

بررسی موتاسیون مرتبط با سرطان زایی ژن آنتی ژن توموری بزرگ ویروس مرکل سل پولیوما در بیماران مبتلا به سرطان پوست

نیلوفر نادری^۱، سید مهدی سادات^{۲*}، سویار ساری^۱، نصیر محجل^۲

۱- گروه آموزشی علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی - تهران - ایران

۲- گروه تحقیقاتی ویروس شناسی، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران - ایران.

چکیده

سابقه و هدف: کارسینوم سلول بازال و کارسینوم سلول سنگفرشی دو شکل اصلی از سرطان پوست غیر ملانومی می باشند. تحقیق های اخیر، وجود MCPyV در بافت های توموری سلول مرکل را تأیید می نماید. لذا هدف از تحقیق حاضر، بررسی وجود ویروس در نمونه های بافت توموری و همچنین نقش موتاسیون های ناحیه ژن بزرگ (LT Ag) ویروس که با خواص انکوژنیک آن در ارتباط می باشد، در نمونه های مثبت مراجعه کننده به بیمارستان رازی تهران در طی سال ۹۵-۱۳۹۴ بوده است.

مواد و روش ها: در مطالعه بررسی - مقطعی حاضر، تعداد ۵۵ نمونه بافتی شامل ۳۰ نمونه BCC، ۱۰ نمونه SCC و ۱۵ نمونه غیر مبتلا (سالم) جمع آوری و استخراج DNA آنها انجام شد. واکنش Real Time PCR کمی به منظور تشخیص نمونه های مثبت و سپس واکنش PCR به منظور شناسایی موتاسیون انجام و در نهایت توالی یابی انجام شد.

یافته ها: ژنوم ویروس MCPyV تنها در ۱۰٪ از نمونه های BCC شناسایی شد در حالی که در نمونه های SCC دیده نشد. همچنین رابطه معنی داری بین جدا شدن ویروس MCPyV و متغیرهای سن، جنس و مرحله بیماری دیده نشد. نتایج توالی یابی نیز موتاسیونی که منجر به ایجاد کدون پایان، کوتاه شدن LTAg و یا تغییر قالب قرائت شود را در بین جمعیت مورد مطالعه نشان نداد.

نتیجه گیری: یکی از فاکتورهای دخیل در ایجاد سرطان، عفونت های ویروسی است. اگرچه مطالعه های گوناگون بر نقش موتاسیون های ایجاد شده در ناحیه N ترمینال آنتی ژن LT با تومورهای ویروس تأکید دارد لیکن در مطالعه حاضر هیچ موتاسیون ایجاد کننده کدون خاتمه و یا تغییر قالب قرائت مشاهده نشده است. بنابر اطلاع ما این اولین تحقیق بر روی شیوع ویروس MCPyV با سرطان پوست غیر ملانومی در بیماران ایرانی است هرچند که به مطالعه های با تعداد نمونه های بیش تر ضروری می باشد.

کلمات کلیدی: پولیوما ویروس سلول مرکل، کارسینوم سلول مرکل، کارسینوم سلول بازال، کارسینوم سلول سنگفرشی. واکنش زنجیره ای پلی مرز، ایران.

مقدمه

امروزه سرطان ها یکی از شایع ترین معضلات بهداشت جهانی می باشند. در کل حدود ۱۷/۸٪ از نوپلاسماها مرتبط با عوامل عفونی می باشند، به طوری که عفونت های ویروسی حدود ۱۵-۱۰٪ از علل ایجاد کننده سرطان می باشند (۱۸). پولیوما ویروس های انسانی دسته مهمی از ویروس های بیماری زا

نویسنده مسئول:

گروه تحقیقاتی ویروس شناسی، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران -

ایران

پست الکترونیکی: mehdi_sadat@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۱۰

محسوب می شوند و تاکنون ۱۲ گونه از آنها شناسایی شده است (۳،۱۲،۱۴). پولیوما ویروس سلول مرکل (MCPyV) در سال ۲۰۰۸ شناسایی شد (۵) و اولین پولیوما ویروسی است که به وضوح با سرطان انسانی کارسینوم سلول مرکل (MCC)، که یکی از تهاجمی ترین سرطان های پوست می باشد، در ارتباط است (۱۵). ادغام کلونال DNA ژنومی این ویروس در داخل ژنوم سلول میزبان، حداقل در ۸۰٪ از موارد MCC مشاهده شده است (۵) که از دلایل محکم نقش مهم MCPyV در گسترش سرطان پوست MCC می باشد (۱۵).

MCPyV یک ویروس بدون پوشش با کپسیدی بیست وجهی می باشد که شامل یک DNA ژنومی حلقوی دو رشته ای با اندازه ای حدود ۵/۴ کیلو باز است (۷). ژنوم ویروس شامل مبدأ شروع همانندسازی، عناصر تنظیمی رونویسی و همچنین

استخراج DNA از بلوک پارافینه و نمونه بافت سرطانی

ابتدا به منظور دیپارافینه کردن بلوک، از زایلین استفاده گردید و جهت از بین بردن زایلین، از روش آب گیری با الکل (۹۶-۵۰ درصد) استفاده شد. سپس به بافت مورد نظر رسیده که به منظور استخراج DNA از آن و نمونه بافت تازه، از کیت استخراج DNA، QIAamp Mini Kit DNA (آلمان) استفاده شد. در نهایت غلظت نمونه های DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتوفتومتری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده و تأیید شد.

انجام Real Time PCR کمی

با استفاده از پرایمرها و پروب اختصاصی به روش Taq man انجام گرفت (۱۰) و برای رسم منحنی استاندارد از نمونه استاندارد (۱۹) سریال رقت تهیه شد. همچنین از ژن RNase P در وکتور pTZ57/T به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرها و پروب مورد استفاده در واکنش Real Time PCR کمی برای ناحیه LT Ag

ژن هدف	مشخصات پرایمر و پروب		مشخصات PCR	
	نام پرایمر و پروب	توالی (5'-3')	فعال دمای	تعداد سیکل
MCPyV Large T antigen	MCPyV - LT-F	CCAAACCAA AGAATAAAG CACTGA'	۶۰	۴۰
	MCPyV - LT-R	TCGCCAGCA TTGTAGTCTA AAAAC		
	MCPyV - LT-P	HEX- AGCAAAAACA CTCTCCCCACG TCAGACAG - FAM		
Human RNase P	RNP-F	AGATTTGGA CCTGCGAGC G'	۶۲	۴۰
	RNP-R	GAGCGGCTG TCTCCACAA GT		
	RNP-P	FAM- TTCTGACCTG AAGGCTCTG CGCG- TAMRA		

مناطق کد کننده اولیه و تأخیری هستند. آنتی ژن توموری بزرگ (LT Ag)، در ناحیه اولیه قرار دارد. اکثر تومورهای MCC به طور مداوم از انکوپروتئین آنتی ژن بزرگ T از MCPyV بیان می شوند (۲۰)، به طوری که در توالی مربوط به آنتی ژن LT جهش هایی در ناحیه اگزون شماره ۲ دیده می شود که منجر به بیان یک فرم آنتی ژن LT ناقص در سلول های توموری MCC می شود (۱۳). از انواع بدخیمی های پوستی می توان به سرطان های پوست ملانومی و غیر ملانومی (NMSC) اشاره کرد. دو شکل اصلی از سرطان های پوست غیر ملانومی به نام های کارسینوم سلول های بازال (BCC) و کارسینوم سلول های سنگفرشی (SCC) می باشد (۱۷). BCC شایع ترین سرطان پوست (۸۰٪) در جهان است (۲۳) که در عمیق ترین قسمت اپیدرم و زیر سلول های سنگفرشی ایجاد می شود. بیش از ۸۰٪ از موارد BCC به طور عمده در نواحی در معرض نور به ویژه سر و گردن دیده می شود (۱۱). SCC دومین سرطان شایع (۲۰٪) در بین سفید پوستان است (۱،۲۱) که از کراتینوسیت های اپیتلیالی ناشی می شود (۸). برخلاف کمابیش تمام موارد BCC، افراد مبتلا به SCC با خطر بیش تری برای ایجاد متاستاز مواجه هستند. همانند MCC، عوامل ایجاد خطری که منجر به گسترش BCC و SCC می شوند شامل سرکوب سیستم ایمنی و تابش اشعه UV می باشد (۱۷). با توجه به موارد ذکر شده در مورد بدخیمی های پوستی و وجود MCPyV در بافت های توموری سلول مرکل و همچنین نقش مهم LTAg در موتاسیون های ایجاد شده، با انجام این مطالعه به بررسی موتاسیون های مرتبط با خاصیت انکوژنیک ویروس MCPyV در ناحیه LTAg در نمونه های مثبت از بافت های BCC و SCC در سرطان پوست در بین مبتلایان ایرانی پرداخته شد.

مواد و روش ها

نمونه ها

این مطالعه بررسی - مقطعی، براساس رضایت آگاهانه کلیه شرکت کنندگان در تحقیق شامل: ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان پوست غیر ملانومی از نوع BCC و SCC که در مراحل مختلف بیماری بودند و ۱۵ فرد غیر مبتلا زیر نظر پزشک متخصص در بیمارستان تخصصی پوست رازی در طی سال های ۹۵-۱۳۹۴ (تهران - ایران) انجام شد. نمونه بافت تازه پوست براساس پروتکل های استاندارد و توسط تیم معالج اخذ و بافت های پارافینه (کنترل مثبت)، براساس آئین نامه کمیته اخلاق به انستیتو پاستور ایران انتقال یافت.

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی توالی ژنوم کامل LT ویروس MCPyV

مشخصات پرایمر				PCR	
نام پرایمر	محل اتصال در ژنوم	توالی (5'-3')	محصول (bp)	دمای اتصال	تعداد سیکل
F-LT1	۱۷۰-۱۵۱	TTGCTCCTCTGCTGTTTCTG	۶۰۰	۵۷	۴۰
R-LT1	۷۵۰-۷۳۱	AAGGTGCAGATGCAGTAAGC			
F-LT2	۶۷۳-۶۵۰	GCTTTATTCTTTGGTTTGGATTTC	۶۰۱		
R-LT2	-۱۲۳۱ ۱۲۵۰	GGTGCCATACGTTCTGGAAG			
F-LT3	-۱۱۵۱ ۱۱۷۰	TGGATCCAGTAGCAGAGAGG	۵۸۰		
R-LT3	-۱۷۱۱ ۱۷۳۰	TCCTAATTACAGGCATGCC			
F-LT4	-۱۵۱۵ ۱۵۳۳	ACAAGCACTCACCAAAAGC	۵۸۵		
R-LT4	-۲۰۸۱ ۲۱۰۰	GATGAGCCTCATGAGCCTTG			
F-LT5	-۲۰۱۹ ۲۰۴۰	CTAGACTTTGCAAAACCATTTC	۵۴۹		
R-LT5	-۲۵۴۹ ۲۵۶۸	GGCTATTTTGCCTTTCACA			
F-LT6	-۲۴۶۰ ۲۴۸۱	GGGAAGGCCTTGAATATAAACT	۶۴۲		
R-LT6	-۳۰۸۲ ۳۱۰۲	AGGAAATATGAAGCAGATGCC			

تکثیر ناحیه LTag و ویروس

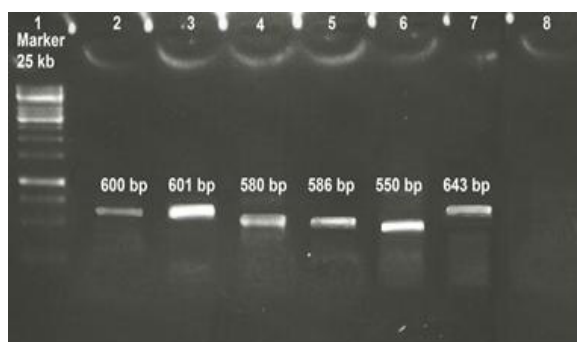
به منظور بررسی توالی ژنوم کامل LT و ویروس، واکنش PCR با شش جفت پرایمر اختصاصی (LT1-LT6) صورت گرفت (جدول ۲). پس از انجام الکتروفورز محصولات PCR، باند اختصاصی توسط کیت در QIA quick Gel extraction kit (آلمان) از روی ژل تخلیص و برای توالی یابی به همراه جفت پرایمرهای مربوطه به شرکت Bionear (کره جنوبی) ارسال شده و در نهایت با استفاده از نرم افزار BioEdit بررسی و آنالیز شدند.

آنالیز آماری

برای بررسی همبستگی آماری بین متغیرهای موجود در جمعیت مورد مطالعه از جمله سن، جنس و مرحله بدخیمی از آزمون فیشر (Fisher's exact test) به کمک نرم افزار SPSS 14 استفاده شد.

یافته ها

مطالعه حاضر در طی یک سال بر روی ۴۰ نمونه بیمار مبتلا به سرطان پوست غیر ملانوم (BCC و SCC) مراجعه کننده به بیمارستان تخصصی پوست رازی تهران انجام شد. کلیه نمونه ها پس از ارزیابی توسط Real Time PCR کمی و هم-چنین تکثیر توسط PCR کیفی (شکل ۱) در نهایت توالی یابی شدند. ۶۰٪ (۱۸ نفر) از بیماران مبتلا به BCC مرد و ۴۰٪ (۱۲ نفر) زن و هم چنین ۷۰٪ (۷ نفر) از بیماران مبتلا به SCC مرد و ۳۰٪ (۳ نفر) زن بودند. به طور کلی میانگین سنی بیماران ۵۵/۳۳ در مردان و ۵۴/۹۱ سال در زنان مبتلا به BCC و هم چنین ۴۷/۵۷ در مردان و ۳۹/۳۳ سال در زنان مبتلا به SCC بود. نمونه های BCC در مراحل مختلف بدخیمی (Locally advanced (LA)، Metastatic (MT) و not evaluable (NE) و نمونه های SCC طبق طبقه بندی بالینی FIGO در مراحل Ia، IIa و IIb قرار گرفتند. ناحیه ای که بافت های هدف از آن جدا شدند در BCC شامل نواحی صورت، ابرو، بینی، لاله گوش، اندام های فوقانی و اندام های تحتانی و در SCC شامل نواحی دهان، زبان و لب بود. هم-چنین ۱۵ نمونه از افراد سالم به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند که میانگین سنی آن ها در مردان ۵۲/۱۴ و در زنان ۴۷ سال بود. این نمونه ها از صورت، پیشانی، اندام های فوقانی و اندام های تحتانی به دست آمدند.



شکل ۱. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز آزمایش PCR بر روی نمونه های مثبت، جهت شناسایی جایگاه موتاسیون ناحیه LT Ag. ردیف ۱: مارکر (SMOBIO, DNA Ladder marker 25kb)، ردیف ۲: موتاسیون LT1، ردیف ۳: موتاسیون LT2، ردیف ۴: موتاسیون LT3، ردیف ۵: موتاسیون LT4، ردیف ۶: موتاسیون LT5، ردیف ۷: موتاسیون LT6، ردیف ۸: نمونه فاقد جهش.

در این مطالعه با توجه به نتایج حاصل از واکنش Real time PCR، تعداد ۳ نمونه بیمار مربوط به کارسینوم سلول بازال (BCC) از لحاظ وجود ژنوم ویروس MCPyV مثبت شدند. در حالی که در تومورهای SCC ژنوم این ویروس مشاهده نشد. بر این اساس در این مطالعه وجود MCPyV در ژنوم کارسینوم سلول بازال ۱۰٪ به دست آمد. با توجه به بررسی های آماری،

نمونه‌های توموری مورد مطالعه با سن، جنس و مرحله بیماری ارتباط معنی داری را نشان نداده است. گزارش‌های متعددی از سرطان‌های پوست منتشر شده که حضور MCPyV در زخم‌های توموری یا پوستی را بررسی می‌کند. مطالعه انجام شده در سال ۲۰۰۹ توسط بکر و همکاران مشابه با نتایجین مطالعه، در بیماران، تفاوت آماری معنی‌داری در مرحله بیماری دیده نشد و DNA ویروس MCPyV نیز در ۱۲/۵٪ از موارد BCC یافت شد (۲). در مطالعه‌ای که توسط هامپراس و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد، جهش در آنتی‌ژن T بزرگ MCPyV، بیش‌تر در MCC نسبت به BCC و SCC مشاهده شد و هیچ رابطه معنی‌داری بین آنتی‌ژن T بزرگ یا کوچک MCPyV و SCC دیده نشد که همانند نتایج حاضر نشان از بعید بودن نقش مستقیم MCPyV در SCC را دارد (۹). در مقابل، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ توسط مرتز و همکاران انجام شد، DNA ویروس MCPyV به‌طور مکرر در BCC (۴۰/۹٪) و SCC (۲۸٪) توسط PCR شناسایی شد (۱۶). هم‌چنین در مطالعه‌ای بر روی بیماران ژاپنی، توالی‌های ویروسی را در ۱۳٪ از موارد SCC (۱۷)، و در مطالعه دیگری در ۱۵٪ از موارد شناسایی شد (۴)، که علت این تناقض با مطالعه حاضر می‌تواند مربوط به اختلاف نژادی باشد. هم‌چنین ممکن است فاکتوری که در یک منطقه و در یک نژاد مشخص عامل مستعد کننده برای ابتلا به بیماری خاص باشد، در نژاد دیگر و در منطقه جغرافیایی متفاوت، تعیین کننده نباشد. به عبارتی ارتباط و همراهی ژنتیکی وابسته به جمعیت می‌تواند در جوامع مختلف نتایج متفاوتی را نشان دهد.

نتیجه‌گیری

براساس یافته‌های مطالعه حاضر، دیده شد که از لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری بین متغیرهای سن، جنس و مرحله بیماری در جمعیت مورد مطالعه وجود ندارد. از طرفی یکی از موارد اثبات کننده نقش تومورزایی ویروس MCPyV بروز موتاسیون‌های پایان دهنده است که منجر به کوتاه شدن پروتئین می‌شود. اما در این مطالعه مشخص شد که توالی ژن LTag ویروس‌های MCPyV جدا شده از نمونه‌های BCC در این مطالعه دارای موتاسیون‌های مرتبط با تومورزایی نبوده و منجر به کوتاه شدن پروتئین نشده‌است. بنابراین نقش تومورزایی هرچند به صورت محدود در این نوع از بدخیمی‌ها توسط این ویروس در این مطالعه منتفی می‌باشد.

سپاسگزاری

جدا شدن ویروس MCPyV از نمونه‌های توموری مورد مطالعه با سن ($P\text{-Value}=0/5$)، جنس ($P\text{-Value}=0/33$) و مرحله بیماری ($P\text{-Value}=0/25$) ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. هم‌چنین با توجه به آنالیز نتایج توالی‌یابی هیچ‌گونه موتاسیونی که منجر به ایجاد کدون پایان و در نتیجه کوتاه شدن پروتئین LTag شود و یا سبب ایجاد موتاسیون تغییر قالب قرائت (Frame shift) شود، مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج بررسی PCR کمی و کیفی بر روی نمونه‌های مورد مطالعه

اطلاعات بالینی					PCR		Real-time PCR
نوع	تعداد	جنس	میانگین سنی (سال)	مراحل بیماری	LT	VP1	تیتراژ DNA ویروسی (کپی در هر سلول)
BC C	۳۰	زن (٪۴۰)	۵۴/۹۱	پیشرفته، متاستاتیک، ناشناخته	+	+	$0/15 \times 10^{-3}$
		مرد (٪۶۰)	۵۵/۳۳				$0/1 \times 10^{-3}$ $0/3 \times 10^{-3}$
SC C	۱۰	زن (٪۳۰)	۳۹/۳۳	0, Ia, IIa, IIb	-	-	-
		مرد (٪۷۰)	۴۷/۵۷				
کنترل (سالم)	۱۵	زن (٪۵۳)	۴۷	-	-	-	-
		مرد (٪۴۷)	۵۲/۱۴				

بحث

سرطان پوست ملانومی و غیر ملانومی از شایع‌ترین انواع سرطان‌ها در بین افراد سفید پوست می‌باشند و در دهه گذشته میزان وقوع آن افزایش داشته‌است. به‌طوری که براساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) سالانه بین ۲ تا ۳ میلیون مورد سرطان پوست غیر ملانومی و ۱۳۲۰۰۰ مورد سرطان پوست ملانومی در جهان گزارش شده است (۲۲). قرار گرفتن در معرض اشعه ماوراء بنفش یکی از علل ایجاد BCC و SCC در افراد می‌باشد (۱،۶). هم‌چنین پولیوما ویروس‌های انسانی به ویژه MCPyV نیز از عوامل ایجاد این بدخیمی می‌باشند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ انجام شد، شواهدی به‌منظور حمایت از این مفهوم وجود دارد که فیبروبلاست‌های پوستی انسانی به‌طور طبیعی اولین نوع از سلول‌های میزبان هستند که توسط MCPyV سبب ایجاد عفونت می‌شوند (۱۵). بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، وجود MCPyV در ژنوم BCC به میزان ۱۰٪ گزارش شد و با توجه به مطالعه‌های آماری، جدا شدن ویروس MCPyV از

تحقیق حاضر نتیجه بخشی از تحقیقات پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد. نویسندگان ضمن تشکر فراوان از مشارکت کلیه بیماران و افراد سالم در انجام پژوهش، از زحمات کلیه پرسنل بیمارستان رازی تشکر و قدردانی می نمایند. همچنین از همکاری ارزشمند جناب آقای دکتر وهاب پور تقدیر و تشکر می گردد.

منابع

1. Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2001; 344(13): 975-83.
2. Becker JC, Houben R, Ugurel S, Trefzer U, Pfohler C, Schrama D. MC polyomavirus Is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *J Invest Dermatol*. 2009; 129(1): 248-50.
3. Dalianis T, Hirsch HH. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology*. 2013; 437(2): 63-72.
4. Dworkin AM, Tseng SY, Allain DC, Iwenofu OH, Peters SB, Toland AE. Merkel cell polyomavirus in cutaneous squamous cell carcinoma of immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol*. 2009; 129(12): 2868-74.
5. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*. 2008; 319(5866): 1096-100.
6. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Fincham S, Coldman AJ, McLean DI, et al. Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. I. Basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 1995; 131(2): 157-63.
7. Gjoerup O, Chang Y. Update on human polyomaviruses and cancer. *Adv Cancer Res*. 2010; 106: 1-51.
8. Gossai A, Waterboer T, Nelson HH, Doherty JA, Michel A, Willhauck-Fleckenstein M, et al. Prospective Study of Human Polyomaviruses and Risk of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016; 25(5): 736-44.
9. Hampras SS, Michel A, Schmitt M, Waterboer T, Kranz L, Gheit T, et al. Merkel cell polyomavirus (MCV) T-antigen seroreactivity, MCV DNA in eyebrow hairs, and squamous cell carcinoma. *Infect Agent Cancer*. 2015; 10: 35.
10. Hashida Y, Imajoh M, Nemoto Y, Kamioka M, Taniguchi A, Taguchi T, et al. Detection of Merkel cell polyomavirus with a tumour-specific signature in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2013; 108(3): 629-37.
11. Imbernón-Moya A, Vargas-Laguna E, Lobato-Berezo A, Martínez-Pérez M, Churrua-Grijelmo M, Aguilar-Martínez A, et al. Simultaneous onset of basal cell carcinoma over skin graft and donor site. *JAAD Case Rep*. 2015; 1(5): 244-6.
12. Korup S, Rietscher J, Calvignac-Spencer S, Trusch F, Hofmann J, Moens U, et al. Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PLoS One*. 2013; 8(3): e58021.
13. Laude HC, Jonchere B, Maubec E, Carlotti A, Marinho E, Couturaud B, et al. Distinct merkel cell polyomavirus molecular features in tumour and non tumour specimens from patients with merkel cell carcinoma. *PLoS Pathog*. 2010; 6(8):e1001076.
14. Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, Adeyemi M, et al. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology*. 2013; 436(2): 295-303.
15. Liu W, Yang R, Payne AS, Schowalter RM, Spurgeon ME, Lambert PF, et al. Identifying the Target Cells and Mechanisms of Merkel Cell Polyomavirus Infection. *Cell Host Microbe*. 2016; 19(6): 775-87.
16. Mertz KD, Paasinen A, Arnold A, Baumann M, Offner F, Willi N, et al. Merkel cell polyomavirus large T antigen is detected in rare cases of nonmelanoma skin cancer. *J Cutan Pathol*. 2013; 40(6): 543-9.
17. Murakami M, Imajoh M, Ikawa T, Nakajima H, Kamioka M, Nemoto Y, et al. Presence of Merkel cell polyomavirus in Japanese cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Virol*. 2011; 50(1): 37-41.
18. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006; 118(12): 3030-44.

19. Sadeghi F, Salehi-Vaziri M, Alizadeh A, Ghodsi SM, Bokharaei-Salim F, Fateh A, et al. Detection of Merkel Cell Polyomavirus Large T-Antigen Sequences in Human Central Nervous System Tumors. *J Med Virol*. 2015;87: 1241-47.
20. Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, Fernández-Figueras MT, et al. Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *Int J Cancer*. 2009; 125(6): 1243-9.
21. Shulstad RM, Proper S. Squamous Cell Carcinoma: A Review of Etiology, Pathogenesis, Treatment, and Variants. *J DNA*. 2010; 2(1): 12-16.
22. Trakatelli M, Barkitzi K, Apap C, Majewski S, De Vries E, EPIDERM group. Skin cancer risk in outdoor workers: a European multicenter case-control study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016; 30(3): 5-11.
23. Vornicova O, Bar-Sela G. Rapid response to vismodegib in a patient with advanced basal cell carcinoma. *JAAD Case Rep*. 2015; 1(5): 267-8.

