
ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**НАУЧНАЯ СТАТЬЯ**DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-108>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Идентификация регуляторных некодирующих РНК вируса папилломы человека типа 16 (*Papillomaviridae: Alpharapillomavirus: Human papillomavirus*) в опухолях шейки матки

Киселева Н.П., Федорова М.Д., Заикина А.Э., Елкина Н.В., Голдобина Е.Е*, Елкин Д.С., Абрамов П.М., Павлова Л.С., Винокурова С.В.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия

Введение. Вирусы папилломы человека высокого канцерогенного риска признаны этиологическими агентами рака шейки матки. Постоянная экспрессия вирусных онкобелков E6 и E7 необходима для поддержания злокачественного фенотипа опухолевых клеток. Точный механизм регуляции экспрессии вирусных онкогенов в опухолевых клетках до конца не выяснен.

Цель работы – идентификация вирусных некодирующих РНК (нкРНК) при ВПЧ16-положительном раке шейки матки.

Материалы и методы. Для обнаружения вирусных нкРНК в ВПЧ16-положительных первичных плоскоклеточных карциномах шейки матки и клеточных линиях SiHa и Caski использовали полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией. Для выяснения функций нкРНК использовали метод нокадауна с олигонуклеотидами, комплементарными нкРНК.

Результаты. Мы идентифицировали нкРНК, транскрибируемые в регуляторной области ВПЧ16, в клеточных линиях и в 32 из 32 плоскоклеточных карцином шейки матки с эписомальной или интегративной формами вирусной ДНК. Нокадаун смысловых или антисмысловых цепей нкРНК приводит к снижению или увеличению уровней мРНК онкогенов E6 и E7 в клетках, соответственно. Эти изменения уровней мРНК онкогенов сопровождаются модуляцией уровня белка p53, основной мишени онкобелка E6.

Заключение. Присутствие впервые выявленных регуляторных нкРНК во всех исследованных опухолях и клеточных линиях свидетельствует об их необходимости для поддержания в них постоянной экспрессии онкогенов E6 и E7. Полученные данные могут быть полезны для понимания фундаментальных аспектов регуляции экспрессии вируса в ВПЧ16-позитивных опухолях.

Ключевые слова: вирусы папиллом человека; вирусные некодирующие РНК; рак шейки матки

Для цитирования: Киселева Н.П., Федорова М.Д., Заикина А.Э., Елкина Н.В., Голдобина Е.Е., Елкин Д.С., Абрамов П.М., Павлова Л.С., Винокурова С.В. Идентификация регуляторных некодирующих РНК вируса папилломы человека типа 16 (*Papillomaviridae: Alpharapillomavirus: Human papillomavirus 16*) в опухолях шейки матки. *Вопросы вирусологии.* 2022; 66(3): 217–225. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-108>

Для корреспонденции: Киселева Наталья Петровна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии вирусов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия. E-mail: natalia-kis@yandex.ru

Участие авторов: Киселева Н.П. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Федорова М.Д. – проведение экспериментов, контроль, анализ и представление данных; Заикина А.Э., Елкина Н.В., Голдобина Е.Е., Елкин Д.С., Абрамов П.М. – проведение экспериментов; Павлова Л.С. – сбор клинического материала, анализ историй болезни; Винокурова С.В. – обсуждение и интерпретация результатов, консультативная помощь, редактирование текста, утверждение окончательной версии статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет Государственного бюджета и поддержано грантом РФФИ (грант 15-15-00125).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Протокол от 27.01.2022.).

Поступила 04.03.2022
Принята в печать 17.05.2022
Опубликована 30.06.2022

*Настоящий адрес: Gut Phageomics, Lab APC Microbiome Ireland, University College Cork, Ireland

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-108>

Identification regulatory noncoding RNAs of human papilloma virus type 16 (*Papillomaviridae: Alphapapillomavirus: Human papillomavirus*) in cervical tumors

Natalia P. Kisseljova, Maria D. Fedorova, Anastasia E. Zaikina, Nadezhda V. Elkina, Ekaterina E. Goldobina*, Danila S. Elkin, Pavel M. Abramov, Larisa S. Pavlova, Svetlana V. Vinokurova

FSBI «National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin» of the Ministry of Health of Russia, 115478, Moscow, Russia

Introduction. High carcinogenic-risk human papillomaviruses (hrHPVs) are recognized as etiological agents of cervical cancer. Constant expression of the viral oncoproteins, E6 and E7, is required for maintenance of the malignant phenotype of tumor cells. The exact mechanism of regulation of viral oncogenes expression in tumor cells is not fully elucidated.

The **purpose:** identification of viral noncoding RNAs (ncRNAs) in HPV16-positive cervical cancer.

Materials and methods. The reverse transcription polymerase chain reactions were used to detect viral ncRNAs in HPV16-positive primary cervical squamous cell carcinomas and SiHa and CasKi cell lines. The knockdown technique with oligonucleotides complementary to ncRNAs was used to elucidate their functions.

Results. We have identified ncRNAs transcribed in the upstream regulatory region of HPV16 in the cervical carcinoma cell lines and in 32 out of 32 cervical squamous cell carcinomas with episomal or integrated forms of HPV16 DNA. Knockdown of sense or antisense strains of ncRNAs by oligonucleotides results in a decrease or increase of the E6 and E7 oncogenes mRNA levels in cells, respectively. These changes of oncogenes mRNA levels are accompanied by the modulation of the levels of the p53 protein, the main target of the E6 oncoprotein.

Conclusion. The presence of regulatory ncRNAs in all examined tumors and cell lines revealed for the first time indicates their necessity for maintenance of constant expression of E6 and E7 oncogenes in them. The findings can be useful for understanding of the fundamental aspects of the viral expression regulation in HPV16-positive tumors.

Keywords: *human papillomaviruses; viral noncoding RNA; cervical cancer*

For citation: Kisseljova N.P., Fedorova M.D., Zaikina A.E., Elkina N.V., Goldobina E.E., Danila S. Elkin, Abramov P.M., Pavlova L.S., Vinokurova S.V. Identification regulatory noncoding RNAs of human papilloma virus type 16 (*Papillomaviridae: Alphapapillomavirus: Human papillomavirus*) in cervical tumors. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 66(3): 217–225. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-108>

For correspondence: Kisseljova N.P., PhD. Sci. (Biol.), principal researcher of Laboratory of Molecular Biology of viruses, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russian Federation, 115478, Moscow, Russia. E-mail: natalia-kis@yandex.ru

Information about the authors:

Kisseljova N.P., <https://orcid.org/0000-0003-0236-4548>

Fedorova M.D., <https://orcid.org/0000-0002-8813-7516>

Zaikina A.E., <https://orcid.org/0000-0002-7439-4212>

Elkina N.V., <https://orcid.org/0000-0002-0503-6016>

Goldobina E.E., <https://orcid.org/0000-0003-4036-3415>

Elkin D.S., <https://orcid.org/0000-0002-4793-6063>

Abramov P.M., <https://orcid.org/0000-0002-7995-3490>

Pavlova L.S., <https://orcid.org/0000-0003-3993-4823>

Vinokurova S.V., <https://orcid.org/0000-0003-1615-3928>

Contribution. Kisseljova N.P. – research concept and design, experiments, data analysis and interpretation, writing – original draft; Fedorova M.D. – experiments, monitoring, analyzing and presenting data; Zaikina A.E., Elkina N.V., Goldobina E.E., Elkin D.S., Abramov P.M. – experiments; Pavlova L.S. – collection of clinical material, analysis of case histories; Vinokurova S.V. – supervision, writing – review & editing.

Funding. This work was funded by the State budget and was supported by Russian Scientific Foundation (grant 15-15-00125).

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

Ethics approval. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the FSBI N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russian Federation (Protocol dated 27.01.2022).

Received 04 March 2022

Accepted 17 May 2022

Published 30 June 2022

*Present address: Gut Phageomics, Lab APC Microbiome Ireland, University College Cork, Ireland.

Введение

Инфекция, вызываемая вирусами папилломы человека (ВПЧ), является одной из наиболее распространенных в мире [1]. К злокачественным опухолям, этиологическими агентами которых признаны ВПЧ высокого канцерогенного риска (врВПЧ), относятся большинство опухолей шейки матки, часть опухолей влагалища, вульвы, ануса, пениса и ротоглотки. При этом около 70% ВПЧ-ассоциированных опухолей вызываются врВПЧ типов 16, 18 [2, 3].

Рак шейки матки (РШМ) более чем в 95% случаев имеет вирусную этиологию и является второй по частоте причиной смерти женщин в мире [3]. Несмотря на то что в настоящее время сертифицировано несколько вакцин, предотвращающих инфицирование ВПЧ, изучение ВПЧ остается актуальной задачей по следующим обстоятельствам: 1) существующие вакцины разработаны не против всех типов ВПЧ; 2) вакцины предотвращают инфицирование ВПЧ, но не являются лечебными для инфицированных пациентов и носителей опухолей; 3) отсутствуют эффективные медикаментозные методы лечения ВПЧ-инфекции, избавление от которой является основой профилактики ВПЧ-ассоциированных опухолей.

Геном ВПЧ представлен кольцевой двухцепочечной ДНК. ДНК кодирует ранние (*E*) и поздние (*L*) гены, порядок и уровень экспрессии которых строго регулируется в продуктивном жизненном цикле вируса. Белковые продукты двух генов *E6* и *E7*, взаимодействующие с регуляторами клеточного цикла, играют ключевую роль в обеспечении амплификации вирусных геномов в дифференцирующихся эпителиальных клетках и в дерегуляции клеточного цикла при злокачественной трансформации [4]. В первичных культурах клеток карцином шейки матки и клеточных линиях показано, что для пролиферации и поддержания трансформированного фенотипа клеток необходима постоянная экспрессия в них онкогенов *E6* и *E7*. Подавление экспрессии *E6* и *E7* различными методами приводит к старению клеток и/или активации апоптоза [5–8]. В связи с этим изучение механизмов регуляции экспрессии онкогенов *E6* и *E7* важно для понимания механизмов злокачественной трансформации и поиска мишеней противоопухолевой терапии.

В настоящее время известно, что до 99% генома млекопитающих транскрибируется в различных клетках с образованием коротких и длинных некодирующих РНК (нкРНК), не имеющих открытых рамок считывания. Помимо хорошо известных нкРНК «домашнего хозяйства» (транспортных РНК, рибосомных РНК, теломеразной РНК и др.), идентифицированы регуляторные нкРНК, участвующие в регуляции различных клеточных процессов, включая эпигенетический контроль, транскрипцию и трансляцию генов [9]. Поскольку вирусы используют клеточные системы для транскрипции, процессинга и функционирования их мРНК, очевидно, что могут существовать и вирусные нкРНК. Это предположение в настоящее время подтверждено для двух онкогенных вирусов: вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) (*Herpesviri-*

dae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4) и вируса саркомы Капоши (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Rhadinovirus: Human gammaherpesvirus 8*). Вирусные нкРНК транскрибируются с промоторов полимераз III или II, некоторые из них могут быть полиаденилированы [10, 11]. нкРНК играют важную роль в регуляции транскрипции вирусных генов в жизненных циклах этих вирусов и патогенезе вызываемых ими заболеваний (включая злокачественные новообразования).

В настоящей работе смысловые и антисмысловые транскрипты, перекрывающие более 600 п.н. регуляторной области ВПЧ16 URR (от англ. upstream regulatory region), были идентифицированы в клеточных линиях карцином шейки матки и первичных опухолях. Эти транскрипты принимают участие в регуляции экспрессии онкогенов *E6* и *E7*. Данные о том, что вирусные нкРНК присутствуют в врВПЧ-ассоциированных опухолях, в литературе отсутствуют.

Материалы и методы

Клинический материал

Образцы плоскоклеточных карцином (ПКК) шейки матки были получены от больных НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в патологоанатомическом отделении, согласно правилам этического комитета центра. Физический статус генома ВПЧ16 был определен с помощью метода АРОТ (от англ. amplification of papillomavirus oncogene transcripts), позволяющего определить, с какого типа генома (интегрированного или эписомального) был считан транскрипт ранних генов ВПЧ. Наличие эписом ВПЧ16 в образцах было подтверждено методом ПЦР ДНК с использованием праймеров, специфичных для полноразмерных генов *E1* и *E2* [12,13].

Клеточные линии

Клеточные линии РШМ человека SiHa и CasKi (American Type Culture Collection, Rockville, MD) культивировали в среде DMEM с 10% эмбриональной бычьей сывороткой, пенициллином, стрептомицином и L-глутамином, в CO₂-инкубаторе при 5% концентрации CO₂ и температуре 37°C. Клетки SiHa содержат геном врВПЧ16, интегрированный в геном клетки (2 копии на 1 клетку) [14]. Клетки CasKi содержат более 600 копий генома врВПЧ16, интегрированных в 11 сайтов разных хромосом в виде тандемных повторов «голова к хвосту» [15].

Выделение РНК

Выделение тотальной РНК из замороженных опухолевых тканей проводили набором PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу фирмы. Концентрацию тотальной РНК определяли по РНК-специфичной флуоресценции на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США).

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Для устранения возможного загрязнения ДНК тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (Deoxyribonuclease I

Amplification Grade, Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями поставщика. РНК подвергали обратной транскрипции (ОТ-реакция) с использованием случайных гексапраймеров (Litex, РФ) или Random₍₁₀₎ (Evrogen, РФ) и обратной транскриптазы (Super Script III RT, Invitrogen, США) согласно протоколу производителей. Для контроля полноты удаления ДНК параллельно проводили реакцию без добавления обратной транскриптазы для каждого образца РНК. Для анализа направления транскрипции ОТ-реакцию проводили с праймерами, специфичными к 1) смысловой цепи О1-5' (7452 п.н.) GGT TGA AGC TAC AAA ATG G; O2-5' (7617 п.н.) AGT GCA GTG TAA AAA ACA ATG G и 2) к антисмысловой цепи П1 – 5' (6997 п.н.) AGT TTT CTG CAG ACC TAG ATC AG; П2-5' (7340 п.н.) CCT ACT AAT TGT GTT GTG GTT A. Положения праймеров здесь и далее указаны согласно HPV16 AF125673 (GenBank). Для контроля на самопраймирование РНК (способность Отаз инициировать синтез кДНК в отсутствие экзогенных праймеров с двухцепочечной структуры РНК, образующейся на 3'-конце [16]) одновременно проводили реакцию без добавления праймеров. В случае обнаружения самопраймирования РНК для предотвращения амплификации такой кДНК в ПЦР использовали сиквенс-специфичный праймер с адаптером на 5'-конце (3'TGCTACAGCTGAGCTCAGG 5') в ОТ-реакции и адаптер в качестве обратного праймера в ПЦР.

Качество и количество кДНК оценивали с помощью ПЦР с праймерами к «генам домашнего хозяйства»: *HPRT* F-5'CTGGATTACATCAAAGCACTG, R-5'GGATTATACTGCCTGACCAAG (T_{отж} 60°C); *β-глобин* F-5'GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG, R-5'CCACTTCATCCACGTTTACC (T_{отж} 55°C). Состав праймеров, специфичных для ВПЧ, для всех областей URR и условия ПЦР доступны по запросу. Вирус-специфические продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле, очищали и секвенировали для подтверждения их идентичности.

Определение количества копий нкРНК

Количество копий транскриптов ВПЧ16 в двух районах (URR 7340-7452 п.н. и ранние гены (99-226 п.н.) определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием кДНК, синтезированной со случайными праймерами, и следующими праймерами и зондами для ПЦР: для URR 7340-7452 п.н. F-5'ССТАСТААТТГТГТТГТГГТТА,

R-5'GGTTGAAGЦТАААААТGG, зонд TaqMan

FAM-АСТАТАТТТГСТАСАТСТГТТТТТГТ-ВНQ1, T_{отж} 54°C;

для области ранних генов ВПЧ 99-226 п.н., F-5'CTG СААТГТТТСAGGACCCAC 3',

R-5'CTCCACGTCGCAGTAACTGTTG 3', зонд TaqMan FAM-АСТТГТАСГТТТСТГСТТГСАТ-ВНQ1, T_{отж} 63°C.

Копийность двух типов транскриптов в образце определяли в трехкратной повторности с использованием стандартных кривых, построенных для каждого опыта с серийными разведениями ДНК клеток SiHa

(2 копии генома ВПЧ16 на 1 клетку) [14]. Количество ВПЧ16-специфических копий рассчитывали на 1 нг исходной тотальной РНК.

Трансфекция клеток олигонуклеотидами

Олигонуклеотиды (ОН) трансфицировали липидным реагентом Silent-Fect (Bio-Rad Laboratories, США) по протоколу, предложенному производителем, в течение 48 ч. Известно, что ОН эффективно функционируют через эндогенные пути РНК-интерференции [17]. Коктейли из 4 ОН, комплементарных смысловой или антисмысловой цепям, трансфицировали по отдельности в трех независимых экспериментах по 3 повтора в каждом из них. Нуклеотидные последовательности и позиции ОН в геноме ВПЧ16:

7331s 5'GUUUCAACACCUACUAAUUGU;

7331as 5'ACAAUUAGUAGGUGUUGAAAC;

7548s 5'AUGCGUGCCAAAUCUUGUUU;

7548as 5'AAACAGGGAUUUGGCACGCAU;

7500s 5'GUUCUAUGUCAGCAACUUAU;

7500as 5'UAUAGUUGCUGACAUAGAAC;

7583s 5'GCUUGCCAACCAUCCAUUGUU;

7583as 5'AACAAUGGAAUGGUUGGCAAGC;

s – ОН является копией смысловой цепи, as – ОН является копией антисмысловой цепи.

Вестерн-блот

Белки экстрагировали буфером RIPA, содержащим коктейль ингибиторов протеаз без ЭДТА (Roche, Германия). Белковые лизаты анализировали в 7% гелях (SDS/PAGE) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-ECL (GE Healthcare/Life Sciences, США) с использованием Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США). Мембрану блокировали 5% обезжиренным молоком в буфере TBST в течение 1 ч при комнатной температуре, инкубировали с моноклональными антителами к p53 в титре 1:200 (DO-1, MA5-12571, ThermoFisher Scientific, США) или с антителами к GAPDH для контроля нагрузки (GA1R, MA5-15738, ThermoFisher Scientific, США) в титре 1:5000 при 4°C в течение ночи, а затем обрабатывали вторичными козьими антителами к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена (Bio-Rad, США) в титре 1:5000 в течение 2 ч. Белковые полосы визуализировали с помощью Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

Анализ РНК, транскрибируемых в URR ВПЧ16. Поиск нкРНК осуществляли методом ОТ-ПЦР в регуляторной области URR (рис. 1 а). URR содержит промотор ранних генов, энхансер, точку начала репликации, сайт полиаденилирования поздних генов, сайты узнавания как клеточных, так и вирусных факторов транскрипции и не содержит открытых рамок считывания для белков [18]. Для поиска потенциальных нкРНК мы использовали две клеточные линии карцином шейки матки шейки матки SiHa и CasKi, которые содержат ДНК ВПЧ16, интегрированные

в клеточный геном [14, 15]. Учитывая, что количество копий известных нкРНК на клетку намного меньше, чем у мРНК, и не все из них имеют сигнал полиаденилирования, для синтеза кДНК в этих экспериментах использовали не олиго-dT-праймеры, а случайные праймеры [19].

После получения кДНК с тотальной РНК в ОТ-реакции проводили серию ПЦР с таким расчетом, чтобы продукты ПЦР перекрывали весь район URR и часть прилегающих к нему рамок

считывания для позднего гена L1 и ранних генов (в том числе E6 и E7). Продукты ПЦР были обнаружены на всем протяжении URR (рис. 1 б, в). Результаты указывают на существование транскриптов в этой области ВПЧ16 в обеих клеточных линиях. Обнаруженные транскрипты физически не связаны с мРНК ранних генов, о чем свидетельствует отсутствие продуктов ПЦР в районе 7889-172 п.н. Таким образом, транскрипты были обнаружены в URR ВПЧ16.

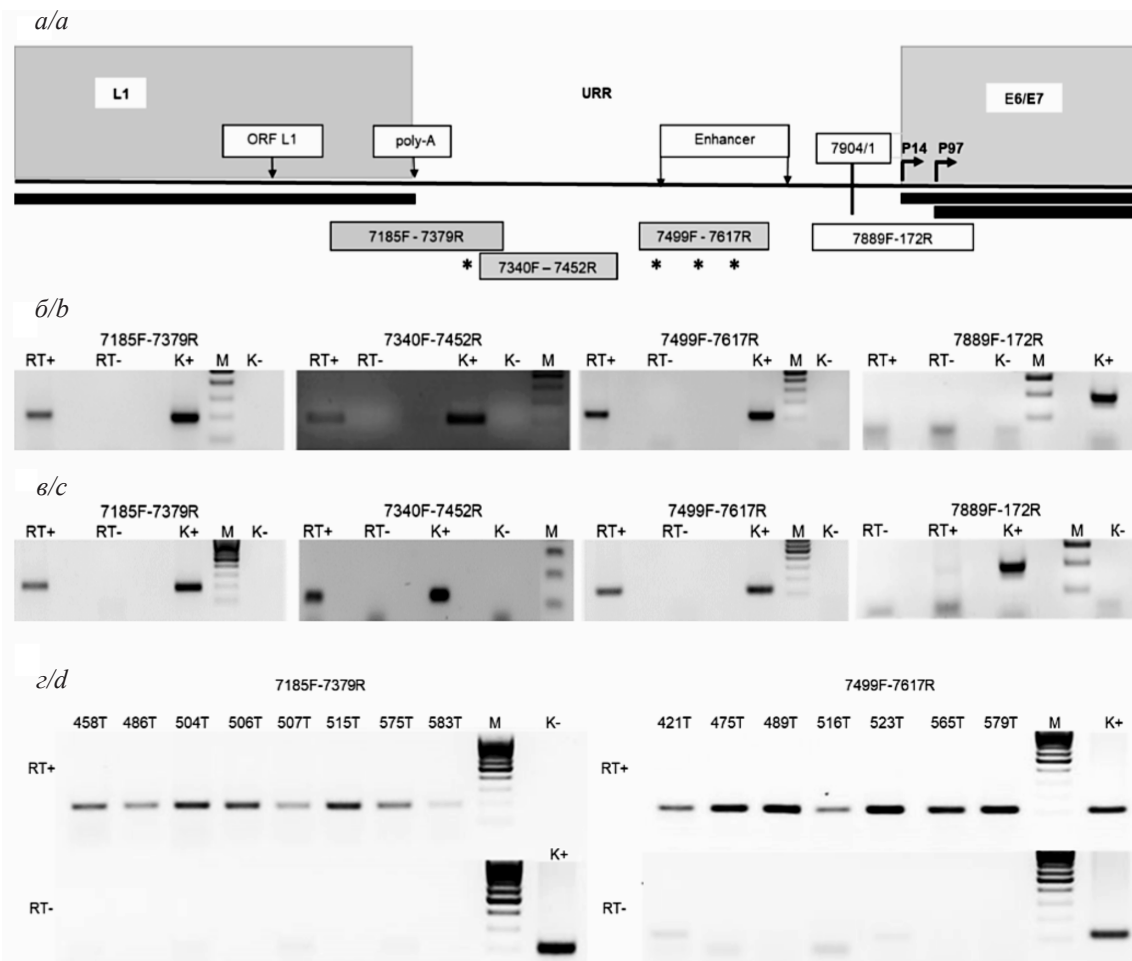


Рис. 1. Анализ транскрипции в районе URR ВПЧ16 методом ОТ-ПЦР. *a*: сплошная линия – схема URR ВПЧ16, расположенного между поздним геном *L1* и ранними генами *E6/E7*; позиции олигонуклеотидов, использованных для нокдауна нкРНК, обозначены звёздочками; изогнутые стрелки – старты транскрипции ранних генов [13]; вертикальная черта – точка начала (1 п.н.) и конца отсчёта (7904 п.н.) нуклеотидов в кольцевом геноме ВПЧ16; ORF L1 – конец рамки считывания вирусного белка L1; polyA – сигнал полиаденилирования РНК поздних генов; чёрные прямоугольники под сплошной линией – транскрипты поздних и ранних генов; серые прямоугольники – продукты ОТ-ПЦР обнаружены; белые прямоугольники – продукты ОТ-ПЦР отсутствуют; цифры внутри прямоугольников – позиции прямого (F) и обратного (R) праймеров (п.н.) согласно сиквенсу ВПЧ16 AF125673 (GenBank); *b-d* – электрофореграммы продуктов ПЦР: *b* – клетки SiHa; *c* – клетки опухоли шейки матки. [RT+] и [RT-] – синтез кДНК проведён в присутствии и отсутствии обратной транскриптазы соответственно; [K+] – ПЦР с ДНК ВПЧ16 (положительный контроль ПЦР); [K-] – H₂O вместо ДНК-матрицы (контроль на контаминацию реактивов ПЦР); M – маркер, 100 п.н.

Fig. 1. Analysis of transcription in the HPV 16 URR by RT-PCR. *a*: solid line – scheme of the HPV16 URR, located between the late gene *L1* and the early genes *E6/E7*; the positions of the oligonucleotides used for knockdown ncRNAs are marked with asterisks; broken arrows – the start of transcription of early genes [13]; vertical line – the beginning (1 bp) and end (7,904 bp) points of the nucleotide count in the HPV16 circular genome; ORF L1 – the end of the open reading frame of the L1 viral protein; polyA – the signal of polyadenylation of late genes. The black rectangles under solid line – transcripts of early and late genes; gray rectangles – RT-PCR products were detected; white rectangles – RT-PCR products were absent; the numbers inside the rectangles – the positions of forward (F) and reverse (R) primers (bp) according to the HPV16 AF125673 (GenBank) sequence; *b-d* – electrophoregrams of PCR products: *b* – SiHa cells; *c* – cervical tumors. [RT+] and [RT-] – cDNA synthesis was performed in the presence and absence of reverse transcriptase, respectively; [K+] – PCR with HPV16 DNA (positive control for PCR); [K-] – H₂O instead of the DNA (control for contamination of PCR reagents); M – 100 bp ladder.

Анализ направления транскрипции в URR

URR ВПЧ16 содержит энхансер (в позиции 7529–7752 п.н.) [20]. Известно, что для ряда энхансеров характерна транскрипция нкРНК в двух направлениях [21]. В связи с этим исследовали направление транскрипции в URR в клетках SiHa. Синтез кДНК для этой цели проводили с вирус-специфическими праймерами, комплементарными к смысловой или антисмысловой цепям ДНК. Праймеры были расположены в двух разных областях URR для повышения чувствительности анализа, учитывая низкое число

копий предполагаемых нкРНК (рис. 2). Как следует из результатов, представленных на рис. 2 б и в, в URR от 6997 до 7617 п.н. присутствуют как смысловые, так и антисмысловые транскрипты.

Из полученных результатов следует, что старт транскрипции смысловой цепи – располагается между 6947 и 6997 п.н., а для антисмысловой цепи между 7617 и 7709 п.н. Длина транскриптов, таким образом, составляет не менее 620 п.н., и, следовательно, эти нкРНК можно отнести к категории длинных нкРНК. Эти данные подтверждают отсутствие физической

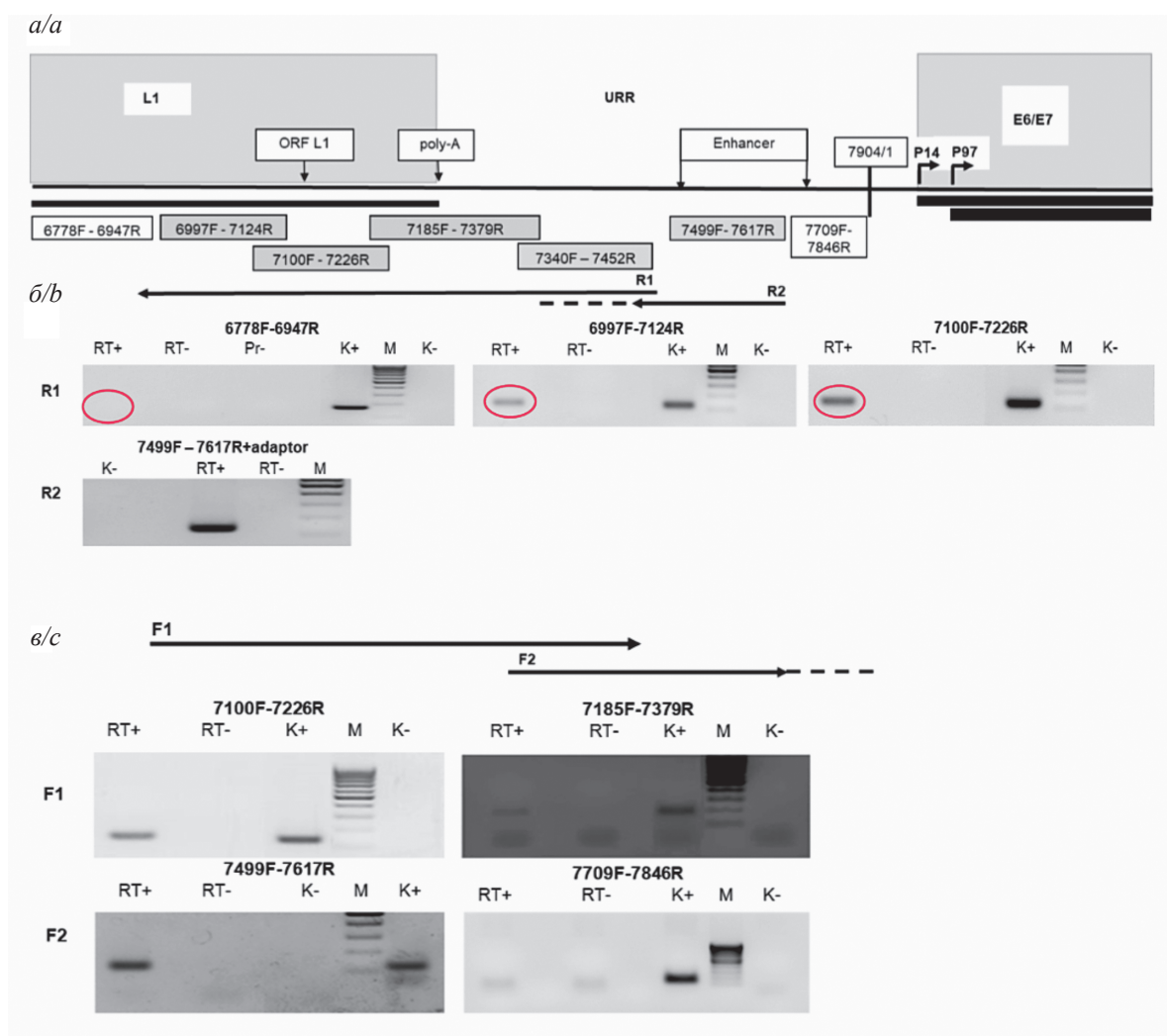


Рис. 2. Анализ направления транскрипции в URR ВПЧ16 методом ОТ-ПЦР в клетках SiHa. *a*: сплошная линия – схема URR ВПЧ16, обозначения как в подписи к рис. 1, *a*. F1, F2 и R1, R2 – генспецифические праймеры для синтеза кДНК с антисмысловой и смысловой цепей соответственно; *б*, *в* – анализ продуктов ОТ-ПЦР методом электрофореза в агарозном геле. [RT+] и [RT–] – синтез кДНК проведён в присутствии и отсутствии обратной транскриптазы соответственно; [K+] – ПЦР с ДНК SiHa (положительный контроль ПЦР); [K–] – H₂O вместо ДНК-матрицы (контроль на контаминацию реактивов ПЦР); [Pr–] – ПЦР без праймеров (контроль на самопраймирование РНК), адаптор – см. раздел «Материалы и методы»; цифры – позиции всех элементов в п.н. согласно сиквенсу ВПЧ16 AF125673 (GenBank); M – маркер, 100 п.н. Овал указывает позицию продукта ПЦР в геле.

Fig. 2. Analysis of the transcription direction in the HPV16 URR of SiHa cells by RT-PCR. *a*: the solid line is a scheme of the HPV16 URR, designations like in legend of Fig. 1 *a*. F1, F2 and R1, R2 are gene-specific primers for cDNA synthesis on the *antisense* and *sense* chains, respectively; *b*, *c* – analysis of the products of RT-PCR by electrophoresis in agarose gel. [RT+] and [RT–] – cDNA synthesis was performed in the presence and absence of reverse transcriptase, respectively; [K+] – PCR with DNA of SiHa (positive control for PCR); [K–] – H₂O instead of cDNA (control for contamination of PCR reagents); [Pr–] – cDNA synthesis was performed without primers (control for RNA self-priming), adaptor – see «Material and methods»; numbers are the positions of all elements (bp) according to the HPV16 AF125673 (GenBank) sequence; M – marker, 100 bp ladder. The oval indicates the position of the PCR product in the gel.

связи транскриптов как с мРНК позднего гена L1, так и с мРНК ранних генов. Таким образом, показана двунаправленная транскрипция в районе URR ВПЧ16.

Регуляция экспрессии ранних генов ВПЧ16 длинными некодирующими РНК

Для выяснения функций нкРНК использовали метод «нокдауна» – подавление транскриптов на посттранскрипционном уровне с помощью трансфекции в клетки SiHa ОН, комплементарных к смысловой и антисмысловой цепям нкРНК [17]. Позиции ОН, используемых для нокдауна нкРНК, отмечены звездочками на рис. 1 а. Результаты экспериментов представлены на рис. 3. Во-первых, достоверное снижение общего уровня некодирующих РНК на 40–50% было определено в клетках SiHa после транзientной трансфекции коктейлями ОН, комплементарными каждой из цепей (рис. 3 в; $p = 0,0001–0,0009$).

После этого определены уровни мРНК ранних генов (рис. 3 а, б). Трансфекция ОН, комплементарных антисмысловым транскриптам, привела к статистически значимому увеличению числа транскриптов E6/E7 в клетках ($p = 0,03$). Это позволяет предполагать, что антисмысловой транскрипт URR является негативным регулятором уровня мРНК ранних генов. При трансфекции в клетки комплементарных смысловому транскрипту ОН выявлено снижение уровня транскриптов E6/E7, т.е., вероятно, смысловой транскрипт, в свою очередь, выступает в качестве позитивного регулятора экспрессии ранних генов.

Таким образом, показано, что нкРНК, транскрибируемые в области URR, принимают участие в регуляции уровня мРНК ранних генов ВПЧ16 (в т.ч. онкогенов E6 и E7).

Затем, чтобы подтвердить, что нокдаун нкРНК с помощью ОН приводит не только к изменению экспрессии, но также влияет на активность вирусных онко-

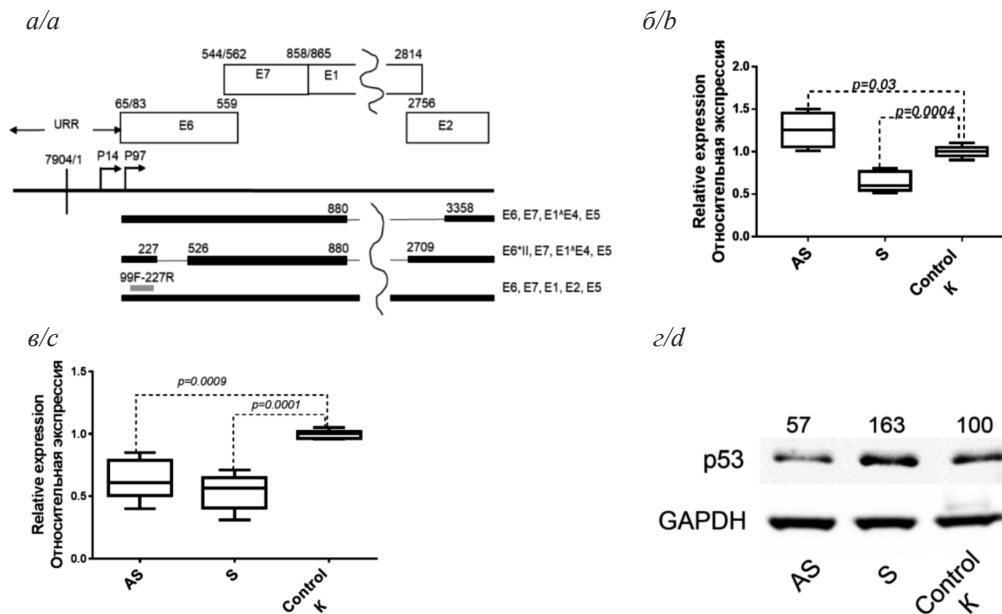


Рис. 3. Влияние нокдауна нкРНК на уровень мРНК и активность ранних генов ВПЧ16 в клетках SiHa. *a*: сплошная линия – схема участка генома ВПЧ16 с ранними генами (обозначения как в подписи к рис. 1); варианты сплайсинга мРНК обозначены жирной чертой для экзонов, тонкой чертой для интронов, справа обозначен кодирующий потенциал каждого варианта; малый серый прямоугольник – позиция исследуемого района мРНК; цифры – позиции всех элементов в п.н. согласно сиквенсу ВПЧ16 AF125673 (GenBank); S – трансфекция коктейлями олигонуклеотидов, комплементарными к смысловой цепи нкРНК; AS – трансфекция коктейлями олигонуклеотидов, комплементарными к антисмысловой цепи нкРНК; K – трансфекция без добавления олигонуклеотидов, кДНК синтезирована с гексапраймерами; *б*, *в* – на оси ординат указаны уровни РНК ВПЧ16, нормализованные по отношению к мРНК гена *HPRT*; *б* – уровень мРНК суммарного транскрипта ранних генов; *в* – уровень нкРНК. Статистическая обработка данных проведена в программе GraphPad Prism v.7.00 с помощью парного t-теста; *г* – анализ экспрессии p53 методом вестерн-блоттинга. Представлен типичный результат трансфекции. GAPDH – контроль белковой нагрузки; цифры над блотом – нормализованные уровни белка p53 по отношению к контролю в процентах (рассчитано по программе Image Studio Lite v.5.2.).

Fig. 3. Effect of ncRNA knockdown on the expression and activity of early HPV 16 genes in SiHa cells. *a*: the solid line is a scheme of the HPV16 early genes region (designations like in legend of Fig. 1); mRNA splicing variants are indicated by a bold line for exons and a thin line for introns, the coding potential of each variant is indicated on the right; the small gray rectangle – the position of examined mRNA region; numbers are the positions of all elements (bp) according to the HPV16 AF125673 (GenBank) sequence; S – transfection with the cocktail of oligonucleotides complementary to the sense chain of ncRNA; AS – transfection with the cocktail of oligonucleotides complementary to the antisense chain of ncRNA; Control – transfection without the addition of oligonucleotides, cDNA synthesized with hexamers; *b*, *c* – HPV16 RNA levels normalized regarding to the mRNA of the *HPRT* gene are indicated on the ordinate axis; *b* – the mRNA levels of the early genes; *c* – the levels of ncRNA. Statistical data – a paired t-test (the GraphPad Prism program, v.7.00); *d* – western blot analysis of p53 expression in cells. A typical transfection result is presented. GAPDH is a control of protein loading; the numbers over the blots indicate normalized p53 protein levels in relation to the control as percentage (calculated by Image Studio Lite Software, v.5.2.).

белков, статус белка p53 оценивали в клетках SiHa, трансфицированных ОН. Белок p53 является одним из ключевых супрессоров опухолей и ингибиторов клеточного цикла в клетках млекопитающих и основной мишенью онкобелка E6. Связывание E6 с p53 приводит к протеосомной деградации p53 [22], напротив, подавление E6 индуцирует накопление клеточного p53 и реактивацию дремлющего пути опухолевого супрессора [5]. Нокдаун смысловых транскриптов URR, который приводит к подавлению транскрипции E6/E7, сопровождается повышением уровня p53 (рис. 3 з). Нокдаун антисмысловых транскриптов URR и активация транскрипции E6/E7 снижают уровень белка p53. Эти результаты демонстрируют, что обработка клеток ОН комплементарными смысловым или антисмысловым транскриптами URR вызывает ожидаемые изменения уровня белка p53, мишени онкогена E6.

Эти результаты показывают, что некодирующие РНК, транскрибируемые в URR ВПЧ16, участвуют в регуляции экспрессии E6 и E7.

Определение нкРНК ВПЧ 16 в клинических образцах опухолей шейки матки методом ОТ-ПЦР

В клеточных линиях SiHa и CasKi геном ВПЧ16 интегрирован в геном клетки, что отражает только один из вариантов физического состояния вирусного генома в опухолях. В клетках опухоли ДНК вкВПЧ может присутствовать в трех формах: 1) интегративной, 2) эписомальной и 3) смешанной [23]. Вирусный геном находится под влиянием сайта интеграции: активный или неактивный хроматин, образование химерных транскриптов с использованием промоторов и сигналов полиаденилирования клеточных генов и т.д. В связи с этим, исследовали транскрипцию URR в клинических образцах ПЧК шейки матки с известным физическим статусом ДНК ВПЧ16 (рис. 1 з), представлены типичные результаты ОТ-ПЦР для двух разных сайтов URR). Транскрипты URR были обнаружены в 32 из 32 (100%) образцов карцином независимо от формы персистенции ДНК ВПЧ16 (таблица).

Принимая во внимание влияние сайтов интеграции на характер экспрессии вирусных генов, для подтверждения одновременного присутствия нкРНК и мРНК E6/E7 определили количество копий каждого

вида РНК в небольшой выборке клинических образцов методом ПЦР-РВ (рис. 4).

Уровни мРНК ранних генов были определены в области, где могут быть измерены все известные транскрипты с кодирующими потенциалами E6 и E7 (рис. 3 а). Одновременное присутствие обоих типов РНК было выявлено во всех исследованных группах опухолей с эписомной (4 образца), интегративной (4 образца) и смешанной (эп+инт, 3 образца) формами ДНК ВПЧ16. Количество обоих транскриптов сильно варьирует от образца к образцу, что, в частности, может быть результатом разного количества активных копий ДНК в клетках и разного процента опухолевых клеток в образцах. Как и ожидалось, количество копий транскрипта в URR в десятки и тысячи раз меньше, чем мРНК ранних генов. Значение отношения мРНК/нкРНК уникально для каждого образца, что указывает на независимую регуляцию экспрессии двух областей ВПЧ16.

Таким образом, впервые показано присутствие нкРНК ВПЧ16 в первичных опухолях шейки матки.

Обсуждение

В работе показано существование некодирующих РНК, которые двунаправленно транскрибируются в регуляторной области ВПЧ16 в клеточных линиях и первичных карциномах шейки матки. Обнаруженные нкРНК могут модулировать уровни экспрессии и активность онкобелков ВПЧ. Повышенная экспрессия E6 и E7 по сравнению с их экспрессией в инфицированном эпителии при нормальном жизненном цикле ВПЧ необходима для возникновения и существования опухоли [3]. Наличие нкРНК не только в клеточных линиях, но и во всех ВПЧ16-позитивных клинических образцах ПЧК шейки матки указывает на их необходимость для поддержания экспрессии онкогенов E6 и E7 и существования опухолей. Это естественная особенность ВПЧ16-позитивных опухолей. Таким образом, впервые показано наличие нкРНК в ВПЧ с регуляторной функцией в первичных опухолях шейки матки.

В отличие от микроРНК, пока не удалось выявить общий механизм действия для длинных нкРНК. Известно, что нкРНК могут действовать по цис- или транс-механизму. Цис-действующие нкРНК регули-

Таблица. Анализ экспрессии нкРНК ВПЧ16 в образцах опухолей шейки матки методом ОТ-ПЦР

Table. Analysis of HPV16 ncRNAs expression in the cervical tumors by RT-PCR

Форма генома ВПЧ16 в образце Form of HPV16 genome in a samples	Число образцов Number of samples	Число позитивных образцов Number of positive samples
Эписомальная Episomal	17	17
Интегративная Integrative	12	12
Смешанная (эписомальная + интегративная) Mixed (episomal + integrative)	3	3
Всего Total	32	32 (100%)

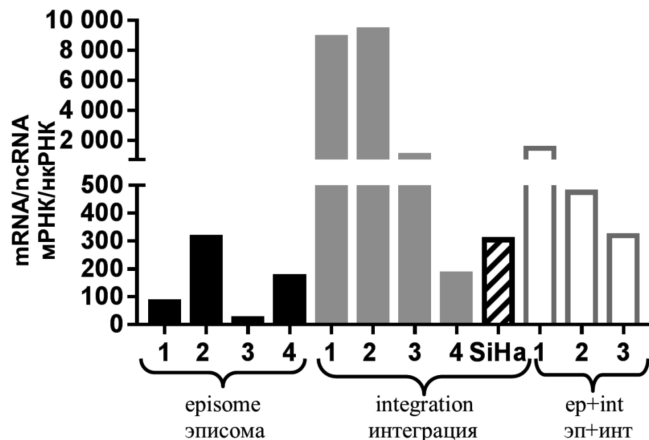


Рис. 4. Анализ уровней нкРНК и мРНК ранних генов ВПЧ16 в опухолях шейки матки. На оси ординат указано отношение числа копий мРНК к числу копий нкРНК. Количество копий каждого типа РНК рассчитано в 1 нг исходной тотальной РНК. Черные, серые и белые прямоугольники – образцы с эписомальной, интегративной и смешанной формой присутствия вирусной ДНК соответственно; заштрихованный прямоугольник – клеточная линия SiHa.

Fig. 4. Analysis of the levels of ncRNAs and mRNAs of early HPV16 genes in cervical tumors. The ratio of mRNA copy number to the ncRNA copy number of is indicated on the ordinate axis. The number of copies of each RNA type per 1 ng of initial total RNA was calculated. Black, gray, and white rectangles represent samples with episomal, integrated, and mixed forms of viral DNA, respectively; the shaded rectangle is the SiHa cell line.

руют экспрессию генов, расположенных вблизи их собственных сайтов транскрипции. Обнаружение нкРНК в образцах ПКТР шейки матки с эписомальной формой персистенции ДНК ВПЧ свидетельствует об их цис-действующем потенциале в регуляции экспрессии. Можно предполагать, что нкРНК функционируют в течение жизненного цикла вируса, когда в клетках присутствует только вирусная эписома, для тонкой регулировки экспрессии ранних генов на разных стадиях дифференцировки эпителия [4]. Точный механизм действия нкРНК ВПЧ16 еще предстоит определить.

Недавно для врВПЧ18 были обнаружены смысловые и антисмысловые транскрипты в районе URR в клеточных культурах РШМ [24]. Авторы показали, что смысловой транскрипт продолжается в районе гена *E6* и, следовательно, содержит открытые рамки считывания для белков и представляет собой мРНК с длинным нетранслируемым участком на 5'-конце. Авторы показали, что эти РНК участвуют в регуляции уровней экспрессии ранних генов ВПЧ18. Существование малокопийных мРНК с длинной 5'-нетранслируемой последовательностью, перекрывающей промотор, ранее было показано для клеточных генов (*NF-KB*, *CyclinD1* и др.) [25]. 5'-нетранслируемые промоторные участки этих клеточных мРНК необходимы для эпигенетического подавления транскрипции этих генов, т.е. такой механизм регуляции транскрипции существует в эукариотической клетке. Таким образом, для двух типов врВПЧ характерно на-

личие некодирующих транскриптов в URR, обладающих регуляторными функциями, но различающихся по механизмам образования и, по-видимому, использующих разные клеточные механизмы регуляции транскрипции. Исследования образования и активности нкРНК могут дать новое понимание о том, как эти и другие врВПЧ регулируют инфекцию и онкогенез.

Учитывая важность онкобелков врВПЧ в онкогенезе, обнаружение нкРНК может иметь клинические последствия. Присутствие вирусных нкРНК в опухолях шейки матки позволяет предположить, что они могут быть мишенью для разработки противовирусной терапии.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Forman D., de Martel C., Lacey C.J., Soerjomataram I., Lortet-Tieulent J., Bruni L., et al. Global burden of human papillomavirus and related. *Vaccine*. 2012; 30(Suppl. 5): F12–23. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.055>
- Doorbar J., Egawa N., Griffin H., Kranjec C., Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol.* 2015; 25(Suppl. 1): 2–23. <https://doi.org/10.1002/rmv.1822>
- zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology*. 2009; 384(2): 260–5. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2008.11.046>
- Fehrmann F., Laimins L.A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 2003; 22(33): 5201–7. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206554>
- Goodwin E.C., DiMaio D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97(23): 12513–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.23.12513>
- Goodwin E.C., Yang E., Lee C.J., Lee H. W., DiMaio D., Hwang E.S. Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97(20): 10978–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.10978>
- Magalidia T.G., Almsteda L.L., Belloneb S., Prevatt E.G., Santin A.D., DiMaio D. Primary human cervical carcinoma cells require human papillomavirus E6 and E7 expression for ongoing proliferation. *Virology*. 2012; 422(1): 114–24. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2011.10.012>
- Wells S.I., Francis D.A., Karpova A.Y., Dowhanick J.J., Benson J.D., Howley P.M. E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21CIP-dependent pathways. *EMBO J.* 2000; 19(21): 762–71. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5762>
- Prasanth K.V., Spector D.L. Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the ‘genome complexity’ conundrum. *Genes Dev.* 2007; 21(1): 11–42. <https://doi.org/10.1101/gad.1484207>
- Iwakiri D. Multifunctional non-coding Epstein–Barr virus encoded RNAs (EBERs) contribute to viral pathogenesis. *Virus Res.* 2016; 212: 30–8. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.007>
- Conrad N.K. New insights into the expression and functions of the Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus long noncoding PAN RNA. *Virus Res.* 2016; 212: 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.06.012>
- Klaes R., Woerner S.M., Ridder R., Wentzensen N., Duerst M., Schneider A., 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.
- Fedorova M., Vinokurova S., Pavlova L., Komel’kov A., Korolenkova L., Kissel’ov F., et al. Human papillomavirus types 16 E1 mRNA is transcribed from P14 early promoter in cervical neoplasms. *Virology*. 2016; 488: 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2015.11.015>
- Szuhai K.V., Bezrookove V., Wiegant J., Vrolijk J., Dirks R.W., Rosenberg C., et al. Simultaneous molecular karyotyping and mapping of viral DNA integration sites by 25-color COBRA-FISH.

- Genes Chromosomes Cancer*. 2000; 28(1): 92–7. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2264\(200005\)28:1<92::aid-gcc11>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2264(200005)28:1<92::aid-gcc11>3.0.co;2-2)
15. Meissner J.D. Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt. 7): 1725–33. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-7-1725>
 16. Beiter T., Reich E., Weigert C., Niess A.M., Simon P. Sense or antisense? False priming reverse transcription controls are required for determining sequence orientation by reverse transcription–PCR. *Anal. Biochem.* 2007; 369(2): 258–61. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.06.044>
 17. Matsui M., Prakash T.P., Corey D.R. Argonaute 2-dependent regulation of gene expression by single-stranded miRNA mimics. *Mol. Ther.* 2016; 24(5): 946–55. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.39>
 18. Seedorf K., Krämmer G., Dürst M., Suhai S., Röwekamp W.G. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*. 1985; 145(1): 181–5. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90214-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90214-4)
 19. Patrushev L.I., Kovalenko T.F. Functions of noncoding sequences in mammalian genomes. *Biochemistry (Mosc.)*. 2014; 79(13): 1442–69. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130021>
 20. Cripe T.P., Haugen T.H., Turket J.P., Tabatabai F., Schmid P.G. 3rd, Dürst M., et al. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 1987; 6(12): 3745–53. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02709.x>
 21. Melgar M.F., Collins F.S., Sethupathy P. Discovery of active enhancers through bidirectional expression of short transcripts. *Genome Biol.* 2011; 12(11): R113. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-11-r113>
 22. Scheffner M., Huibregtse J.M., Vierstra R.D., Howley P.M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993; 75(3): 495–505. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90384-3)
 23. Melsheimer P., Vinokurova S., Wentzensen N., Bastert G., von Knebel Doeberitz M. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10(9): 3059–63. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0565>
 24. Kassab M.A., Mudassir M., Singh A., Muthuraman N., Bhagat M., Palanichamy J.K., et al. Gene silencing and activation of human papillomavirus 18 is modulated by sense promoter associated RNA in bidirectionally transcribed long control region. *PLoS One*. 2015; 10(6): e0128416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128416>
 25. Han J., Kim D., Morris K.V. Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104(30): 12422–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701635104>