klevenz B. et al. The effect of DNA methylation on gene regulation of human papillomaviruses. *J Gen Virol* 1993;74(Pt 5):791–801.
60. Thain A., Jenkins O., Clarke A.R., Gaston K. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *J Virol* 1996;70(10):7233–5.
61. 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.
62. 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(3):438–51.
63. Bhattacharjee B., Sengupta S. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology* 2006;354(2):280–5.
64. Brandsma J.L., Sun Y., Lizardi P.M. et al. Distinct human papillomavirus type 16 methylomes in cervical cells at different stages of premalignancy. *Virology* 2009;389(1–2):100–7.
65. 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.
66. Kalantari M., Chase D.M., Tewari K.S., Bernard H.U. Recombination of human papillomavirus-16 and host DNA in exfoliated cervical cells: a pilot study of *L1* gene methylation and chromosomal integration as biomarkers of carcinogenic progression. *J Med Virol* 2010;82(2):311–20.
67. Mirabello L., Schiffman M., Ghosh A. et al. Elevated methylation of HPV 16 DNA is associated with the development of high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2013;132(6):1412–22.
68. Mirabello L., Sun C., Ghosh A. et al. Methylation of human papillomavirus type 16 genome and risk of cervical precancer in a Costa Rican population. *J Natl Cancer Inst* 2012;104(7):556–65.
69. 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.
70. Chaiwongkot A., Vinokurova S., Pientong C. 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.
71. Wooldridge T.R., Laimins L.A. 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.