

文章编号: 1004-0374(2012)10-1179-06

# 人乳头瘤病毒癌基因诱导细胞永生化的研究进展

王珊珊, 王 伟, 于莹莹, 李 辉, 王 宁\*

(东北农业大学动物科学技术学院, 农业部鸡遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030)

**摘 要:** 永生化细胞是研究细胞增殖、分化、凋亡及衰老等的理想细胞模型。目前人类已建立多种细胞永生的方法, 其中人乳头瘤病毒 (HPV) 癌基因 (E6 和 E7) 被广泛用于永生化细胞研究。E6 蛋白和 E7 蛋白主要通过灭活 p53 通路和 pRb 通路, 从多个水平提高端粒酶的表达和活性, 使细胞逃过细胞复制衰老而继续增殖, 实现细胞永生。综述人乳头瘤病毒癌基因 E6 和 E7 的最新研究进展, 探讨未来研究的趋势和研究方向。

**关键词:** HPV; E6 基因; E7 基因

**中图分类号:** R373.9; R730.21; Q25      **文献标志码:** A

## Human papillomavirus (HPV) oncogene-induced cell immortalization

WANG Shan-Shan, WANG Wei, YU Ying-Ying, LI Hui, WANG Ning\*

(Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding of Ministry of Agriculture, College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** Immortalized cell is the ideal cell model for studying cell proliferation, differentiation, apoptosis and aging. At present, a variety of methods for cell immortalization has been established, among them HPV oncogenes E6 and E7 are widely used in cell immortalization. The key role of oncoproteins E6 and E7 in cell immortalization is to inactivate p53 and pRb pathways, to improve telomerase expression and activity at multiple levels, which allow cells to escape from replicate Senescence and proliferate, and accomplish cell immortalization. This article reviews the advance in research of HPV oncoprotein-induced cell immortalization, and discusses the ongoing trends and future directions.

**Key words:** cell immortalization; HPV; E6 gene; E7 gene

正常组织来源的细胞并不能无限增殖, 经过有限次数的细胞传代后, 就会停止增殖, 发生衰老, 从而死亡。正常细胞的这种自然极限称之为海弗利克极限<sup>[1]</sup>。与原代细胞和传代细胞不同, 永生化细胞 (immortalized cells) 具有无限增殖能力。永生化细胞能够提供稳定均一、性状一致的细胞来源, 便于广泛使用, 且可以降低细胞材料成本以及便于标准化等。因此, 永生化细胞是体外研究细胞增殖、分化、凋亡及衰老等的理想细胞模型, 另外, 永生化细胞和肿瘤细胞关系密切, 所以永生化细胞也是研究肿瘤发生机制的重要模型之一。理想的永生化细胞应该保持其来源组织细胞增殖和分化的特征。人类目前已建立多种细胞永生方法, 本文重点综

述了 HPV16 病毒癌基因 E6 和 E7 诱导细胞永生化的最新研究进展及其未来的研究方向。

### 1 细胞永生化的方法

人类已建立了多种细胞永生化的方法, 常用的人和动物细胞永生化的方法如下: (1) 筛选自发突变产生的永生细胞, 这种自发产生的细胞是由于在培养过程中发生遗传突变而导致的, 这些细胞逃过复制衰老的机制不是很清楚, 且这种永生细胞

收稿日期: 2012-05-04; 修回日期: 2012-08-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972086); 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2009CB941604)

\*通信作者: E-mail: ningwang2001@yahoo.com.cn

的基因型不稳定,容易丢失来源组织的细胞特征。这种方法多用于啮齿类动物细胞的永生化,而人和鸡等动物的细胞自发永生化的几率非常低,因此,这种方法很少用于人和鸡细胞的永生化。(2)应用射线诱发细胞永生化。这种方法采用X射线、金属钴、电离辐射等处理细胞,诱导细胞永生化。由于放射性元素破坏了细胞维持衰老机制的稳定性,促进了与生命周期延长相关基因的表达,使细胞无限增殖。(3)化学致癌物诱导细胞永生化。应用射线和化学致癌物这两种方法都有一定的缺陷,应用射线和致癌物质都使基因组发生一定的随机损伤,这种永生化的细胞易丧失其来源细胞的生物学特征,因此,这两种方法已很少应用。(4)病毒法。很多病毒感染能够诱导细胞永生化的,例如EB病毒(epstein-barr virus, EBV)、猿猴病毒40(simian virus 40, SV40)和逆转录病毒(retrovirus)。这些病毒感染其天然宿主细胞,能诱导细胞永生化的。病毒法获得的永生化的细胞往往发生细胞表型改变,而且一般只应用于病毒的特定宿主细胞。这种方法由于将整个病毒基因组导入了细胞,因此,很容易使细胞转化为肿瘤细胞。(5)重建端粒酶活性的方法。端粒酶是永生化的细胞的重要因素,很多永生化的细胞都表现端粒酶活性显著上升。端粒酶活性重建是目前细胞永生化的最理想方法,也是目前应用最为广泛的方法。端粒酶是多个亚基的复合体,其中端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)和端粒酶RNA(telomerase RNA component, TR)是端粒酶发挥功能的核心成分,它们分别起到提供模板和逆转录合成端粒DNA的作用。该方法也具有一定的局限性,虽然重建端粒酶活性能够使多种人和其他动物细胞永生化的,但是对于有些细胞,重建端粒酶活性不足以使细胞永生化的,还需要借助癌基因法才能使这些细胞永生化的。(6)癌基因方法:这种方法采用DNA重组技术,以质粒或病毒为表达载体,将癌基因,如SV40LT<sup>[2]</sup>、腺病毒的E1A和E1B<sup>[3]</sup>、人类乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的E6和E7基因等导入细胞,诱导细胞永生化的。这种方法简单可靠,并且已成功建立多个永生化的细胞系。如用HPV 16病毒E6、E7基因已成功建立的永生化的细胞有宫颈上皮细胞、耳廓软骨细胞、食管上皮细胞和鸡胚细胞等;E6/E7融合蛋白与端粒酶活性重建两种方法联合使用建立的永生化的细胞系有子宫上皮细胞系、人乳腺成纤维细胞、内皮细胞、人前脂肪细胞、人骨细胞、人子宫内膜细胞、人脐静脉血管内皮细

胞、人角质细胞、人肌源细胞<sup>[4-8]</sup>。并且通过有条件的控制细胞方法(CRCs),可以使上皮细胞在内源和外源上的基因调控相一致,符合宿主细胞的遗传调控<sup>[9]</sup>。

## 2 人乳头瘤病毒(HPV)

人HPV病毒是DNA肿瘤病毒,病毒无囊膜,病毒为二十面体对称结构,病毒颗粒呈球形,直径为52~55 nm。HPV病毒感染上皮细胞,会引起细胞增殖,在其他致癌因子的作用下,HPV可将正常细胞转化为肿瘤细胞。2008年,德国科学家Harald zur Hausen因证实HPV病毒感染可诱导宫颈癌而获得诺贝尔生理学奖。HPV病毒基因组为双链环状DNA,大小为7 900 bp。HPV基因组分为三个主要区域:早期区、晚期区和一个长的调控区(long control region, LCR),这三个区域由两个polyA加尾信号分开。早期区,占基因组50%以上,含有E1、E2、E4、E5、E6、E7六个阅读框,分别编码相应的蛋白。另外,阅读框E3、E8也曾被定位于早期区,但是只有E8在一些HPV病毒能翻译出蛋白。晚期区,约占基因组的40%。晚期区位于早期区的下游,含有两个ORF,分别编码病毒的衣壳蛋白L1和L2。LCR区长约850 bp,约占基因组10%,无蛋白编码功能。LCR区包含HPV病毒复制起点和多个转录因子的结合位点,该区域在HPV病毒复制以及早期和晚期基因转录调控中发挥重要作用。HPV病毒的早期表达蛋白E6和E7在细胞永生化中起决定性作用。E6和E7蛋白能够改变细胞的终末分化,诱导细胞进入S期,使细胞绕过正常细胞的周期检查点。HPV16癌基因E6和E7已被广泛应用于细胞的永生化的研究。

### 2.1 HPV16E6基因

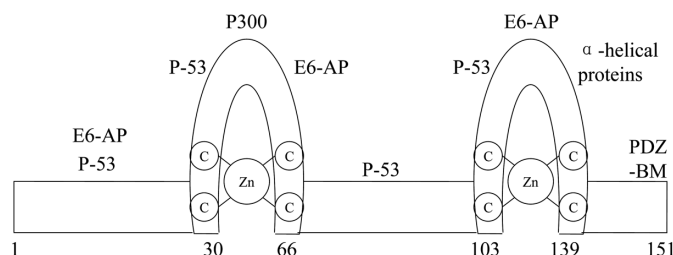
HPV16 E6蛋白是一个多功能蛋白,由151个氨基酸组成,相对分子质量为 $18 \times 10^3$ 。该具有四个特征性的C-X-X-C基序,这四个基序形成两个锌指状结构<sup>[10]</sup>。E6蛋白的锌指状结构是其许多已知功能所必需的<sup>[11]</sup>。如图1所示,E6蛋白有许多细胞蛋白的结合位点,这些蛋白包括p300、p53、抑癌蛋白PDZ、E6相关蛋白(E6 associated protein, E6-AP)等,这些蛋白的结合位点对于E6蛋白的各种功能至关重要<sup>[12-13]</sup>。E6蛋白通过结合这些细胞蛋白,可改变使细胞周期,促进细胞增殖,延长细胞寿命,使细胞获得永生化的。p300/CBP蛋白是转录辅助共激活因子,具有组蛋白乙酰化酶(HAT)活

性,它在转录调控和染色质重塑等中发挥重要作用。p300/CBP蛋白能乙酰化p53蛋白,并激活p53蛋白。E6蛋白结合p300/CBP蛋白可将阻止其乙酰化p53蛋白,降低p53蛋白的活性。E6-AP蛋白是细胞编码的一种泛素蛋白连接酶,E6蛋白结合E6-AP,可通过蛋白酶体降解p53蛋白和PDZ蛋白,此外E6还可采取不依赖于E6-AP的方法降解这些蛋白<sup>[14]</sup>。E6蛋白能增强hTERT活性,E6-AP是E6增强人的TERT(hTERT)活性所必需的。研究发现,如果失去E6-AP结合能力的E6突变体不能提高hTERT活性,也不能激活hTERT启动子活性;E6-AP敲除鼠研究以及人和鼠的RNA干扰研究也都证实,E6-AP是E6激活hTERT基因启动子所必需的<sup>[15-19]</sup>。体内和体外研究都证实,E6蛋白能与myc形成复合物,结合于hTERT启动子,从而协同激活hTERT启动子,从而增强hTERT表达和活性。在转录后水平发现,E6蛋白可结合有活性的端粒酶复合物和端粒。与p53的命运不同,E6并不引起hTERT蛋白的降解,而是激活端粒酶活性<sup>[36]</sup>,表观遗传学分析,显示HPV病毒E6蛋白可以是降低TERT转录起始区的甲基化,从而提高hTERT表达<sup>[20]</sup>。E6蛋

白锌指结构区的其他蛋白结合位点对于其功能发挥同样也非常重要的。E6蛋白的C端含有抑癌蛋白PDZ蛋白的结合区域<sup>[21]</sup>,PDZ蛋白在细胞周期中发挥着重要作用,可以抑制细胞增殖,而E6蛋白可以结合PDZ蛋白使其降解,从而促进细胞增殖。在细胞增殖调控中p300、p53、PDZ和E6-AP蛋白都发挥着重要作用<sup>[22]</sup>,E6蛋白通过与它们结合,从而使细胞周期改变,促进细胞增殖,使细胞获得永生。

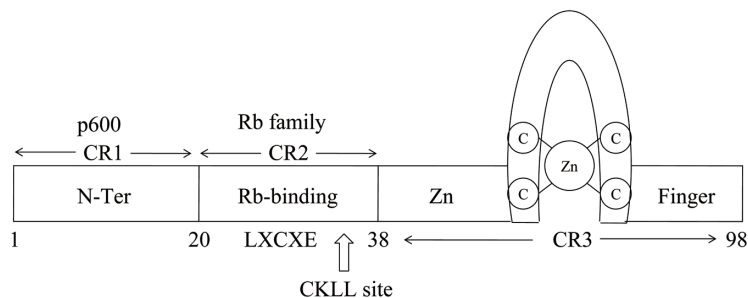
## 2.2 HPV16 E7基因

E7蛋白是高危HPV主要的致癌蛋白,高危型HPV(16、18、31)E7单独就能使人角质细胞(HFK)永生。HPV16 E7蛋白由98~115氨基酸残基构成,如图2所示,E7分为CR1、CR2、CR3三个功能区。E7蛋白可与Rb、p107、p130、E2F1、E2F6、CyclinA、HAT、HDAC等几十个细胞蛋白结合。E7蛋白N末端的CR1和CR2区对E7蛋白的体外转化起重要作用<sup>[11]</sup>。在CR1区没有pRb蛋白的结合位点,但是含有RAS蛋白结合位点,大量的RAS蛋白可以诱导细胞衰老,E7蛋白可以与RAS蛋白相互作用,降低其表达,从而促进细胞增殖。CR2区的



注:图示中的两个锌指结构是HPV E6蛋白功能的物质基础。E6蛋白N末端的p53结合位点主要起到降解p53蛋白的作用。E6相关蛋白(E6-AP)调控细胞周期。E6蛋白的PDZ蛋白结合区域(PDZ-BM)对于E6蛋白激活NF- $\kappa$ B的活性具有重要作用,另外,PDZ-BM结合位点还可以结合一些蛋白磷酸酶,例如PTPN3和PTPN13<sup>[23]</sup>

图1 HPV 16E6蛋白结构图<sup>[10]</sup>



注:图中显示E7蛋白的CR1、CR2、CR3三个功能区、CKII位点、锌指结构以及其他蛋白的结合位点。CK2位点为磷酸化位点,这个位点如果突变会导致E7蛋白的很多功能丧失。E7蛋白C端可以与多个染色体修饰酶相互作用,例如组蛋白乙酰转移酶(HAT)和组蛋白去乙酰化酶(HDAC)。

图2 HPV16 E7蛋白结构图<sup>[10]</sup>

LXCXE 结构域与 pRb 第 649-72 位氨基酸的口袋结构特异性结合, 释放核转录因子 E2F, 使细胞进入 S 期<sup>[24]</sup>, 使细胞避免进入 DNA 损伤应答途径, 促使细胞永生化; 同样 E7 蛋白可以结合 CDK2 并激活其酶活性<sup>[25]</sup>。E7 蛋白的 C 末端有一锌指结构, E7 蛋白通过这一锌指结构形成二聚体。锌指结构上有 p21<sup>GIP1</sup> 的结合位点, E7 蛋白 p21<sup>GIP1</sup> 结合, 可以消除 p21<sup>GIP1</sup> 活性, 解除 p21 对 CDK 活性的抑制。另外, E7 蛋白的这一锌指结构能与转录因子 E2F1 结合, 激活那些对 E2F 有应答的启动子 (E2F responsible promoter) 活性。E7 蛋白的 C 端能结合 BRCA1, 阻止 BRCA1 对 hTERT 的抑制作用, 从而增强 hTERT 活性, 促进细胞增殖<sup>[26-28]</sup>。CR3 功能区同样是 E7 的重要部分, 该区域可与多个染色体修饰酶相互作用, 例如组蛋白乙酰转移酶 (HAT) 和组蛋白去乙酰化酶 (HDAC)。CR3 区的锌指结构发生突变, E7 蛋白将丧失永生化细胞的能力。E7 蛋白可以增加 HAT 的表达, 并且显著增强 E2F 上调 hTERT 启动子活性, 促进细胞的增殖<sup>[11]</sup>。

### 3 HPV 癌基因诱导永生化的分子机制(图3)

正常细胞的增殖能力有限, 经过一定时间的增殖后, 细胞就会失去增殖能力、停止分裂, 进入细胞衰老状态 (replicate Senescence)。细胞衰老是指细胞在外在的微环境变化和内在的特定基因表达与失活等因素作用下, 细胞脱离细胞周期并不可逆地丧失增殖能力后进入的一种相对稳定的状态。正常细胞每分裂一次, 将染色体缩短 50~200 bp<sup>[17]</sup>, 随着细胞不断复制, 细胞端粒逐渐缩短, 当端粒缩短到一定长度时, 细胞 DNA 损伤检查点 (DNA damage check point) 就会检测到, 并激活 Rb 通路和 p53 通路, 导致细胞周期停滞 (cell cycle arrest)、细胞进入衰老状态。因此, 细胞永生化需要克服三大障碍, 一是避免端粒缩短; 二是灭活 Rb 通路; 三是灭活 p53 通路。从目前最新研究进展看, HPV16 癌基因 E6 和 E7 编码蛋白主要通过灭活 p53 通路和 pRb 通路, 提高端粒酶表达和活性等, 从而诱导细胞永生化。

#### 3.1 p53 蛋白

p53 蛋白是一个重要的抑癌基因, p53 参与细胞周期的调控、凋亡、DNA 复制和修复。p53 基因在细胞周期中具有重要的调节作用, 当细胞未完成修复时, p53 蛋白可以使细胞停留在 G1 期, 直到 DNA 完成修复, 细胞才能进入 S 期。如果 DNA 损伤不能得到有效修复, 则 p53 可诱导细胞凋亡。多

种应激因素可诱导 p53 蛋白的表达增高, 导致细胞周期发生不可逆阻滞, 细胞发生衰老<sup>[30]</sup>。p53 主要通过激活细胞周期蛋白激酶抑制因子 p21 来抑制激酶 CDK2 的活性, 从而阻断细胞周期的进程。E6 蛋白与 E6-AP 的复合物可降解 p53 蛋白, 破坏 p53 蛋白的细胞周期调控机制, 阻止细胞进入 DNA 损伤应答途径, 使细胞进入 S 期, 促进细胞增殖和永生化<sup>[31-32]</sup>。E6 还可以与其他一些细胞周期蛋白直接形成复合物, 导致细胞异常, 促进细胞增殖, 延长细胞寿命。E6 可以结合的细胞周期蛋白有细胞周期素 (cyclin A、cyclin E 等), 细胞周期蛋白依赖激酶 (cyclin-dependent kinases, CDKs (CDK2、CDK4 等) 和细胞周期蛋白依赖激酶抑制蛋白 (cyclin-dependent kinase inhibitory proteins, CKI)(p27、p21、p16) 和转录因子 E2F 等。

#### 3.2 pRb 蛋白

pRb 是袋状蛋白家族的一员, 是重要的细胞周期调控因子。细胞周期依赖于 CDKs 和 cyclin 的调控, CDKs 只有结合 cyclins 后才具有激酶活性。转录因子 E2F 是细胞增殖所必需的, 在细胞 G1/S 转换以及 DNA 复制的作用至关重要。pRb 是 E2F 活性的主要负调控因子, pRb 与 E2F 结合形成 Rb-E2F 复合物, 影响 cyclins 的表达和 CDKs 激酶的活性, 阻止细胞 G1/S 转换。E7 蛋白通过其 CR2 区的 LXCXE 结构域与 pRb 第 649-72 位氨基酸特异性的结合, 导致转录因子 E2F 释放, 使细胞完成 G1/S 转换, 细胞进入 S 期, 促进细胞增殖。由于 p21 也可通过 pRb 非依赖性方式抑制 E2F 活性, 但 E7 能与 p21 结合使 p21 失活, 从而解除 p21 对 Cyclin E 和 Cyclin A 相关激酶 CDK2 的抑制, 还能消除 p21 对增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 依赖性 DNA 复制的抑制功能, 从而弱化 p21 的双重抑制作用, 进而激活 CDK2, 促进细胞增殖<sup>[33]</sup>。

#### 3.3 端粒酶

端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 基因是人端粒酶的限速成分, 重要作用是在染色体末端添加端粒重复序列, 在细胞增殖过程中, 端粒的长度会随着增殖的次数增加而缩短。端粒酶在维持细胞永生化中起到重要作用。E6 蛋白可以通过多种途径激活端粒酶的表达和活性。hTERT 核心启动子包含很多转录因子结合位点, 包括 E2F、NF- $\kappa$ B 和 Sp1 等, 这些转录因子结合 hTERT 核心启动子能激活端粒酶活性<sup>[34]</sup>。体内和体外研

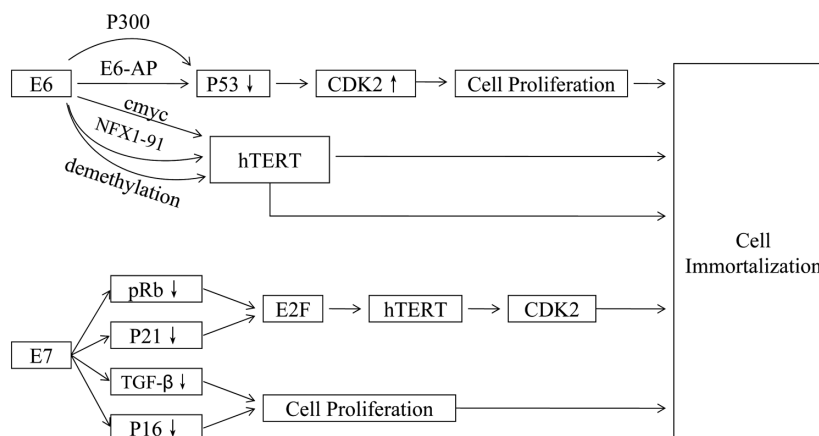


图3 HPV E6、E7诱导细胞永生化的分子机制

究都证实, E6 蛋白能与 myc 形成复合物, 结合于 hTERT 启动子, 从而协同激活 hTERT 启动子, 从而增强 hTERT 表达和活性<sup>[35-36]</sup>。在转录后水平发现, E6 蛋白可直接结合有活性的端粒酶复合物和端粒, 激活端粒酶活性<sup>[37-38]</sup>; E6 蛋白还可通过增强 hTERT 启动子区组蛋白的乙酰化来, 增强 hTERT 启动子的活性。E6 蛋白在永生细胞中最重要的作用就是激活 TERT<sup>[39]</sup>。TERT 基因启动子区 CpG 岛的低甲基化可以促进 TERT 的表达, 激活端粒酶, 导致细胞永生。研究发现, E6 蛋白可以增强 TERT 基因转录起始位点甲基化, 促进 TERT 基因表达<sup>[19]</sup>。由以上论述可见, E6 可从多个层面提高 hTERT 的活性, 从而促进细胞增殖。

E2F 调控 hTERT 基因的表达, 由于 pRb 是 E2F 的主要负调控因子, E7 蛋白可以灭活 pRb, 从而释放 E2F, 所以 E7 也可间接激活 hTERT 启动子活性, 从而提高端粒酶的表达和活性。另外, 研究发现, E7 蛋白在细胞中的持续表达可以维持永生细胞系端粒酶活性的稳定, 并可以增强 E6 蛋白的 hTERT 启动子直接激活的作用(图 3)<sup>[40]</sup>。

#### 4 结语与展望

永生细胞是人类研究细胞增殖、分化等的理想体外模型, 同时也是研究肿瘤发生、发展以及组织工程的理想模型。人类目前有多种细胞永生化的方法, 但是不是每一种方法都可使一个特定的细胞永生。由于细胞来源动物、组织不同, 其细胞的增殖与分化的调控也不尽相同, 因此, 每类细胞的永生化的分子机制不同, 其永生细胞的方法也不同。未来有必要针对特定细胞的永生开展研究, 阐明其永生化的分子机制, 这对于基础研究、组织

工程以及肿瘤的研究具有重要意义。目前已建立多种哺乳类细胞的不同永生细胞, 而鸟类, 特别是鸡的永生细胞较少, 理想的永生细胞更少。由于缺乏永生细胞严重影响了鸟类细胞增殖、分化、衰老等研究。鸟类由于独特的进化地位和经济价值等, 有必要建立鸟类(鸡)永生细胞研究。尽管也有人尝试建立鸡的永生细胞, 但是结果都不尽人意。目前尚无 HPV16 病毒 E6 和 E7 基因用于鸡细胞永生化的研究报道, 因此, 未来可以尝试 HPV16 病毒 E6 和 E7 基因诱导鸡细胞的永生研究。尽管利用 HPV 癌基因已建立许多永生细胞, 对其分子机制有一定的了解, 但尚未完全清楚, 除了导致 pRb、p53 通路灭活和端粒酶激活外, 还应该其他因素和信号通路参与细胞永生过程。同样, 在癌症生物学方面的研究上, 最重要的也是建立稳定的具有原代肿瘤细胞特征的细胞系<sup>[10]</sup>。下一步的研究需要从多个层面开展研究, 特别需要关注表观遗传因素的参与。相信随着研究深入, HPV 癌基因的诱导细胞永生化的分子机制将最终得到阐明。

#### [参 考 文 献]

- [1] Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry: Mosc*, 1997, 62: 1180-90
- [2] Tsai B, Gilbert JM, Stehle T, et al. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J*, 2003, 22 (17): 4346-55
- [3] Ruley H. Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature*, 1983, 304: 602-6
- [4] Tsuruga Y, Kiyono T, Matsushita M, et al. Establishment of immortalized human hepatocytes by introduction of HPV16 E6/E7 and hTERT as cell sources for liver cell-based therapy. *Cell Transplant*, 2008, 17(9): 1083-94
- [5] Bi CM, Zhang SQ, Zhang Y, et al. Immortalization of bovine germ line stem cells by c-myc and hTERT. *Anim Reprod Sci*, 2007, 100(3-4): 371-8

- [6] Bian C, Zhao K, Tong GX, et al. Immortalization of human umbilical vein endothelial cells with telomerase reverse transcriptase and simian virus 40 large T antigen. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2005, 6(7): 631-6
- [7] Darimont C, Avanti O, Tromvoukis Y, et al. SV40 T antigen and telomerase are required to obtain immortalized human adult bone cells without loss of the differentiated phenotype. *Cell Growth Differ*, 2002, 13(2): 59-67
- [8] Kyo S, Nakamura M, Kiyono T, et al. Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structural and functional characteristics. *Am J Pathol*, 2003, 163(6): 2259-69
- [9] Liu X, Ory V, Chapman S, et al. Rock inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *Am J Pathol*, 2012, 180(2): 599-607
- [10] Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses[M]// Knipe, DM, Howley, PM. (Eds), *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 2299-354
- [11] Aloysius J, Klingelutz, Ann R, et al. Cellular transformation by human papillomaviruses: Lessons learned by comparing high-and low-risk viruses. *Virology*, 2012, 424: 77-98
- [12] Pietsch EC, Murphy ME. Low risk HPV-E6 traps p53 in the cytoplasm and induces p53-dependent apoptosis. *Cancer Biol*, 2008, 7: 1916-18
- [13] Thomas M, Narayan N, Pim D, et al. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene*, 2008, 27: 7018-30
- [14] Massimi P, Shai A, Lambert P, et al. HPV E6 degradation of p53 and PDZ containing substrates in an E6AP null background HPV E6 degradation of p53. *Oncogene*, 27: 1800-4
- [15] Liu X, Clements A, Zhao KH, et al. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem*, 2006, 281(1): 578-86
- [16] Biol C. The E6AP ubiquitin ligase is required for transactivation of the hTERT promoter by the human papillomavirus E6 oncoprotein. *J Biol Chem*, 2005, 280(11): 10807-16
- [17] Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative: capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(21): 10114-8
- [18] Shai A, Brake T, Somoza C, et al. The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. *Cancer Res*, 2007, 67: 1626-35
- [19] Berghella V, Figueroa D, Szychowski JM, et al. 17-alpha-hydroxy-y progesterone caproate for the prevention of preterm birth in women with prior preterm birth and a short cervical length. *Am J Obstet Gynecol*, 2010, 202(4): 351-6
- [20] Jang J, Li JZ, Zhao C, et al. Hypomethylated CpG around the transcription start site enables TERT expression and HPV16 E6 regulates TERT methylation in cervical cancer cells. *Gynecol Oncol*, 2012, 124: 534-41
- [21] Thomas M, Narayan N, Pim D, et al. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene*, 2008, 27: 7018-30
- [22] Pietsch EC, Murphy ME. Low risk HPV-E6 traps p53 in the cytoplasm and induces p53-dependent apoptosis. *Cancer Biol*, 2008, Ther, 7: 1916-18
- [23] Spanos WC, Hoover A, Harris GF, et al. The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage independent growth and synergizes with ras for invasive growth. *J Virol*, 2008, 82: 2493-500
- [24] Boulet G, Horvath C, Broeck DV, et al. Human Papillomavirus:E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39: 2006-11
- [25] He W, Staples D, Smith C, et al. Direct activation of cyclin-dependent kinase 2 by human papillomavirus E7. *J Virol*, 2003, 77: 10566-74
- [26] Hwang SG, Lee D, Kim J, et al. Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J Biol Chem*, 2002, 277: 2923-30
- [27] Alonso M, Fueyo J, Yung W, et al. E2F1 and telomerase: alliance in the dark side. *Cell Cycle*, 2006, 5(9): 930-5
- [28] Helt AM, Funk JO, Galloway DA. Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. *J Virol*, 2002, 76: 10559-568
- [29] Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 2007, 445: 656-60
- [30] Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, 2002, 89(2): 213-28
- [31] Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS*, 2010, 118: 471-93
- [32] Shai A, Brake T, Somoza C, et al. The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. *Cancer Res*, 2007, 67: 1626-35
- [33] Liu XF, Jeffrey R, Aleksandra D, et al. HPV E7 contributes to the telomerase activity of immortalized and tumorigenic cells and augments E6-induced hTERT promoter function. *Virology*, 2008, 375: 611-23
- [34] Veldman T, Horikawa I. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol*, 2001, 75(9): 4467-72
- [35] O'Hare TH, Delany ME. Genetic variation exists for telomeric array organization within and among the genomes of normal, immortalized, and transformed chicken systems. *Chromosome Res*, 2009, 17(8): 947-964
- [36] Liu XF, Aleksandra D, Chen RX, et al. Cell-restricted immortalization by human papillomavirus correlates with telomerase activation and engagement of the hTERT promoter by Myc. *J Virol*, 2008, 11568-76
- [37] Galloway DA, Gewin LC, Myers H, et al. Regulation of telomerase by human papillomaviruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005, 70:209-15
- [38] McMurray HR, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J Virol*, 2003, 77(18): 9852-61
- [39] Liu X, Roberts J. HPV E7 contributes to the telomerase activity of immortalized and tumorigenic cells and augments E6-induced hTERT promoter function. *Virology*, 2008, 375(2): 611-23
- [40] Erik RV, Krysta A, Courtney RG. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins alter NF- $\kappa$ B in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF- $\kappa$ B promotes cell growth and immortalization. *Virology*, 2012, 425: 53-60