

## بررسی اثرات تغییر بیان ریز آر ان ای های سلولی ناشی از ویروس پاپیلوم انسانی در سلول های سرطانی سنتگفرشی سر و گردن در سطح پروفیل بیان ژنی

محسن نواری<sup>۱</sup>، مصطفی ابراهیمی<sup>۲</sup>، میلاد محمدخراسانی<sup>۲</sup>، آرش آرش کیا<sup>۱\*</sup>

- ۱- گروه ویروس شناسی، انتستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

- ۲- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** ویروس پاپیلوم انسانی (HPV) نقش مهمی در برخی از بدخیمی های انسانی ایفاء کرده و منجر به تغییر سطوح بیان نرمال ریز آر ان ای های سلولی می شود. در این مقاله اثرات چنین تغییراتی بر روی نمونه های تومور سرطانی سنتگفرشی سر و گردن در سطح پروفیل ژنی بررسی شد.

**روش ها:** در این مطالعه توصیفی - تحلیلی پروفیل بیان ژنی ۳۶ نمونه تومور در دو گروه با و بدون ویروس مقایسه شدند. ژن های با بیان متفاوت در دو گروه از لحاظ توانایی تفکیک نمونه ها و نیز همپوشانی با دسته بندی های هسته شناسی ژنی سنجیده شدند. به علاوه، اثر اهداف سلولی تایید شده ۱۱ ریز آر ان ای های سلولی گزارش شده بر روی پروفیل بیان ژنی نمونه های تومور با استفاده از آنالیز خوش بندی سلسه مراتبی و آنالیز غنی سازی مجموعه ژنی بررسی گردید.

**نتایج:** برخلاف آزمون های غیر نظارتی، ژن های استخراج شده با بیان متفاوت، مشتمل بر ۴۷ و ۷ ژن واحد به ترتیب با بیان افزایش یا کاهش یافته، به خوبی دو گروه تومور را در آنالیز خوش بندی سلسه مراتبی تفکیک کرده ( $P=0.0001$ ). این ژن ها و عمدتاً در تنظیم چرخه سلولی نقش داشتند ( $q-value \leq 0.05$ ). اهداف ریز آر ان ای های سلولی با بیان افزایش یافته در گروه توموری با ویروس غنی تر یافت شدند ( $q-value \leq 0.05$ ). در بین ریز آر ان ای های سلولی بررسی شده، hsa-miR-155-5p و hsa-miR-221-3p به صورت معنی داری پروفیل بیان ژنی نمونه های تومور را تغییر دادند ( $q-value \leq 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** ویروس پاپیلوم انسانی با تغییر سطوح بیان ریز آر ان ای های سلولی می تواند بر روی پروفیل بیان ژنی سرطان سلول های سنتگفرشی سر و گردن اثر گذارد. تایید نتایج این مطالعه با استفاده از روش های آزمایشگاهی پیشنهاد می شود.

**کلیدواژه ها:** ویروس پاپیلوم انسانی، سرطان سلول های سنتگفرشی سر و گردن، ریز آر ان ای، پروفیل بیان ژنی

\*آدرس نویسنده مسئول: گروه ویروس شناسی، انتستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

آدرس پست الکترونیک: arashkia@pasteur.ac.ir

## Gene Expression Profiling) در سرطان سلول‌های

سنگفرشی سر و گردن بررسی گردید.

### روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی- تحلیلی می‌باشد و در سه مرحله انجام گرفت. در مرحله اول، ریزآرایه‌های پروفیل بیان ژنی مربوط به نمونه‌های سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن با یا بدون ویروس پاپیلوم انسانی مقایسه گردیدند. در مرحله دوم اثر ژن‌های هدف ریز آر ان ای های با بیان متفاوت در رده‌های سلولی ویروس پاپیلوم انسانی مثبت و ویروس پاپیلوم انسانی منفی بر روی پروفیل بیان ژنی نمونه‌های سرطانی بررسی گردید. در مرحله سوم ژن‌های هدف ریز آر ان ای ها که به صورت تفاوت بیان آن‌ها بین نمونه‌های ویروس پاپیلوم انسانی مثبت و ویروس پاپیلوم انسانی منفی معنی‌دار بود استخراج گردید.

اطلاعات ریزآرایه و نرمال سازی: اطلاعات ریزآرایه‌های دی‌ان‌ای بیان (خوش خیم و یا بدخیم) ژن مربوط به سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن از پایگاه داده (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) دریافت گردید. با توجه به نیاز به حداقل ۵ نمونه در هر گروه برای آنالیز، ریزآرایه‌های سری داده مربوطه که مشتمل بر ۳۶ نمونه آنالیز شده با بیوجیپ Plus 2.0 (نمونه ویروس پاپیلوم انسانی مثبت و ۲۸ نمونه ویروس پاپیلوم انسانی منفی ویروس پاپیلوما) می‌باشد، استفاده گردید (۱۰).

نرمال سازی اطلاعات به صورت گزارش شده انجام شد (۱۱). بدین صورت که ابتدا با استفاده از بسته Bioconductor Affy در نرم افزار R نسخه ۳.۲.۳ بر روی پلتفرم Linux نرمال‌سازی RMA انجام شده و مقادیر به لگاریتم ۲ تبدیل گردیدند (۱۲). سپس با استفاده از نرم افزار geWorkbench نسخه ۲۶.۰ Mean Variance (Normalization) انجام گردید (۱۳).

Hierarchical Clustering آنالیز خوشه‌بندی سلسه‌مراتبی (Analysis) با استفاده از نرم‌افزار TMeV نسخه ۴.۸.۱ انجام گردید (۱۴). در این راستا، پروب‌ها بر اساس واریانس در بین نمونه‌ها مرتب شده و ۱۶ هزار ژن با بالاترین واریانس انتخاب شدند. میزان دقت خوشه‌بندی با استفاده از آزمون دقیق فیشر

### مقدمه

ویروس پاپیلوم انسانی متعلق به خانواده *Papillomaviridae* بوده و ویروسی با ژنوم DNA است که سلول‌های سنگفرشی را آلوه می‌کند و در انسان با بدخیمی‌های دهانه رحم و سرطان Head and Neck (Squamous Cell Carcinoma) مرتبط است (۱، ۲). سویه‌های مختلفی از این ویروس وجود دارند، با این حال همه این سویه‌ها خطر بالایی ایجاد نمی‌کنند. مهم‌ترین سویه‌های بیماریزا در انسان مشتمل بر سویه‌های ۱۶، ۱۸ و برخی دیگر می‌باشند (۲، ۳).

سرطان‌های سلول‌های سنگفرشی سر و گردن با نرخ شیوع ۵۰۰ هزار بیمار جدید در سال یکی از شایع‌ترین سرطان‌های بالغین می‌باشد (۴). ریسک فاکتورهای مختلفی از قبیل استعمال دخانیات و الکل در ابتلاء این بیماری نقش دارند، اما با کاهش مصرف دخانیات یکی دیگر از ریسک فاکتورهای قابل توجه این بیماری یعنی سویه‌های خاص ویروس پاپیلوم انسانی (Human Papilloma Virus) مورد توجه بیشتر قرار گرفته است (۵)

مکانیسم‌های مولکولی نقش ویروس پاپیلوم انسانی در تومورهای انسانی یکی از موضوعات مهم در تحقیقات می‌باشد و مقالات بی‌شماری در این زمینه منتشر شده و چندین واکسن بر علیه آن تا کنون تولید شده‌اند (۶). سلول‌های آلوه چندین پروتئین کد شده توسط ویروس را بیان می‌کنند که برخی از این پروتئین‌ها مانند E6 و E7 به عنوان اونکوپروتئین شناخته شده نقش مهمی در بیماری‌زایی ویروس بازی می‌کنند (۷).

یکی از اثرات قابل توجه ویروس بر روی سلول بر هم زدن بیان نرمال ریز آر ان ای های سلولی (microRNA) است (۷). ریز آر ان ای های مولکول‌های نوکلئوتیدی با طول کوتاه در حدود ۲۰ نوکلئوتید هستند که با تنظیم بیان ژن‌ها در سطح پسارونویسی نقش اساسی در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی بازی می‌کنند (۸). با توجه به نقش اثبات شده ریز آر ان ای ها در بیماری‌های مختلف از جمله بدخیمی‌ها، این امر می‌تواند در بیماری‌زایی ویروس نقش داشته باشد (۹). در این مطالعه با استفاده از اطلاعات ژنومیک موجود در پایگاه‌های داده و نیز ابزارهای بیوانفورماتیکی، اثر ریز آر ان ای های سلولی تغییر بیان یافته ناشی از حضور ویروس پاپیلوم انسانی در سطح پروفیل بیان ژنی

استخراج شدند (۱۶). جهت بالابردن دقت آنالیز، تنها ژن‌های هدفی که با شواهد قوی (Strong Evidences) مشتمل بر qPCR و یا Western Blotton Reporter Assay هدف معرفی شده بودند، انتخاب شدند. اثر ریز آر ان ای‌ها بر روی پروفیل بیان ژنی نمونه‌های تومور با استفاده از نرم افزار (Gene Set Enrichment Analysis) و با استفاده از ژن‌های هدف ریز آر ان ای‌ها سلولی استخراجی از MiRTarBase انجام گردید. در صورتی که نرخ کشف اشتباه (FDR adjusted P (q-value)) کمتر از ۰/۰۵ بود، نتایج معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

#### نتایج

حضور ویروس پاپیلوم انسانی در سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن تفاوت اساسی در پروفیل بیان ژنی ایجاد نمی‌کند. به منظور بررسی کلی تفاوت‌ها بین دو گروه سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن، مشتمل بر ویروس پاپیلوم انسانی مثبت و ویروس پاپیلوم انسانی منفی، پروفیل بیان ژنی آن‌ها مقایسه گردید. بدین منظور، در مرحله اول، نرمال‌سازی داده‌ها انجام گردید. همانطور که در شکل ۱الف (قبل از نرمال‌سازی) و ۱ب (پس از نرمال‌سازی) مشاهده می‌شود، نرمال‌سازی داده‌ها منجر به توزیع همگن داده‌ها در بین نمونه‌ها شد. پس از تایید نرمال‌سازی، دو گروه با استفاده از دو نوع آنالیز غیرنظری PCA (Unsupervised Analysis)، یعنی HCA و PCA بررسی شدن (شکل‌های ۱، پ و ت). آنالیز HCA دو شاخه کلی به دست داد (شکل ۱پ)، و توزیع دو گروه تومور در بین این دو شاخه اصلی (بر اساس تست دقیق فیشر) معنی‌دار نبود. منجر به جداسازی کامل دو گروه نگردید، و مجموع واریانس سه مولقه اصلی برابر با ۲۵٪ به دست آمد. نتایج این دو آنالیز نشان داد که تفاوت ناشی از حضور ویروس در این دو گروه تومور اساسی نمی‌باشد.

ژن‌های با بیان متفاوت بین سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن + ویروس پاپیلوم انسانی و سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن ویروس پاپیلوم انسانی عمدها در دستکاری چرخه سلولی نقش دارند.

بررسی شد (۱۵). بسته R Commander در نرم افزار R نسخه ۳.۲.۳ جهت تحلیل مولفه‌های اصلی (Principal Component Analysis) به کار رفت.

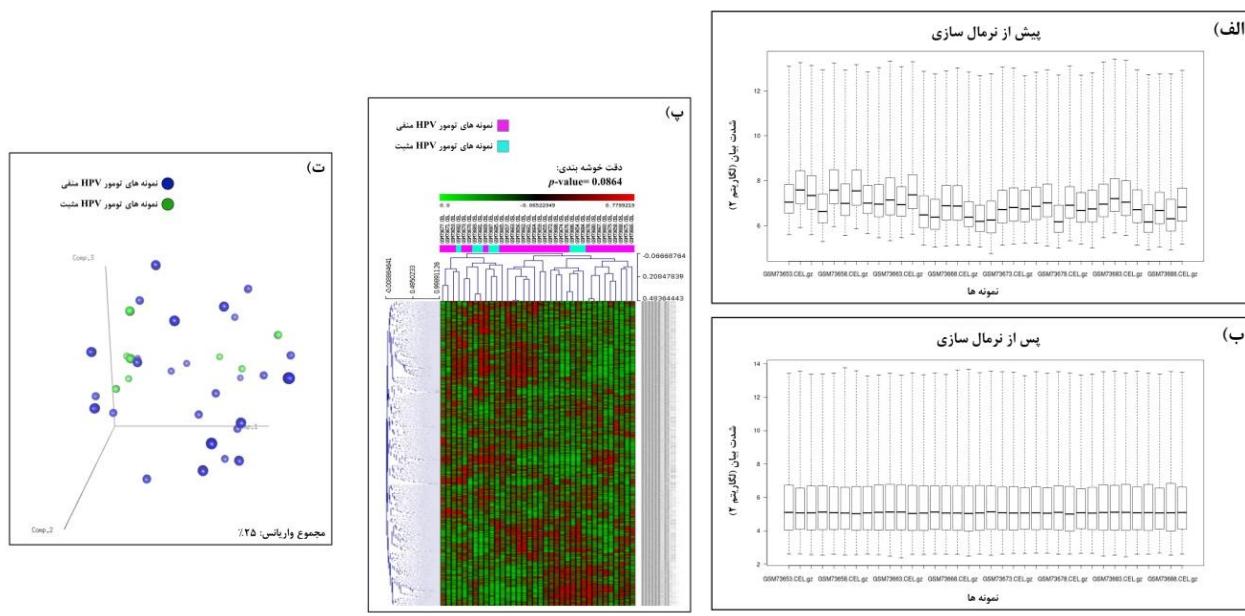
جهت یافتن پروب‌های با بیان متفاوت بین دو گروه توموری، از نرم افزار geWorkbench نسخه ۲۶.۰ استفاده گردید (۱۳). پروب‌هایی که نسبت بیان آن‌ها در نمونه‌های ویروس پاپیلوم انسانی مثبت و ویروس پاپیلوم انسانی منفی بیش از سه برابر متفاوت بوده و آن‌ها کمتر از ۰/۰۱ p-value به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

همپوشانی لیست‌های ژنی با دسته بندی‌های هسته شناسی ژنی (Gene Ontology) با استفاده از پایگاه داده Signatures Database MSigDB (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb>) به دست آمد. نتایج با نرخ کشف اشتباه کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

**جدول ۱.** ریز آر ان ای‌های با بیان متفاوت در رده‌های سلولی ویروس پاپیلوم انسانی مثبت و ویروس پاپیلوم انسانی منفی

| ریز آر ان ای<br>ویروس پاپیلوم انسانی مثبت | تغییر بیان در رده‌های سلولی |
|-------------------------------------------|-----------------------------|
| کاهش بیان                                 | Has-miR-29a-3p              |
| کاهش بیان                                 | Has-miR-142-5p              |
| کاهش بیان                                 | Has-miR-155-5p              |
| کاهش بیان                                 | Has-miR-181a-5p             |
| کاهش بیان                                 | Has-miR-181b-5p             |
| کاهش بیان                                 | Has-miR-218-5p              |
| کاهش بیان                                 | Has-miR-221-3p              |
| کاهش بیان                                 | Has-miR-222-3p              |
| افزایش بیان                               | Has-miR-33a-5p              |
| افزایش بیان                               | Has-miR-363-3p              |
| افزایش بیان                               | Has-miR-497-5p              |

ریز آر ان ای‌های با بیان متفاوت در رده‌های سلولی ویروس پاپیلوم انسانی مثبت و ویروس پاپیلوم انسانی منفی سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن گزارش شده توسط Wald و همکاران (۷) به عنوان کاندیدای آنالیز استفاده شدند (جدول ۱). ژن‌های هدف این ریز آر ان ای‌ها که با شواهد آزمایشگاهی تایید شده‌اند از پایگاه داده MiRTarBase نسخه ۷.۰



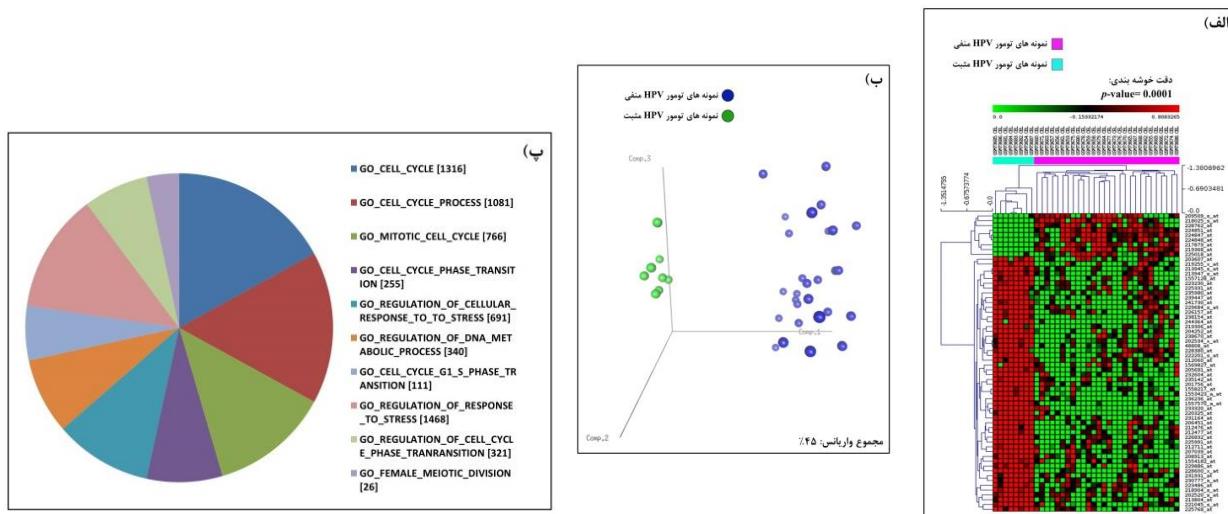
شکل ۱. نرمال سازی و آنالیز غیر نظارتی نمونه های سرطان سلول های سنتگفرشی سر و گردن ناشی از حضور ویروس پاپیلوم انسانی (الف) نمودار شدت بیان پرورها در نمونه های آنالیز شده قبل از نرمال سازی، (ب) نمودار شدت بیان پرورها در نمونه های آنالیز شده بعد از نرمال سازی، (پ) آنالیز نمونه ها ی پروفیل بیان ژنی با آزمون غیر نظارتی HCA (در نقشه حرارتی ژن ها در محور عمودی و نمونه ها در محور افقی نمایش داده شده اند)، (ت) آنالیز نمونه های پروفیل بیان ژنی با آزمون غیر نظارتی PCA (سه مولفه با بالاترین واریانس برای ترسیم نمودار استفاده شدند)

ویروس پاپیلوم انسانی با اثر بر روی بیان ریز آران ای ها می تواند بر پروفیل بیان ژنی سرطان سلول های سنتگفرشی سر و گردن تاثیر بگذارد. برای پاسخ به این سوال که آیا حضور ویروس پاپیلوم انسانی بر روی پروفیل بیان ژنی سرطان سلول های سنتگفرشی سر و گردن تاثیر معنی داری می گذارد، ما بر روی یکی از اثرات حضور ویروس، یعنی اثر بر روی بیان ریز آران ای های کاهش یافته یا افزایش یافته ناشی از ویروس پاپیلوم انسانی به صورت جداگانه با دو روش بررسی شدند. نخست، این ژن ها از ماتریکس پروفیل بیان ژنی (مشتمل بر مقادیر تمامی نمونه ها) استخراج شده و آنگاه با استفاده از روش HCA سنجیده شدند (شکل های ۳الف و ۳ب). در مورد ریز آران ای های کاهش یافته ناشی از ویروس پاپیلوم انسانی، ژن های هدف آن ها به میزان بیشتری منجر به تفکیک دو گروه نمونه های توموری در مقایسه با ژن های هدف ریز آران ای های افزایش یافته بر اثر ویروس پاپیلوم انسانی شدند، هر چند در هر دو مورد این تفکیک معنی دار نبود (شکل ۳ الف و ۳ب، به ترتیب  $P=0.053$  و  $P=1$ ). به صورت مشابه، اهداف ریز آران ای ها با استفاده از نرم افزار GSEA بر روی ماتریکس کامل پروفیل بیان

برای به دست آوردن تفاوت های اصلی در پروفیل بیان ژنی بین دو گروه نمونه های ویروس پاپیلوم انسانی مثبت و ویروس پاپیلوم انسانی منفی، یک آزمون نظارتی (Supervised Analysis) یعنی T-test استفاده شد و ژن های با تفاوت بیان عمده استخراج شدند. آنالیز تعداد محدودی پروب ژنی نشان داد که عدتا شامل ژن های با بیان افزایش یافته در نمونه های حاوی ویروس پاپیلوم انسانی بودند. بدین صورت که در مجموع ۵۳ پروب ژنی معادل ۴۷ ژن واحد در نمونه های دارای ویروس پاپیلوم انسانی افزایش بیان داشته و از سوی دیگر ۹ پروب ژنی معادل ۷ ژن واحد در این نمونه ها کاهش بیان نشان دادند (جدول ۲). آنالیز نمونه ها با در نظر گرفتن این پروب ها با استفاده از آزمون HCA منجر به جداسازی کامل دو گروه گردید (شکل ۲الف،  $P=0.0001$ ). به طریق مشابه، آزمون PCA دو گروه کاملا مجزا را به نمایش گذاشت (شکل ۲ب، مجموع واریانس سه مولفه برابر با ۴۳٪). بررسی در بانک داده MSigDB نشان داد که ژن های با بیان متفاوت عدتا در دسته بندی های مرتبط با چرخه سلولی نقش دارند. همچنین این ژن ها در پروسه های مربوط به استرس و متabolizm DNA نقش داشتند (شکل ۲پ).

جدول ۲. پروب‌های با بیان متفاوت بین دو گروه تومور ویروس پاپیلوم انسانی مثبت و ویروس پاپیلوم انسانی منفی

| P-Value  | تغییر بیان در<br>نمونه‌های<br>ویروس | نام زن               | نام پروب زنی | P-Value  | تغییر بیان در<br>نمونه‌های<br>ویروس | نام زن   | نام پروب زنی |
|----------|-------------------------------------|----------------------|--------------|----------|-------------------------------------|----------|--------------|
| 5.57E-05 | کاهش بیان                           | DPAGT1               | 209509_s_at  | 0.000416 | افزایش بیان                         | C9orf40  | 218904_s_at  |
| 1.79E-08 | کاهش بیان                           | CDC27                | 217879_at    | 0.000454 | افزایش بیان                         | IL17RB   | 219255_x_at  |
| 6.66E-10 | کاهش بیان                           | ECI2                 | 218025_s_at  | 0.000658 | افزایش بیان                         | KIF15    | 219306_at    |
| 1.28E-05 | کاهش بیان                           | NAP1L2               | 219368_at    | 0.000126 | افزایش بیان                         | TAF7L    | 220325_at    |
| 3.92E-06 | کاهش بیان                           | CDK6                 | 224847_at    | 3.53E-05 | افزایش بیان                         | PER3     | 221045_s_at  |
| 3.79E-07 | کاهش بیان                           | CDK6                 | 224848_at    | 1.17E-06 | افزایش بیان                         | CASP8AP2 | 222201_s_at  |
| 0.000601 | کاهش بیان                           | CDK6                 | 224851_at    | 0.00069  | افزایش بیان                         | PRPF38A  | 223230_at    |
| 4.12E-05 | کاهش بیان                           | SPIRE1               | 225018_at    | 0.000664 | افزایش بیان                         | GTPBP8   | 223486_at    |
| 8.97E-05 | کاهش بیان                           | LFNG                 | 228762_at    | 0.00054  | افزایش بیان                         | CCDC50   | 225331_at    |
| 0.000678 | افزایش بیان                         | SLFN13               | 1553423_a_at | 0.000504 | افزایش بیان                         | NR1D2    | 225768_at    |
| 0.000683 | افزایش بیان                         | TRIM73 ///<br>TRIM74 | 1554182_at   | 9.83E-06 | افزایش بیان                         | TMEM41A  | 225991_at    |
| 0.000201 | افزایش بیان                         | FAM111B              | 1557128_at   | 0.000126 | افزایش بیان                         | TFDP2    | 226157_at    |
| 0.000155 | افزایش بیان                         | LOC285084            | 1557570_a_at | 1.63E-09 | افزایش بیان                         | RNF168   | 226832_at    |
| 0.000239 | افزایش بیان                         | SLFN13               | 1558217_at   | 0.000877 | افزایش بیان                         | SENP2    | 228380_at    |
| 0.000158 | افزایش بیان                         | ATG7                 | 1569827_at   | 7.74E-06 | افزایش بیان                         | FAM221A  | 228600_x_at  |
| 3.23E-09 | افزایش بیان                         | RPA2                 | 201756_at    | 5.73E-05 | افزایش بیان                         | ---      | 229684_s_at  |
| 0.000689 | افزایش بیان                         | MLH1                 | 202520_s_at  | 0.00083  | افزایش بیان                         | C5orf34  | 229886_at    |
| 0.000375 | افزایش بیان                         | DHFR                 | 202534_x_at  | 0.000339 | افزایش بیان                         | PRDM15   | 230777_s_at  |
| 0.000754 | افزایش بیان                         | INPP5F               | 203607_at    | 8.73E-05 | افزایش بیان                         | ABCA17P  | 231164_at    |
| 1.60E-06 | افزایش بیان                         | CDK2                 | 204252_at    | 0.000522 | افزایش بیان                         | PRDM15   | 231931_at    |
| 8.98E-05 | افزایش بیان                         | SYNGR3               | 205691_at    | 7.15E-07 | افزایش بیان                         | ZNF541   | 232604_at    |
| 3.52E-05 | افزایش بیان                         | TBCCD1               | 206451_at    | 4.04E-07 | افزایش بیان                         | TCAM1P   | 233320_at    |
| 1.43E-12 | افزایش بیان                         | CDKN2A               | 207039_at    | 4.67E-06 | افزایش بیان                         | ZBTB8A   | 235142_at    |
| 0.000779 | افزایش بیان                         | GGA2                 | 208913_at    | 0.00041  | افزایش بیان                         | PIK3CA   | 235980_at    |
| 0.000319 | افزایش بیان                         | U2SURP               | 212060_at    | 1.91E-06 | افزایش بیان                         | WNK3     | 236236_at    |
| 6.22E-05 | افزایش بیان                         | ACAP2                | 212476_at    | 0.000427 | افزایش بیان                         | CEP70    | 238154_at    |
| 0.000486 | افزایش بیان                         | ACAP2                | 212477_at    | 8.88E-07 | افزایش بیان                         | RAD18    | 238670_at    |
| 7.63E-05 | افزایش بیان                         | CAMSAP1              | 212711_at    | 0.00064  | افزایش بیان                         | TRA2B    | 239447_at    |
| 0.000142 | افزایش بیان                         | INPP5B               | 213804_at    | 0.000401 | افزایش بیان                         | MYNN     | 241730_at    |
| 3.64E-05 | افزایش بیان                         | NUP210               | 213945_s_at  | 0.000895 | افزایش بیان                         | MYO3A    | 244364_at    |
| 0.000939 | افزایش بیان                         | NUP210               | 213947_s_at  | 0.000245 | افزایش بیان                         | DHFR     | 48808_at     |

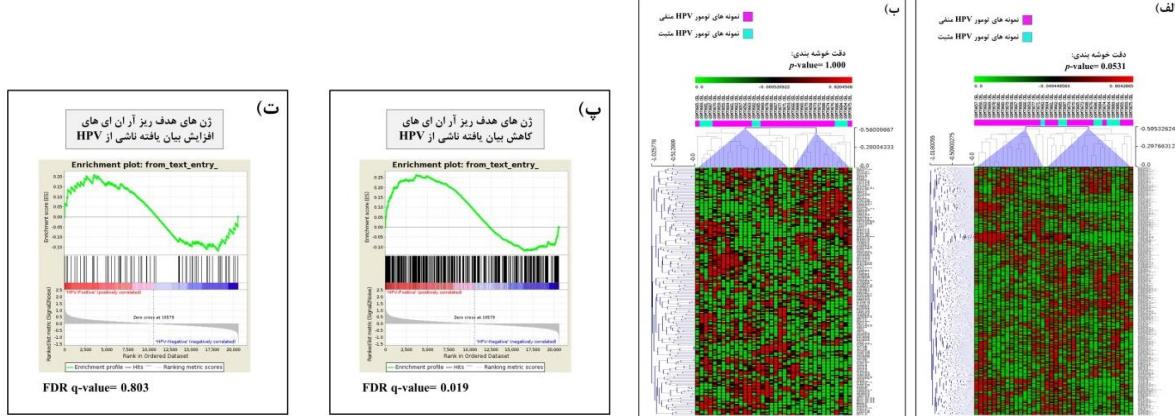


شکل ۲. حضور ویروس پاپیلوم انسانی در پروفیل بیان ژنی با اثرات قابل توجه در روندهای زیستی مرتبط با بدخیمی، (الف) آنالیز نمونه‌ها با آزمون HCA بر اساس پروب‌های با بیان متفاوت (در نقشه حرارتی ژن‌ها در محور عمودی و نمونه‌ها در محور افقی نمایش داده شده‌اند)، (ب) آنالیز نمونه‌ها با آزمون غیر ناظارتی PCA بر اساس پروب‌های با بیان متفاوت (سه مولفه با بالاترین واریانس برای ترسیم نمودار استفاده شدند)، (پ) بررسی نقش ژن‌های با بیان متفاوت بر اساس MSigDB Gene Ontology Terms

ویروس پاپیلوم انسانی اثر معنی‌داری بر روی پروفیل بیان ژنی نداشتند (شکل‌های ۴ خ تا ۵).  
ویروس پاپیلوم انسانی با اثر بر روی بیان ریز آر ان ای‌های سلولی می‌تواند بیان ژن‌های دخیل در بدخیمی را تغییر دهد. با توجه به اثر برخی ریز آر ان ای‌های بررسی شده بر روی پروفایل بیان ژنی، اهداف احتمالی آن‌ها در بین ژن‌های با بیان تغییر یافته در تومورهای ویروس پاپیلوم انسانی مثبت سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن (جدول ۲) بررسی شدند. هم سو با نتایج قبلی، هیچ مورد هم پوشانی در ژن‌های هدف ریز آر ان‌های با افزایش بیان ناشی از ویروس پاپیلوم انسانی و ژن‌های با کاهش بیان در نمونه‌های ویروس پاپیلوم انسانی مثبت سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن مشاهده نشد (شکل ۵ الف). اما هنگامی که ژن‌های هدف ریز آر ان ای‌های کاهش یافته در نمونه‌های ویروس پاپیلوم انسانی مثبت در بین ژن‌های افزایش یافته در نمونه‌های ویروس پاپیلوم انسانی مثبت جست و جو شدند، ۴ ژن هدف (عمدتاً با نقش اثبات شده در بدخیمی) به دست آمدند (شکل ۵ ب و جدول ۳). این ژن‌ها مشتمل بر hsa-miR-155-5p (هدف IL17RB، INPP5F، MLH1 و hsa-miR-29a-3p (هدف CDK2) بودند.

ژنی سنجیده شدند (شکل‌های ۳ پ و ۳ ت). این بار نیز، ریز آر ان ای‌های کاهش یافته موثرتر نشان داده شدند، بدین صورت که اهداف آن‌ها به صورت معنی‌داری در نمونه‌های ویروس پاپیلوم انسانی مثبت غنی بیشتر بیان نشان دادن (شکل ۳ پ، P=۰/۰۱۹)، در حالی که بیان ژن‌های هدف ریز آر ان ای‌های افزایش یافته معنی‌دار نبود (شکل ۳ ت، P=۰/۸۰۳).

hsa-miR-155-5p و hsa-miR-221-3p به صورت معنی‌دار پروفیل بیان ژنی سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن را تغییر می‌دهند. در ادامه، برای تعیین دقیق ریز آر ان ای‌هایی که بیان ژن در تومورهای ویروس پاپیلوم انسانی مثبت را به صورت عمده تحت اثر قرار می‌دهند، ژن‌های اهداف هر یک از آن‌ها به صورت جداگانه با نرم افزار GSEA بر روی ماتریکس کامل پروفیل بیان ژنی آنالیز شدند (شکل ۴). در بین ریز آر ان ای‌های کاهش یافته ناشی از ویروس پاپیلوم انسانی (شکل ۴)، فقط دو مورد غنی شدگی معنی‌دار مشاهده شد که hsa-miR-155-5p (شکل ۴ پ، P=۰/۰۰۷) و hsa-miR-155-5p (شکل ۴ ج، P=۰/۰۰۹) مربوط به miR-221-3p (شکل ۴ ج) بود. مشابه با نتایج مرحله قبل، هیچ یک از ریز آر ان ای‌های افزایش یافته ناشی از



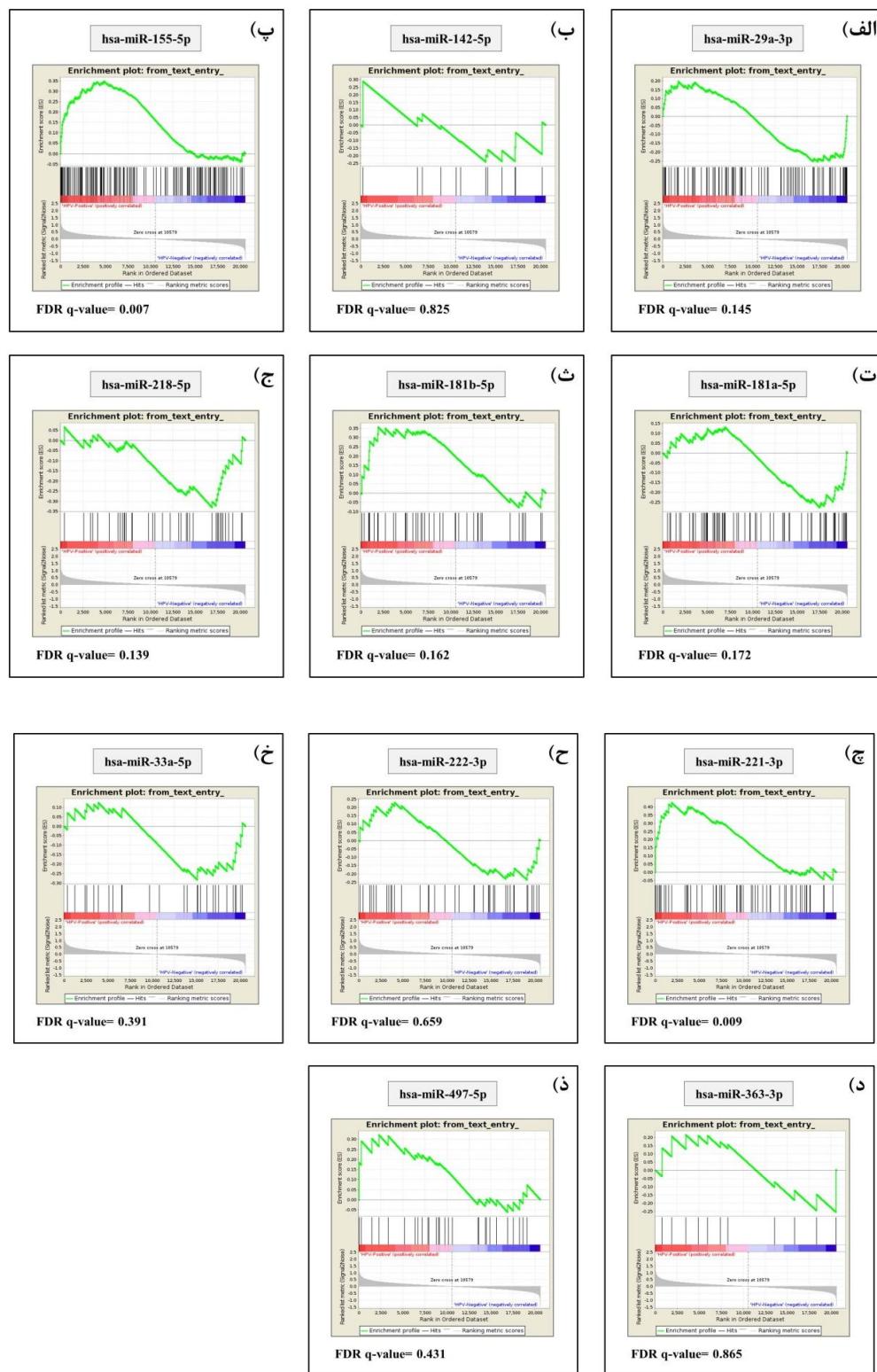
**شکل ۳.** ویروس پاپیلوم انسانی با تغییر در بیان ریز آر ان ای های در پروفیل بیان ژنی سلطان سلول های سنگفرشی سر و گردن، (الف) آنالیز نظارتی ویروس پاپیلوم انسانی ژن های هدف ریز آر ان ای های با بیان کاهش یافته در حضور ویروس پاپیلوم انسانی پس از استخراج از ماتریکس پروفیل بیان ژنی سلطان سلول های سنگفرشی سر و گردن، (ب) آنالیز نظارتی HCA ژن های هدف ریز آر ان ای های با بیان افزایش یافته در حضور ویروس پاپیلوم انسانی پس از استخراج از ماتریکس پروفیل بیان ژنی سلطان سلول های سنگفرشی سر و گردن، (پ) آنالیز GSEA ژن های هدف ریز آر ان ای های با بیان کاهش یافته در پروفیل بیان ژنی سلطان سلول های سنگفرشی سر و گردن، (ت) آنالیز GSEA ژن های هدف ریز آر ان ای های با بیان افزایش یافته در پروفیل بیان ژنی سلطان سلول های سنگفرشی سر و گردن

مثال، تحریک چرخه سلولی در استقرار عفونت ویروسی نقش داشته (۲۰) و از سوی دیگر در همانند سازی DNA سلولی در خارج از فاز S چرخه سلولی اهمیت دارد (۲۱). نقش ویروس در بدخیمی های انسانی از منظر ریز آران ای ها نیز می تواند از دو زاویه مورد بررسی قرار گیرد. ریز آران ای های کد شده توسط ژنوم ویروس و نیز ریز آر ان ای های سلولی که بیان نرمال آن ها با حضور ویروس دستخوش تغییر می شود. مقالات متعددی از ریز آر ان ای های کد شده توسط اونکو ویروس های انسانی از جمله ویروس سارکوم کاپوزی انسانی (KSHV) و ویروس اپشتین بار (EBV) و نقش آن ها در بدخیمی های مربوطه منتشر شده است (۲۲، ۲۳). در مورد ویروس پاپیلوم انسانی نیز مقاله منتشر شده توسط Qia و همکاران چندین ریز آر ان ای مشتق شده از ویروس پاپیلوم انسانی را گزارش کرده اند (۲۴). با این حال به نظر می آید به دلیل کمبود شواهد هنوز مورد توافق جامعه علمی قرار نگرفته، چرا که در پایگاه داده miRBase تعریف نشده اند. به این دلیل در این مقاله صرفا به ریز آر ان ای های سلولی که بیان آن ها در رده های سلولی سلطان سلول های سنگفرشی سر و گردن تغییر می کند پرداخته شد (۷).

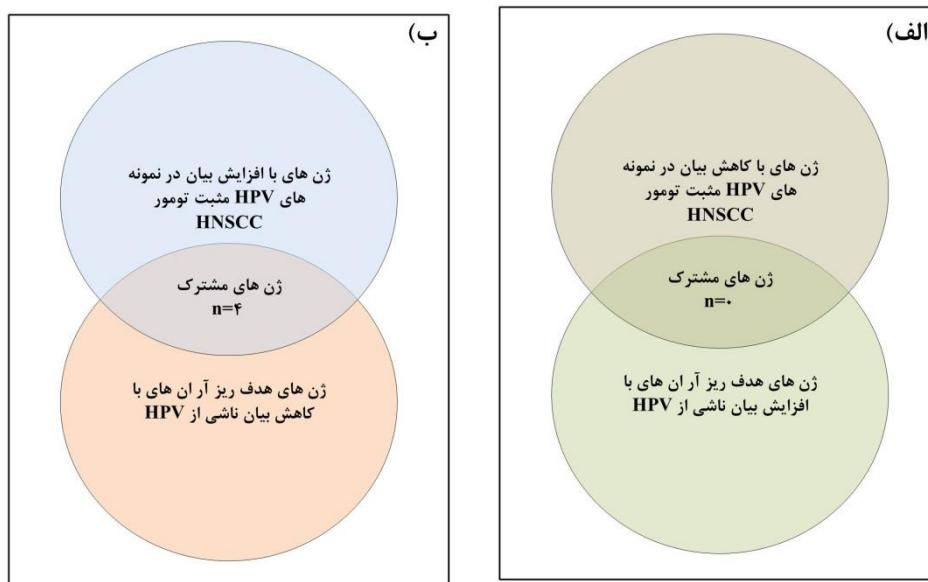
### بحث

نقش ویروس پاپیلوم انسانی در بدخیمی های انسانی، از جمله سلطان سلول های سنگفرشی سر و گردن، به گستردگی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۷). عدمه نقش ویروس در این بیماری ها ناشی از بیان دو پروتئین کد شده توسط ژنوم آن، یعنی E6 و E7 می باشدند. این پروتئین ها در برهم کنش با پروتئین های سلولی باعث تغییر در فرآیندهای فیزیولوژیک می شوند. برای مثال، پروتئین E6 به پروتئین سلولی E6-AP متصل شده و باعث تجزیه پروتئین سرکوب کننده رتینوبلاستوما (Rb) می شود، در حالی که E7 مستقیماً به Rb متصل شده و از برهم کنش آن با فاکتور رونویسی E2F جلوگیری می کند (۱۸، ۱۹).

هر چند که در بررسی اولیه این مطالعه تفاوت های عمدہ ای در نمونه های سلطان سلول های سنگفرشی سر و گردن با یا بدون ویروس مشاهده نشد، اما آنالیز بیشتر ژن های را آشکار ساخت که عمدتاً در چرخه سلولی و متابولیزم DNA نقش دارند. بنابراین به نظر می آید دستکاری در چرخه سلولی نقش اصلی ویروس در ایجاد بدخیمی باشد. مقالات منتشر شده در این رابطه به اهمیت این امر در بقای ویروس اشاره می کنند. برای



شکل ۴. تغییر پروفیل بیان ژنی سلطان سلول‌های سرگفرشی سر و گردن ناشی از دو ریز آر ان ای سلولی تغییر بیان یافته در اثر ویروس پاپیلوم انسانی (has-miR-221-3p و hsa-miR-155-5p)، (الف تا ح) آنالیز ریز آر ان ای‌های با بیان کاهش یافته در حضور ویروس پاپیلوم انسانی، (خ تا ذ) ریز آر ان ای‌های با بیان افزایش یافته در حضور ویروس پاپیلوم انسانی



شکل ۵. همپوشانی زن های هدف ریز آر ان ای های با بیان تغییر یافته در حضور ویروس پاپیلوم انسانی با زن های با تغییر بیان در نمونه های ویروس پاپیلوم انسانی مثبت سرطان سلول های سنگفرشی سر و گردن، (الف) بررسی زن های هدف ریز آر ان های با افزایش بیان ناشی از ویروس پاپیلوم انسانی و زن های با کاهش بیان در نمونه های ویروس پاپیلوم انسانی مثبت سرطان سلول های سنگفرشی سر و گردن های با کاهش بیان ناشی از ویروس پاپیلوم انسانی و زن های با افزایش بیان ناشی از ویروس پاپیلوم انسانی مثبت سرطان سلول های سنگفرشی سر و گردن (رجوع شود به جدول ۳)

جدول ۳. هم پوشانی زن های هدف ریز آر ان ای های با بیان کاهش یافته در نمونه های سرطان سلول های سنگفرشی سر و گردن + ویروس پاپیلوم انسانی و زن های با بیان افزایش یافته در سرطان سلول های سنگفرشی سر و گردن + ویروس پاپیلوم انسانی

| زن هدف | ریز آر ان ای   |
|--------|----------------|
| CDK2   | hsa-miR-29a-3p |
| IL17RB | hsa-miR-155-5p |
| INPP5F | hsa-miR-155-5p |
| MLH1   | hsa-miR-155-5p |

چند ۱۵۵-۵p hsa-miR-155-5p عمدتاً به عنوان یک اونکومیر شناخته می شود، با این حال نقش ضد بدخیمی این مولکول نیز به اثبات رسیده است و در حقیقت به عنوان یک ریز آر ان ای چند کاره شناخته می شود (۲۷). به علاوه این مولکول در عفونت های ویروسی ناشی از EBV نقش مهمی ایفا می کند (۲۸) و این مولکول به عنوان یک بیومارکر در تشخیص عفونت ویروس پاپیلوم انسانی در سرطان دهانه رحم است، هر چند که بر خلاف نتایج ما بیان آن در نمونه های ویروس پاپیلوم انسانی مثبت این تومور افزایش بیان داشته که می تواند ناشی از مکانیسم های مختلف مربوط به نقش ویروس پاپیلوم انسانی در سرطان دهانه رحم در مقایسه با سرطان سلول های سنگفرشی سر و گردن باشد (۲۹). به طریق مشابه، has-miR-221-3p می تواند نقش القا کننده یا سرکوب کننده در بدخیمی ها را داشته باشد (۳۰).

با توجه به تعدد زن های هدف ریز آر ان ای های سلولی، در مرحله اول به جای بررسی تک تک این هدفها، از روش های ژئومنیکی برای بررسی این اثرات استفاده گردید. گزارشات چاپ شده در مورد ویروس EBV پیشنهاد می کنند که حضور ویروس بروفایل بیان ژنی سلول های آلوده را می تواند تحت تأثیر قرار دهد (۲۵، ۲۶). تعداد ریز آر ان ای های سلولی کاهش بیان یافته در حضور ویروس پاپیلوم انسانی از تعداد گروه مقابله (یعنی افزایش بیان یافته) بیشتر است. به طریق موافق تعداد زن های افزایش بیان یافته در حضور ویروس پاپیلوم انسانی بیشتر بوده که این امر اهمیت گروه اول ریز آر ان ای های ذکر شده را می تواند نشان دهد. در حقیقت، این گروه از ریز آر ان ای ها و در hsa-miR-221-3p و hsa-miR-155-5p بین آن ها به ویژه اثر قابل توجهی بر روی پروفاویل بیان ژنی از خود بروز دادند. هر

نتایج ما می باشد (۳۳). ژن IL17RB پروتئین مربوط به گیرنده نوع B مولکول اینترلوکین ۱۷ را کد کرده و افزایش بیان آن در ضایعات نئوپلازی اینترا اپیتلیال مهبلی (Vulvar intraepithelial neoplasia) مرتبط به ویروس پاپیلوم انسانی گزارش شده است (۳۴). در پایان، INPP5F به عنوان یک فاکتور پیش آگهی در لوسومی مزمن لنفاوی (CLL) شناخته می شود (۳۵).

### نتیجه گیری

در مجموع، نتایج این تحقیق نشان از نقش ویروس پاپیلوم انسانی در ایجاد سرطان سلول های سنگفرشی سر و گردن با اثر بر روی بیان ریز آر ان ای های سلولی دارد. با این حال، نتایج ما قطعی نبوده، چرا که با روش های بیوانفورماتیکی به دست آمده اند و لذا باید از طریق روش های آزمایشگاهی تایید شوند.

### References

1. Poropatich K, Fontanarosa J, Swaminathan S, Dittmann D, Chen S, Samant S, et al. Comprehensive T cell immunophenotyping and next generation sequencing from HPV-positive and-negative head and neck squamous cell carcinomas. *The Journal of pathology*. 2017.
2. Chen X, Zhao Y. Human papillomavirus infection in oral potentially malignant disorders and cancer. *Archives of Oral Biology*. 2017;83:334-9.
3. Cutts F, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, De Sanjose S, Garnett G, et al. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bulletin of the World Health Organization*. 2007;85(9):719-26.
4. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(2):87-108.
5. Marur S, Forastiere AA, editors. Head and neck squamous cell carcinoma: update on epidemiology, diagnosis, and treatment. Mayo Clinic Proceedings; 2016: Elsevier.
6. Harper DM, DeMars LR. HPV vaccines—A review of the first decade. *Gynecologic Oncology*. 2017.
7. Wald AI, Hoskins EE, Wells SI, Ferris RL, Khan SA. Human papillomavirus alters microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) cell lines. *Head & neck*. 2011;33(4):504.
8. Cora D, Re A, Caselle M, Bussolino F. MicroRNA-mediated regulatory circuits: outlook and perspectives. *Physical Biology*. 2017;14(4).
9. Sannigrahi M, Sharma R, Panda NK, Khullar M. Role of Non-coding RNAs in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a narrative review. *Oral Diseases*. 2017.
10. Slebos RJC, Yi Y, Ely K, Carter J, Evjen A, Zhang X, et al. Gene Expression Differences Associated with Human Papillomavirus Status in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(3):701-9.
11. Navari M, Fuligni F, Laginestra MA, Etebari M, Ambrosio MR, Sapienza MR, et al. Molecular signature of Epstein Barr virus-

- positive Burkitt lymphoma and post-transplant lymphoproliferative disorder suggest different roles for Epstein Barr virus. *Front Microbiol.* 2014;5:728.
12. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy—analysis of Affymetrix GeneChip platform for integrative genomics. *Bioinformatics.* 2010;26(14): 1779-80.
14. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques.* 2003 Feb;34(2):374-8.
15. Fisher RA. On the interpretation of  $\chi^2$  from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society.* 1922;85(1):87-94.
16. Chou CH, Chang NW, Shrestha S, Hsu SD, Lin YL, Lee WH, et al. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 04;44(D1):D239-47.
17. McBride AA. Oncogenic human papillomaviruses. *Phil Trans R Soc B.* 2017;372(1732):20160273.
18. Rautava J, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head and neck pathology.* 2012;6(1):3-15.
19. Sritippho T, Chotjumlong P, Iamaroon A. Roles of human papillomaviruses and p16 in oral cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(15):6193-200.
20. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS pathogens.* 2009;5(2):e1000318.
21. Reinson T, Henno L, Toots M, Ustav Jr M, Ustav M. The cell cycle timing of human papillomavirus DNA replication. *PloS one.* 2015;10(7):e0131675.
22. Qiu J, Smith P, Leahy L, Thorley-Lawson DA. The Epstein-Barr virus encoded BART data at the probe level. *Bioinformatics.* 2004;20(3):307-15.
13. Floratos A, Smith K, Ji Z, Watkinson J, Califano A. geWorkbench: an open source miRNAs potentiate tumor growth in vivo. *PLoS pathogens.* 2015;11(1):e1004561.
23. Wang Y, Lin Y, Guo Y, Pu X, Li M. Functional dissection of human targets for KSHV-encoded miRNAs using network analysis. *Scientific Reports.* 2017;7.
24. Qian K, Pietilä T, Rönty M, Michon F, Frilander MJ, Ritari J, et al. Identification and validation of human papillomavirus encoded microRNAs. *PLoS One.* 2013;8(7):e70202.
25. Marquitz AR, Mathur A, Shair KH, Raab-Traub N. Infection of Epstein-Barr virus in a gastric carcinoma cell line induces anchorage independence and global changes in gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109(24):9593-8.
26. Navari M, Etebari M, De Falco G, Ambrosio MR, Gibellini D, Leoncini L, et al. The presence of Epstein-Barr virus significantly impacts the transcriptional profile in immunodeficiency-associated Burkitt lymphoma. *Frontiers in microbiology.* 2015;6.
27. Ranganath P. MicroRNA-155 and its role in malignant hematopoiesis. *Biomarker insights.* 2015;10:95.
28. Yin Q, McBride J, Fewell C, Lacey M, Wang X, Lin Z, et al. MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways. *Journal of virology.* 2008;82(11):5295-306.
29. Park S, Eom K, Kim J, Bang H, Wang H-y, Ahn S, et al. MiR-9, miR-21, and miR-155 as potential biomarkers for HPV positive and negative cervical cancer. *BMC cancer.* 2017;17(1):658.
30. Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, M Croce C, Condorelli G. miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to

- therapy. Current molecular medicine. 2012;12(1):27-33.
31. Khalil HS, Mitev V, Vlaykova T, Cavicchi L, Zhelev N. Discovery and development of Seliciclib. How systems biology approaches can lead to better drug performance. Journal of biotechnology. 2015;202:40-9.
32. Kimple RJ, Harari PM. The prognostic value of HPV in head and neck cancer patients undergoing postoperative chemoradiotherapy. Annals of translational medicine. 2015;3(Suppl 1).
33. Kwasniewska A, Postawski K, Gozdzicka-Józefiak A, Zdunek M, Korobowicz E, Miturski R. Immunohistochemical detection of hMLH1 and hMSH2 proteins in vulvar carcinoma. International journal of molecular medicine. 2005; 15(6): 955-61.
34. Santegoets LA, van Seters M, Heijmans-Antonissen C, KleinJan A, van Beurden M, Ewing PC, et al. Reduced local immunity in HPV-related VIN: Expression of chemokines and involvement of immunocompetent cells. International journal of cancer. 2008;123(3):616-22.
35. Palermo G, Maisel D, Barrett M, Smith H, Duchateau-Nguyen G, Nguyen T, et al. Gene expression of INPP5F as an independent prognostic marker in fludarabine-based therapy of chronic lymphocytic leukemia. Blood cancer journal. 2015; 5(10):e353

## ***Evaluating the Effects of Deregulated miRNAs by Human Papilloma Virus on Gene Expression Profiles of Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck***

**Mohsen Navari<sup>1</sup>, Mostafa Ibrahimi<sup>2</sup>, Milad Mohammadoo-khorasani<sup>2</sup>, Arash Arashkia<sup>1\*</sup>**

1- Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

2- Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**\*Corresponding Address:** Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

**Email address:** a\_arashkia@pasteur.ac.ir

### ***Abstract***

**Background and aim:** Human Papilloma Virus plays an important role in some of human malignancies and causes alterations in normal expression levels of cellular microRNAs. In this paper, we evaluated the effects of such changes on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma tumor samples at gene expression profile level.

**Methods:** in this descriptive-analytical study, gene expression profiles of 36 tumor samples were compared in two groups: with or without virus. Differentially expressed genes among the two groups were judged in terms of their ability in segregating the tumor samples and also their overlap with Gene Ontology Biological Function categories. Furthermore, using hierarchical clustering analysis and Gene Set Enrichment Analysis methods, the effect of confirmed cellular targets of 11 reported cellular microRNAs on the gene expression profiles of our samples was assessed.

**Results:** Unlike unsupervised methods, differentially expressed genes, including 47 and 7 unique induced and suppressed genes, respectively, discriminated perfectly the two sample sets in a hierarchical clustering analysis ( $P=0.0001$ ). These genes were primarily engaged in regulation of cell cycle (FDR adjusted  $P\leq 0.05$ ). Targets of induced cellular microRNAs were found enriched in virus-positive set (FDR adjusted  $P\leq 0.05$ ). Among analyzed cellular miRNAs, hsa-miR-155-5p and hsa-miR-221-3p change the gene expression profile of tumor samples significantly (FDR adjusted  $P\leq 0.05$ ).

**Conclusion:** deregulating expression levels of cellular microRNAs, HPV is capable of affecting the gene expression profiles of Head and Neck Squamous cell Carcinoma tumors. It is suggested to confirm the results of this study using experimental methods.

**Keywords:** Human Papilloma Virus, Squamous cell carcinoma of the head and neck, microRNA, Gene Expression Profiling