

## شناسایی ژن‌های اختصاصی کارسینوم سلول کلیوی و تایید آزمایشگاهی بیان آن‌ها در رده سلولی ACHN در حضور توکسین seh باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

نویسندگان:

مریم صفرپور<sup>۱</sup>، عباس دوستی<sup>۲\*</sup>، محمد سعید جامی<sup>۳</sup> و ۴

- ۱- دانشجوی دکتری گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران  
 ۲- دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران  
 ۳- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران  
 ۴- استادیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.2, Summer 2022

## چکیده:

**مقدمه:** کارسینوم سلول کلیوی (RCC) شایع‌ترین نوع سرطان کلیه در بزرگسالان است. هدف از مطالعه حاضر، دستیابی به ژن‌های اختصاصی در RCC بر اساس مطالعات بیوانفورماتیک و ارزیابی تغییر بیان ژن‌های شناسایی شده در سلول‌های ACHN پس از ترانسفکت ژن توکسین seh باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود.

**روش کار:** ابتدا همبستگی‌های بیانی ژن‌های دخیل در RCC در پایگاه داده TCGA مورد بررسی قرار گرفت و شبکه تعاملات ژن‌ها ساخته شد. به منظور تایید تعاملات ژنی شناسایی شده، مطالعات آزمایشگاهی در مدل سلولی ACHN انجام شد. برای این کار، ژن توکسین استافیلوکوکوس seh در وکتور (+) pcDNA3.1 کلون شد و درون سلول‌های ACHN ترانسفکت شد. پس از تایید عملکرد صحیح وکتور نوترکیب در این سلول‌ها و القای آپوپتوز، بیان ژن‌های منتخب به روش RT-PCR ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** همبستگی‌های بیانی ژن‌های دخیل در آپوپتوز توسط مطالعات *in silico* شناسایی و شبکه تعامل *IncRNA-mRNA* در RCC با موفقیت ایجاد شد. همچنین القای آپوپتوز تحت تاثیر بیان توکسین توسط فلوسیتومتری تایید شد. بیان ژن‌های *SOX9*، *SBF2/ASI*، *MAF* و *c-Maf* در سلول‌های دستورزی شده با وکتور نوترکیب در مقایسه با سلول‌های شاهد، به طور معناداری کمتر بود. همچنین، افزایش بیان ژن‌های *LINC02499* و *LINC00671* در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور *seh*-pcDNA3.1(+) در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) و این تغییر بیان تاییدی بر شناسایی دقیق ژن‌های درگیر در آپوپتوز سلولی RCC بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که شبکه‌های ژنی شناسایی شده در این مطالعه می‌توانند چشم‌انداز تازه‌ای برای پژوهش‌ها با هدف تعیین مسیرهای مولکولی جدید و درمان RCC فراهم کند.

**واژگان کلیدی:** کارسینوم سلول کلیه، تحلیل بیوانفورماتیک، توکسین seh، رده سلولی ACHN

Pars J Med Sci 2022;20(2):10-20

## مقدمه:

عدم عملکرد صحیح DNA در سلول‌ها پدید می‌آیند و در واقع علت اصلی آن تغییر و اختلال در ژن‌های دخیل در کنترل رشد سلول‌ها است [۲]. سرطان کلیه به عنوان یکی از شایع‌ترین سرطان‌های شناسایی شده است و شایع‌ترین نوع سرطان آن از نوع اپیتلیوم کلیوی با نام کارسینوم سلولی کلیه (RCC) است. RCC به ترتیب نهمین و چهاردهمین سرطان رایج در مردان

سرطان یک بیماری ژنتیکی است که در نهایت زاییده اثرات عوامل محیطی است. در سال ۲۰۱۰ بیش از ۱۴ میلیون نفر به سرطان مبتلا که بیش از ۵۰ درصد آن‌ها فوت کردند. از سال ۲۰۱۱ به بعد سرطان از نظر مرگ و میر رتبه اول جهانی را داشته است، در حالی که قبل از آن بیماری‌های قلبی - عروقی مقام اول را به خود اختصاص می‌داد [۱]. سرطان‌ها به علت

\* نویسنده مسئول، نشانی: گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران  
 تلفن تماس: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰ پست الکترونیک: bio.gene84@gmail.com

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۸

اصلاح: ۱۴۰۱/۰۴/۰۴

دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۷

به مقایسه داده‌های TCGA برای دستیابی به ژن‌های اختصاصی دخیل در مسیرهای آپوپتوز سلولی در بیماران کارسینوم سلول کلیوی و در نهایت مقایسه دقت بیان هر ژن در کارسینوم سلول کلیوی با ایجاد مدل رگرسیون بر اساس مطالعات RNA sequence پرداخته شده است.

## روش کار:

### مطالعات *in silico*

با استفاده از پایگاه داده TCGA با کمک بسته TCGAbiolinks داده‌های RNA sequence مربوط به کل نمونه‌های سرطانی کلیه و طبیعی که در سایت TCGA (اطلس ژنوم سرطان) موجود است، در حالت HT seq count دانلود شد. همچنین، علاوه بر این داده‌های کلینیکی مربوط به هر نمونه نیز استخراج شد. سپس با استفاده از بسته LIMMA و روش TMM داده‌های حاصل نرمال و در مقیاس لگاریتمی اختلاف بیان ژن‌ها بین نمونه‌های سرطان کلیه و طبیعی محاسبه و ژن‌هایی با معیار  $\log_{2}FC > 2$  و  $\text{adj.p.value} < 0.0001$  انتخاب شدند. سپس یک مدل رگرسیون برای محاسبه دقت هر ژن ارائه و دقت مربوطه محاسبه شد. همچنین مسیرهای بیولوژیکی فعال شده توسط GO enrichment بررسی شد. در مرحله آخر با استفاده از Cytoscape برای ژن‌هایی که دارای همبستگی بیانی هستند، شبکه‌های بیانی ترسیم و بر اساس آن، ژن‌هایی که بیشترین گروه را تشکیل داده بودند انتخاب و برای مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفتند.

### مواد، باکتری، سلول و کیت‌ها

در این مطالعه، پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+)-*seh* و پلاسمید دست نخورده (خالی) pcDNA3.1(+). از شرکت Generay Biotech چین تهیه شدند. توالی ژن هدف *seh* (با طول ۷۳۸ جفت باز) در ناحیه *BamHI/EcoRV* کلون شد و برای بیان بهتر در میزبان یوکاریوتی توسط این شرکت بهینه سازی کدون انجام شد. علاوه بر این، صحت سنتز ژن‌های هدف با هضم آنزیمی توسط شرکت سازنده تایید شد. از باکتری *E. coli* سویه TOP10 برای تکثیر پلاسمیدهای نامبرده بهره گرفته شد. شایان ذکر است که کیت استخراج پلاسمید (یکتا تجهیز آزما، ایران) برای تخلیص پلاسمیدها از باکتری *E. coli* و کیت تشخیص آپوپتوز Annexin-V-FITC/Propidium iodide برای بررسی القای آپوپتوز به کار گرفته شد. سلول رده سرطان کلیه به نام ACHN (بانک سلولی ایران) برای انجام مطالعات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار

و زنان است و شانزدهمین علت مرگ ناشی از سرطان در سرتاسر جهان است. با توجه به پیشرفت برنامه‌های غربالگری بیماران مبتلا به RCC، مشخص شده است که شیوع این سرطان در جهان در حال افزایش است. بالاترین میزان بروز را می‌توان در کشورهای توسعه یافته، اغلب اروپای شمالی و شرقی و آمریکای شمالی یافت [۳-۵]. در ایالات متحده در هر سال ۶۴ هزار مورد جدید RCC و ۱۴ هزار مورد مرگ و میر ناشی از این نوع سرطان گزارش می‌شود. عوامل مهمی که در این بیماری نقش دارند عبارتند از: نژاد، سن و جنسیت. در مردان بالای ۶۰ سال RCC شایع‌تر بوده و بیشترین میزان آن در دهه‌های ۶۰ تا ۸۰ زندگی است [۳]. به دلیل موارد ذکر شده، کنترل و درمان RCC مورد توجه دانشمندان قرار دارد. توکسین‌های باکتری دارای پتانسیل ایجاد مرگ سلولی برای درمان سرطان هستند. در چندین مطالعه (*in vivo/in vitro*) این سموم ظرفیت از بین بردن سلول‌های مورد مطالعه را به طور موثر نشان داده اند و سبب القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) می‌شوند، اما تا امروز تعداد کمی از توکسین‌ها بر توسعه سرطان‌ها بررسی شده‌اند [۶ و ۷]. استفیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک پاتوژن مهم انسانی، باعث ایجاد آپوپتوز در طول عفونت می‌شود. این باکتری، در برخی از بیماری‌ها همچون درماتیت آتوپیک و سپسیس بر شدت و نتیجه بیماری با القای آپوپتوز تاثیر می‌گذارد. بعضی از مطالعات گزارش داده‌اند که بیشتر توکسین‌های استفیلوکوکوس اورئوس منجر به آپوپتوز می‌شوند. به عنوان مثال، توکسین *seh* (Staphylococcal enterotoxin H) باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های اپی‌تلیال پستان گاو می‌شود [۹ و ۸]. این توکسین که به عنوان یک سوپرآنتی‌ژن باکتریایی است، شباهت زیادی به دیگر توکسین‌های این گروه داشته و توالی آمینواسید آن حدود ۳۰ درصد با دیگر اعضای این خانواده همولوژی دارد. سوپرآنتی‌ژن‌ها در کلاس II، MHC ارائه می‌شوند و مقدار زیادی از سلول‌های T را با اتصال متقابل ApC و سلول‌های T فعال می‌کنند. این توکسین یک پروتئین اسیدی با نقطه ایزوالکتریک ۵,۷ است. بیشتر اعضای این خانواده (SEs)، منطقه  $V\beta$  گیرنده‌های سلول‌های T را تحریک می‌کنند، اما *seh* منطقه  $V\alpha$  گیرنده‌های سلول‌های T را تحریک می‌کند [۱۱ و ۱۰]. با توجه به رشد روز افزون مبتلایان به سرطان، شناسایی مسیرهای مختلف برای کنترل و درمان این بیماری نیاز مبرم جامعه جهانی است. بدین منظور، هدف از مطالعه حاضر شناسایی موثرترین مسیرهای مولکولی آپوپتوز در RCC بر اساس مطالعات بیوانفورماتیک و تایید آزمایشگاهی آن‌ها در حضور ژن توکسین *seh* استفیلوکوکوس می‌باشد. در این مطالعه

هنگامی که سلول‌ها به تراکم ۵۰-۷۵ درصد رسیدند مخلوط حجمی حجمی لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (۷/۵ میلی گرم در هر چاهک) و پلاسمید (۲/۵ میلی گرم در هر چاهک) در حجم نهایی ۳۰۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI (بدون آنتی بیوتیک و FBS) به سلول‌ها افزوده شد. پلیت کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با فشار ۵ درصد CO2 به مدت ۴ ساعت انکوبه شد و سپس FBS به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت کشت مجدد به مدت ۲۴ ساعت در همان شرایط انکوبه شد. محیط کشت حاوی ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر [۱۴] نئومايسين برای غربالگری سلول‌های ترانسفکت شده از غیر ترانسفکت شده اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت سلول‌ها انکوبه شدند. نشانگر انتخابی وکتور pcDNA3.1(+) مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک نئومايسين است. در واقع سلول‌های دریافت کننده وکتور زنده می‌مانند و سلول‌هایی که ترانسفکت نشده باشند، در حضور نئومايسين از بین می‌روند. سرانجام، سلول‌های هر گروه با استفاده از ۰/۲۵ درصد آنزیم Trypsin-EDTA (ترموفیشر، آمریکا) جدا شده و در محیط کشت با ۱۰٪ FBS کشت شدند.

### آزمون فلوسایتومتری

برای بررسی اثرات پلاسمید نوترکیب (pcDNA3.1(+)-*seh*) و پلاسمید خالی بر آپوپتوز سلول‌های ACHN، فلوسیتومتری با استفاده از کیت تشخیص آپوپتوز Annexin-V-FITC/ Propidium iodide (ترموفیشر، آمریکا) انجام شد. به طور خلاصه، تعداد  $3 \times 10^5$  از هر گروه سلول ترانسفکت شده (با پلاسمیدهای pcDNA3.1(+)-*seh* و پلاسمید خالی) کشت داده شد. سلول‌ها دو مرتبه با PBS سرد (۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن) شستشو داده شدند و مجدداً در معرض بافر اتصال (binding buffer) قرار داده شدند. سپس، فلورسین ایزوتیوسیانات (FITC) و فسفاتیدیل سرین (PI) طبق دستورالعمل کیت اضافه شدند. سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند و تحلیل سیتومتری آپوپتوز انجام شد [۱۵].

### استخراج RNA و سنتز DNA مکمل

RNA تام سلولی در هر دو گروه ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب (گروه تیمار) و وکتور خالی (گروه کنترل)، با استفاده از محلول RNX-Plus (سینا کلون، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آزما، ایران) و پرایمرهای رندوم هگزامر سنتز شدند. به منظور تایید صحت واکنش ترانسفکت، واکنش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *seh* روی cDNA سنتز شده،

گرفت. برای انجام واکنش PCR و RT-PCR از واکنشگرهای شرکت یکتا تجهیز آزما بهره گرفته شد.

### تکثیر و استخراج وکتور نوترکیب

باکتری E. coli سویه TOP10 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری و در محیط کشت (Luria-Bertani (LB) (مرک، آلمان) کشت داده شد و سپس به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) انکوبه شد. پلاسمیدهای نوترکیب نامبرده و پلاسمید خالی با استفاده از روش کلرید کلسیم (۰/۸ مولار) و شوک حرارتی (۴۲ درجه سانتیگراد برای ۹۰ ثانیه) به درون سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شدند. کلنی‌های ترانسفورم شده در محیط کشت LB آگار، حاوی آمپیسیلین (۳۰ میلی گرم در میلی لیتر) رشد کردند و انتخاب شدند. صحت انجام ترانسفورم با استفاده از روش PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی تایید شد. کلنی‌های ترانسفورم شده در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB Broth حاوی آمپیسیلین در انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت شدند (۱۲). DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید یکتا تجهیز آزما طبق دستورالعمل کیت خالص سازی شد. کیفیت پلاسمیدهای استخراج شده توسط نانودراپ (ترموساینٹیفیک ۲۰۰۰، آمریکا) در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد [۱۳].

### کشت سلول و دست‌ورزی سلول‌ها

رده سلولی ACHN با کد سلولی C206 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری شد و در فلاسک کشت بافت، حاوی محیط RPMI 1640 (بیوایده، ایران) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS، بیوایده، ایران) و ۱۰۰ واحد آنتی بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین در هر ۱ میلی لیتر کشت شد. فلاسک در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در فشار ۵ درصد CO2 تا زمانی که سلول‌ها به تراکم ۷۰-۸۰ درصد برسند، انکوبه شد. به منظور انتقال وکتورها به سلول، سلول‌های ACHN در ۳ خانه از پلیت ۶ خانه‌ای مخصوص کشت شدند. در مجموع دو گروه سلولی انتقال داده شدند: سلول ACHN ترانسفکت شده با پلاسمید pcDNA3.1(+)-*seh* (گروه تیمار)، سلول ACHN ترانسفکت شده با پلاسمید خالی (گروه کنترل) و خانه سوم شامل سلول‌هایی بودند که هیچ گونه سلولی دریافت نکرده بودند (گروه شاهد). سلول‌ها با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (شرکت ترموفیشر، آمریکا) با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، با پلاسمیدهای نامبرده ترانسفکت شدند. به طور خلاصه،  $0.3 \times 10^6$  سلول در خانه‌های پلیت ۶ خانه کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت

بودند شناسایی شدند. در مجموع ۱۲ مورد mRNA مرتبط با آپوپتوز سرطان کلیه، از جمله *Myc*، *c-Myc*، *SOX9*، *N-Myc*، *MAFB*، *MAFA*، *WT1*، *c-Maf*، *MAF*، *TCF11*، *MafG* و *Max* شناسایی شدند. این ژن‌ها با lncRNAهای شناسایی شده همبستگی بیانی داشتند.

تجزیه و تحلیل GO برای بررسی داده‌های کلینیکی مربوط به هر نمونه نیز انجام شد و نتایج نشان داد که این ژن‌ها عمدتاً شامل: تنظیم مثبت بخش متانفرسوس (GO:0072216)، تنظیم تکثیر سلول‌های مزانشیمی (GO:0010464)، مجموعه فاکتور رونویسی هسته‌ای (GO:0044798)، و غیره هستند. پس از تایید اطلاعات کلینیکی ژن‌های انتخابی، شبکه‌های تعاملات ژن‌ها ایجاد شد. برخی از این mRNAها به عنوان انکوژن و برخی به عنوان ژن‌های سرکوب کننده تومور شناسایی شدند. تعامل این ژن‌ها با lncRNAهای شناسایی شده به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. چندین lncRNA در آپوپتوز افزایش بیان و برخی با کاهش بیان شناسایی شدند. شبکه برهمکنش بین ژن‌های انتخابی و lncRNAهایی که کاهش بیان داشتند به طور جداگانه در شکل ۱ و برای ژن‌های انتخابی با lncRNAهایی که افزایش بیان داشتند در شکل ۲ نشان داده شده است. به عنوان نمونه چند مورد از تعاملات شناسایی شده در سرطان کلیه به شرح زیر می‌باشند:

*LINC02499* lncRNA با ژن *c-Maf* و *lncRNA LINC02334:10* با ژن *WT1* همبستگی بیانی منفی نشان دادند. همچنین، *SBF2/AS1* با ژن *SOX9* و *ETS2-10:1* lncRNA با ژن *Myc* همبستگی مثبت نشان دادند.

بیضی‌های سبز رنگ شامل ژن‌هایی که در آپوپتوز کلیه کاهش بیان دارن و مثلث‌های آبی رنگ شامل lncRNAهایی هستند که در آپوپتوز سرطان کلیه افزایش بیان نشان دادند.

### تایید فرآیند کلونینگ و ساخت وکتور نوترکیب

صحت سنتز پلاسمیدها توسط شرکت سازنده با استفاده از توالی‌یابی DNA و هضم آنزیمی تایید شد (شکل ۳-الف). پس از انتقال پلاسمید نوترکیب به *E. coli* سویه TOP10، صحت ورود پلاسمید توسط کشت کلنی‌ها بر روی آمپی سیلین در مرحله نخست و سپس انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *seh* تایید شد. حضور باند ۱۹۳ جفت بازی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی F و R ژن *seh* مؤید صحت انتقال پلاسمید بود (شکل ۳-ب).

انجام شد. محصول PCR حاصل از فعالیت دو پرایمر F و R یک قطعه ۱۹۳ جفت بازی خواهد بود.

### بررسی میزان بیان ژن‌ها

از روش RT-PCR برای ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های گروه تیمار (سلول‌های ترانسفورم شده با پلاسمید pcDNA3.1(+)-*seh*) در مقایسه با گروه کنترل (سلول‌های ترانسفورم شده با وکتور خالی) استفاده شد. جزئیات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است. ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع داخلی استفاده شد. cDNA هر گروه در رقت سریال‌های ۱:۵، ۱:۲۵، ۱:۱۲۵ و ۱:۳۱۲۵ تهیه شد. حجم نهایی برای هر واکنش ۱۳ میکرولیتر بود شامل: ۱ میکرولیتر از هر cDNA نمونه (۵۰ نانوگرم)، ۶/۵ میکرولیتر SYBR green (یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر از هر دو پرایمرهای F/R، و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر. همه واکنش‌ها به صورت تکرار سه تایی انجام شدند. برای هر واکنش q-PCR برنامه دمایی: ۳ دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه دمای اتصال پرایمر در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و ۳۰ ثانیه طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. در نهایت، منحنی ذوب با افزایش دما از ۷۲ درجه سانتیگراد به ۹۵ درجه سانتیگراد (۱ درجه سانتیگراد در ثانیه) رسم شد. برای محاسبه بیان ژن، چرخه‌های آستانه (CT) توسط نرم‌افزار Rotor-Gene Real-time analysis نسخه ۶ رسم شد. تغییرات نسبی بیان ژن‌ها توسط روش لیواک  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  با مقایسه هر ژن هدف و ژن مرجع ارزیابی شد.

### تحلیل آماری

تمامی آزمون‌های انجام شده به صورت سه بار تکرار بودند و نتایج آماری به شکل میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شدند. برای بررسی وجود یا عدم وجود ارتباط معنادار از آزمون تی استفاده شد. نمودارها به کمک نرم افزار GraphPad Prism رسم شد و سطح معناداری آماری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها:

**نتایج مربوط به شناسایی ژن‌ها با بیان متغیر در آپوپتوز سرطان کلیه و ایجاد شبکه تعاملات ژنی**  
به طور کلی در این مطالعه، ۹۴۰ ژن با کاهش بیان و ۹۳۱ ژن با افزایش بیان شناسایی شدند. ۵۷ مورد lncRNA با معیار  $\log_{2}FC > 2$  و  $adj.p.value < 0.0001$  انتخاب شد که در پیشرفت سرطان کلیه دخیل بودند. لیست این انتخاب‌ها در جدول ۲ قابل مشاهده است. سپس، mRNAهایی که با lncRNAها در تعامل

## تایید صحت لیپوفکشن

در شرایط یکسان سلول‌های ACHN به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول (گروه تیمار) پلاسمیدهای نوترکیب pcDNA3.1(+)-*seh* و گروه دوم (گروه کنترل) پلاسمید خالی دریافت کردند. گروه سوم نیز به عنوان گروه شاهد هیچ پلاسمیدی دریافت نکردند. مقاومت و زنده ماندن سلول‌های ترانسفکت شده با وکتورها در برابر آنتی‌بیوتیک نئومایسین، حضور وکتورها در سلول‌های مقاوم شده را تایید می‌کند. این در حالی است که گروه شاهد که هیچ گونه پلاسمیدی را دریافت نکرده بودند، پس از افزودن آنتی‌بیوتیک نئومایسین به محیط کشت آن‌ها از بین رفتند. از سوی دیگر، انجام واکنش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *seh* روی سلول‌های لیپوفکت شده سبب تشکیل باند ۱۹۳ جفت بازی شد و صحت واکنش لیپوفکشن تایید شد (نتایج نشان داده نشده است).

## نتایج فلوسیتومتری

طبق شکل ۴، پس از ترانسفکت سلول‌های ACHN با وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+)-*seh* در مقایسه با سلول‌هایی که با وکتور pcDNA3.1(+)-خالی ترانسفورم شده‌اند، درصد سلول‌ها در مراحل مختلف آپوپتوز و نکروز به روش فلوسیتومتری محاسبه شد. در سلول‌های ACHN ترانسفکت شده با وکتور pcDNA3.1(+)-*seh* در مقابل وکتور خالی، میزان آپوپتوز اولیه ۵۳/۲٪ (در مقابل ۳۵/۰۰٪ در گروه ترانسفکت شده با وکتور خالی) و آپوپتوز ثانویه ۱۷/۹٪ (در مقابل ۶/۸٪ در گروه ترانسفکت شده با وکتور خالی) مشاهده شد. در صورتی که میزان نکروز در هر گروه بسیار ناچیز گزارش شد. همان طور که دیده می‌شود، سلول‌هایی

که با وکتور نوترکیب لیپوفکت شده‌اند، میزان آپوپتوز بالاتری را نسبت به گروه دیگر نشان می‌دهند.

## نتایج تغییر بیان ژن‌ها

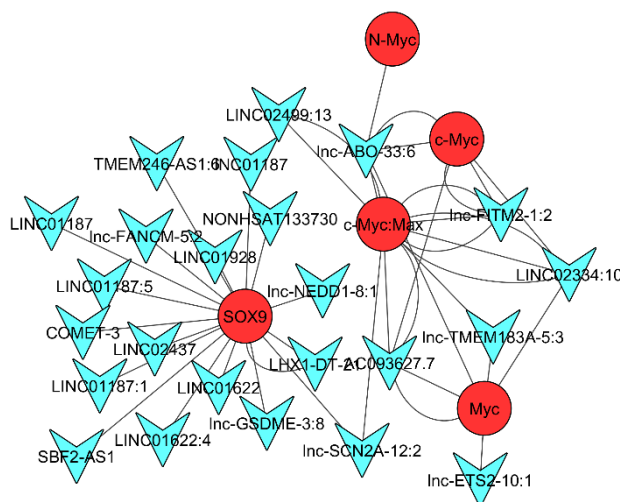
بر طبق نتایج حاصل از مطالعات *in silico* در این پژوهش، ۶۹ مورد mRNA و lncRNA دخیل در مسیرهای آپوپتوز سرطان کلیوی شناسایی شد. از این بین، با توجه به معیار  $\log_{2}FC > 2$  و  $\text{adj.p.value} < 0.0001$  مورد ۳ lncRNA و ۳ مورد mRNA که همبستگی مثبت یا منفی با هم‌دیگر نشان دادند، برای تایید آزمایشگاهی انتخاب شدند که عبارتند از:

۱. lncRNA *SBF2/AS1*, *SOX9*

۲. lncRNA *LINC00671*, *MAF*

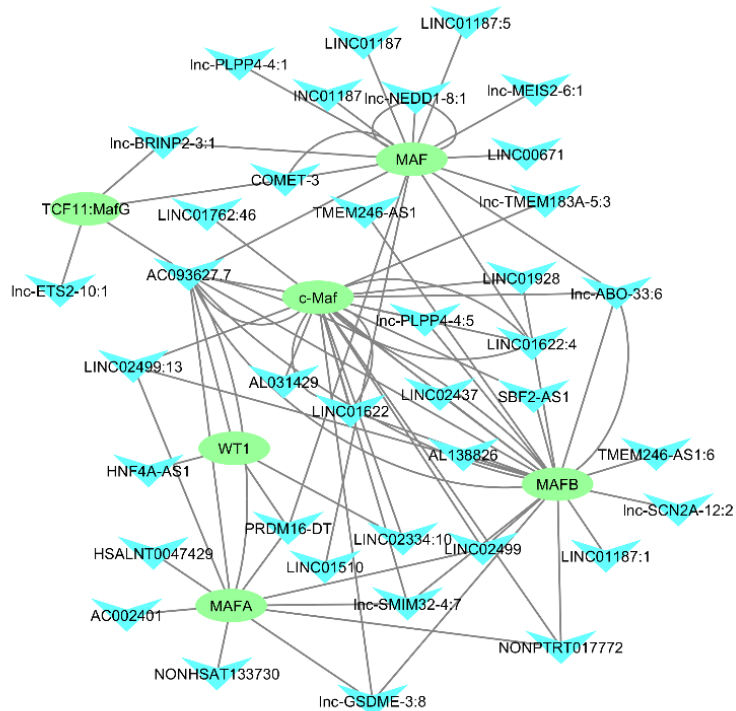
۳. lncRNA *LINC02499*, *c-Maf*

ارتباط افزایش یا کاهش بیان ژن‌های فوق با آپوپتوز RCC در دو گروه سلول تیمار و کنترل به روش RT-PCR بررسی شد و نتایج زیر به دست آمد. در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور pcDNA3.1(+)-*seh* (گروه تیمار)، میزان بیان ژن‌های *SOX9*، *MAF*، *c-Maf* و lncRNA *SBF2/AS1* کاهش معناداری نسبت به سلول‌های گروه کنترل نشان دادند ( $P < 0.05$ ). از سوی دیگر، بیان دو ژن *LINC00671* و *LINC02499* در سلول‌های دست‌ورزی شده نسبت به سلول‌های کنترل، به شکل معناداری نشان از افزایش بیان داشت ( $P < 0.05$ ) (شکل ۵). این نتایج مؤید آن است که شبکه شناسایی شده در این مطالعه با آزمایش‌های ژن‌های شناسایی شده، در راستای کاهش بقای سلول سرطانی و افزایش آپوپتوز پیش می‌رود.

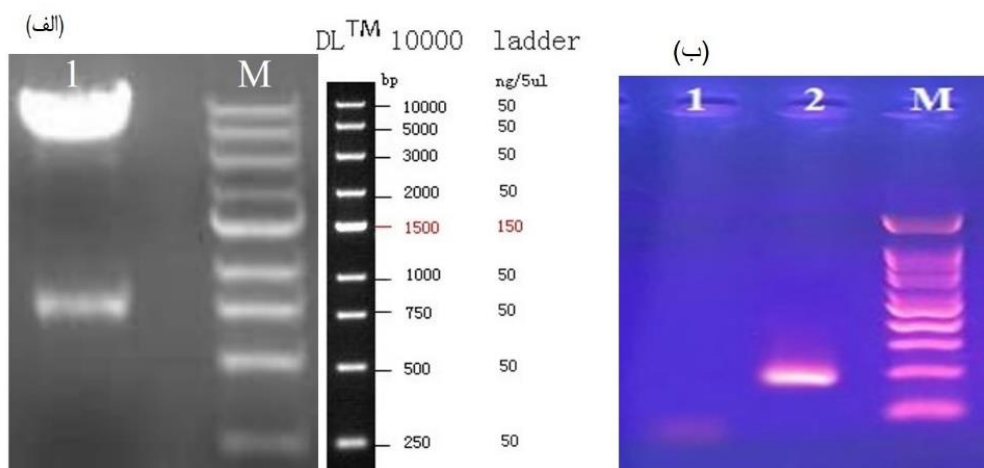


شکل ۱: تعامل بین lncRNA و ژن‌های دخیل در پیشرفت سرطان کلیه طبق مطالعات *in silico*.

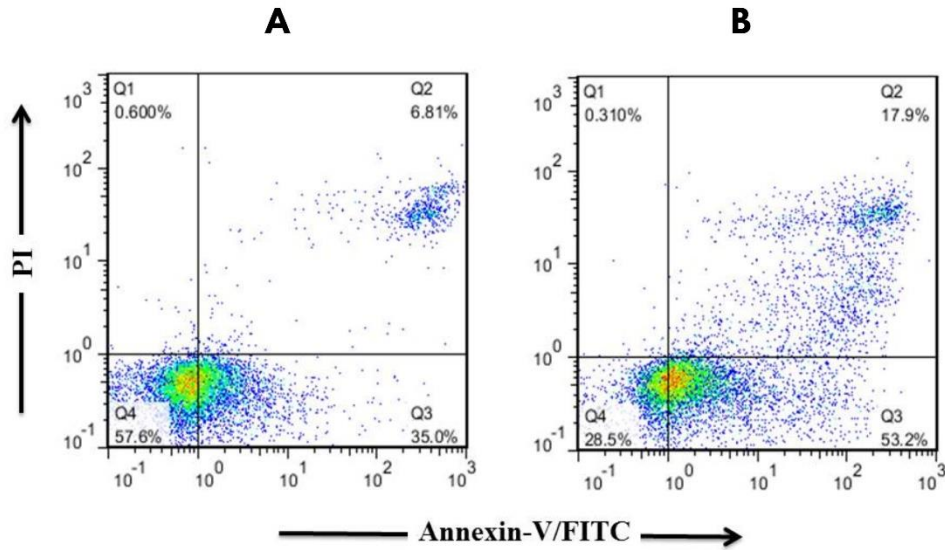
دایره‌های قرمز ژن‌هایی که در آپوپتوز سرطان کلیه کاهش بیان دارند و مثلث‌های آبی رنگ شامل lncRNAهایی که در آپوپتوز سرطان کلیه کاهش بیان نشان دادند.



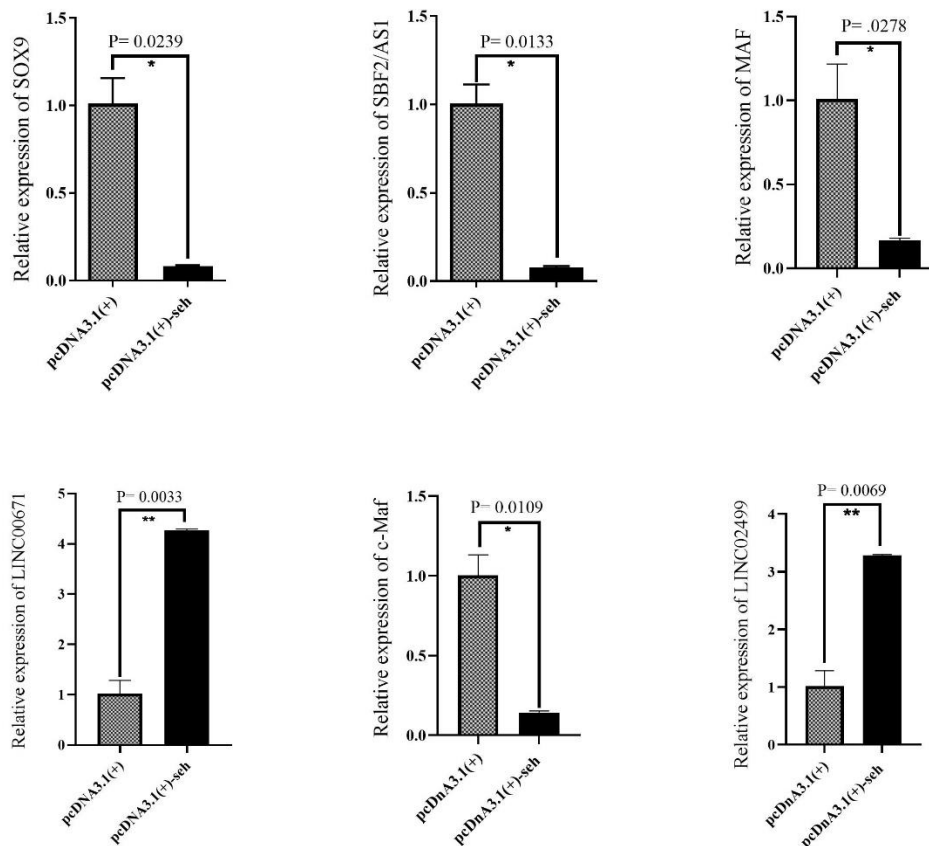
شکل ۲: تعامل بین lincRNA و ژن‌های دخیل در پیشرفت سرطان کلیه طبق مطالعات *in silico*.



شکل ۳: نتایج مربوط به صحت سنتز و ترانسفرم پلاسمید. (الف) هضم آنزیمی پلاسمید *pcDNA3.1(+)-seh* پس از هضم آنزیمی کل قطعه ژنی *seh* از پلاسمید جدا شده است، (ب) واکنش PCR روی پلاسمید نو ترکیب استخراج شده. شماره ۱: وکتور خالی با پرایمرهای ژن *seh*، شماره ۲: باند ۱۹۳ جفت بازی مربوط به قسمتی از ژن *seh* روی وکتور *pcDNA3.1(+)-seh*.



شکل ۴: نتایج آپتوز سلولی حاصل از آنالیز فلوسیتومتری در سلول‌های ACHN. A: سلول‌های دریافت کننده وکتور خالی که درصد زنده ماندن سلول‌ها در آن ۵۷٫۶ درصد است. B: سلول‌های دریافت کننده وکتور نوترکیب که درصد آپتوز اولیه برابر با ۵۳٫۲ درصد و آپتوز ثانویه برابر با ۱۷٫۹ درصد و میزان سلول‌های زنده برابر با ۲۸٫۵ درصد است.  
 Q1: درصد سلول‌های نکروز؛ Q2: درصد سلول‌ها در آپتوز ثانویه؛ Q3: درصد سلول‌ها در آپتوز اولیه؛ Q4: درصد سلول‌های زنده.



شکل ۵: مقایسه سطح بیان ژن‌های درگیر در مسیر آپتوز شناسایی شده در رده ACHN. تغییر بیان در گروه ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب در مقایسه با وکتور خالی. *pcDNA3.1(+)-seh*

جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده

ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر
SOX9	SOX9-F	5'-CATCACCCGCTCGCAATAC-3'
	SOX9-R	5'-CCGGCTGCGTGACTGTAGTA-3'
MAF	MAF-F	5'- TCGCACAAGGAGTTGCTAGA-3'
	MAF-R	5'- GGGTCTTCACAAGCTCCATC-3'
c-Maf	c-Maf-F	5'- TGG AGA TCT CCT GCT TGA GG -3'
	c-Maf-R	5'- AGC AGT TGG TGA CCA TGT CG -3'
SBF/AS1	SBF/AS1-F	5 <sup>2</sup> -AGTTGAGGGTCAAGCTGCTC-3 <sup>2</sup>
	SBF/AS1-R	5 <sup>2</sup> -TAGAGAGCCAGGGGATG-3 <sup>2</sup>
LINC00671	LINC00671-F	5 <sup>2</sup> -ATGGGAAACTGGCCAGATCA-3 <sup>2</sup>
	LINC00671-R	5 <sup>2</sup> -TTCTCTGGCATTCTCCTCC-3 <sup>2</sup>
LINC02499	LINC02499-F	5 <sup>2</sup> -GAAGCACAGGACCTTTAAGTCAC-3 <sup>2</sup>
	LINC02499-R	5 <sup>2</sup> -GCAAGTAGACATGCCAGGAGA-3 <sup>2</sup>
GAPDH	GAPDH-F	5 <sup>2</sup> -TATGATGATATCAAGAGGGTAGT-3 <sup>2</sup>
	GAPDH-R	5 <sup>2</sup> -TGTATCCAAACTCATTGTCATAC-3 <sup>2</sup>

جدول ۲: lncRNAهای شناسایی شده از پروفایل‌های بیانی ژن از پایگاه داده TCGA

نام ژن
lnc-TMEM183A 5:3, lnc-SCN2A-12:2, LINC02499:13, LINC02334:10, lnc-FITM2-1:2, AC093627.7, LINC01622, lnc-ABO-33:6, SBF2-AS1, COMET-3, lnc-ETS2-10:1, INC01187, LHX1-DT-21, LINC01187:5, LINC01928, LINC02437, lnc-NEDD1-8:1, LINC01622:4, lnc-GSDME-3:8, TMEM246-AS1:6, LINC01187, NONHSAT133730, lnc-FANCM-5:2, LINC01187:1, LINC01762:46, HNF4A-AS1, AL031429, lnc-PLPP4-4:5 TMEM246-AS1, PRDM16-DT, HSALNT0047429, LINC01510, lnc-SMIM32-4:7, lnc-BRINP2-3:1, LINC02499, LINC00671, NONPTRT017772, lnc-PLPP4-4:1, lnc-MEIS2-6:1, AC002401, AL138826, PVT1-14, LUCAT1:1, LUCAT1:14, AC023024, LINC00887, lnc-DGCR6-6 :12, NONHSAT060783, KCCAT333, lnc-TMEM121-2:25, AC022509, LINC01077, lnc-EIF2AK3-4:71, LINC00887:7, LINC02577:25, LINC01426, LUCAT1:9, LUCAT1

## بحث:

در این مطالعه که در ارتباط سرطان سلول کلیوی انجام شد، با استفاده از روش‌های نوین *in silico* نسبت به شناسایی mRNAها و lncRNAهای اختصاصی درگیر در مسیر آپوپتوز سرطان و سپس تایید آزمایشگاهی آن‌ها اقدام شد. با استفاده از پایگاه داده TCGA، داده‌های RNA sequence مربوط به کل نمونه‌های سرطانی کلیه و طبیعی جمع‌آوری شد. ژن‌هایی با معیار logFC سرطانی کلیه و طبیعی جمع‌آوری شد. ژن‌هایی با معیار  $adj.p.value < 0.0001$  و  $> 2$  بیان mRNA-lncRNAهای درگیر ایجاد شد. با استفاده از روش فلوسیتومتری القای آپوپتوز در سلول‌های رده ACHN توسط بیان توکسین *seh* مورد تایید قرار گرفت. انتظار میرفت نتایج حاصل از این القای آپوپتوز، در تغییر بیان ژن‌های شناسایی شده در این مطالعه نیز مشاهده شود. به همین منظور، از واکنش RT-PCR جهت ارزیابی تغییر بیان ژن‌ها استفاده شد. آنالیز نتایج حاصل از واکنش RT-PCR نشان دهنده تغییر در بیان ژن‌های انتخاب شده است؛ به طوری که ژن‌های *SOX9*، *MAF*، *c-Maf* و lncRNA *SBF2/AS1* در سلول‌هایی که تحت دست‌ورزی با وکتور نو ترکیب قرار گرفته بودند، نسبت به گروه کنترل کاهش بیان محسوسی را نشان دادند. از سوی دیگر بیان lncRNA *LINC00671* و

IncRNA *LINC02499* نشان دهنده افزایش بیان مشخصی در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل بود. در مرحله مطالعات *in silico* همبستگی‌های مثبت و منفی این ژن‌ها بررسی و مطالعات آزمایشگاهی نتایج همبستگی‌ها را تایید می‌کند به طوری که IncRNA *SBF2/AS1*، *SOX9*، *MAF* همبستگی بیانی مثبت و IncRNA *LINC00671*، *c-Maf* و IncRNA *LINC02499* همبستگی بیانی منفی دارند.

در تحقیقی که در سال ۲۰۱۶ توسط پال و والتر به انجام رسیده به درمان سرطان با القای خودکشی سلول با روش ژن درمانی توسط توکسین‌های باکتریایی پرداخته شده است. در القای آپوپتوز سلولی با روش ژن تراپی، ابتدا پروتئین تبدیل شونده به آنزیم به کار برده می‌شود تا پیش دارو را در داخل سلول از مواد غیر سمی به سمی متابولیسیم کرده و منجر به خودکشی سلول‌های تومور شود. در این پژوهش به سموم باکتری‌ها و نقش آن‌ها در عملکرد بهینه فرآیند ژن درمانی پرداخته شده است [۱۶]. در مطالعه حاضر نیز تاثیر بیان توکسین *seh* در تغییر بیان ژن‌ها، lncRNAها و آپوپتوز رده سلولی ACHN بررسی و نتیجه مشابهی به دست آمده است. از همین رو، پس از انتخاب ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوز



جدیدی از مسیرهای مولکولی را در سرطان کلیه فراهم آورده است. با این حال، این سازوکارها محدودیت‌هایی نیز دارند. به عنوان مثال، همه mRNAها و lncRNAها نمی‌توانند هم زمان در الگوریتم‌های نرم‌افزار پیش‌بینی شوند. از طرف دیگر، برای شبکه‌هایی که با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی پیشنهاد می‌شوند، مطالعات *in vivo* و *in vitro* مورد نیاز خواهد بود.

### نتیجه‌گیری:

شناسایی تغییر بیان mRNAها و lncRNAها، در حضور توکسین‌های باکتریایی در رمزگشایی چگونگی مشارکت این ژن‌ها در آپوپتوز سلول‌های ACHN ارزشمند خواهد بود. در مطالعه حاضر یک شبکه همبستگی بیانی جدید بر اساس مجموعه داده TCGA شناسایی شد. برخی از lncRNAهای پیش‌بینی شده دارای بیان مشترک گسترده با ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در سرطان کلیه بودند. بنابراین، پس از القای آپوپتوز توسط بیان توکسین *seh* استافیلوکوکی، همبستگی‌های بیانی شناسایی شده تأیید شد. بر اساس نتایج حاصل، شبکه‌های شناسایی شده در این مطالعه می‌توانند چشم‌انداز ارزشمندی برای مطالعات سرطان مبتنی بر رابطه بین توکسین *seh* استافیلوکوکی و ژن‌های عملکردی در کارسینومای سلول کلیوی ارائه دهند.

### تشکر و قدردانی:

این مقاله برگرفته از رساله دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد است. بدین وسیله از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. این پروژه در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با شناسه IR.IAU.SHK.REC.1400.023 تصویب شده و تمامی مراحل مطالعه در مورد رده سلولی سرطانی انجام شده است.

### تضاد منافع:

نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان تعارض ندارد.

سرطان کلیه، مطالعات آزمایشگاهی انجام شد. برای این کار، پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+)-*seh* (به عنوان گروه تیمار) و همچنین پلاسمید خالی pcDNA3.1(+)- (به عنوان گروه کنترل) در رده سلولی ACHN ترنسفکت شد. نتایج آزمون FITC Annexin V apoptosis و فلوسیتومتری نشان داد که میزان مرگ سلول ناشی از آپوپتوز در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتورهای نوترکیب در مقایسه با وکتور خالی بیشتر است ( $P < 0.05$ ). بنابراین، نتایج این مطالعه نقش قابل توجه pcDNA3.1(+)-*seh* را در آپوپتوز مورد تأیید قرار داد. پس از اطمینان از القای آپوپتوز، برای تأیید ژن‌ها و همبستگی‌های شناسایی شده تغییر بیان برخی از آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت و تأیید شد. در همین راستا، پژوهشگران در سال ۲۰۲۰ با مطالعه در پایگاه داده GEO نشان دادند که بیان بیش از حد CXCL10 و CXCR4 به عنوان یک عامل موثر در سرطان رذیابی شود [۱۷]. با توجه به گستردگی پایگاه داده TCGA پیشنهاد می‌شود مطالعه فوق نیز در این پایگاه بررسی شود. در مطالعه دیگری که پژوهشگران بر اساس پایگاه داده TCGA و GEO انجام دادند، چندین mRNA دخیل در پیش‌برد سرطان پستان معرفی شد [۱۸]. در مطالعه پیشین [۱۹] مشخص شد که توکسین استافیلوکوکی *seh* توانایی القای آپوپتوز در دو رده سلولی PC3 و ACHN را نسبت به رده سلولی HDF دارد. در همین راستا و در جهت شناسایی ژن‌های اختصاصی هم‌بیان در مسیر القای آپوپتوز، پژوهش حاضر طراحی و اجرا شد. همسو با مطالعات پیشین، نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از تغییر بیان ژن‌های شناسایی شده پس از القای آپوپتوز است که نشان می‌دهد ژن‌های اختصاصی شناسایی شده در تنظیم پیش‌برد سرطان و مسیرهای آپوپتوز نقش دارند. امروزه با وجود پژوهش‌های گسترده و مطالعه کامل تعدادی از lncRNAها، همچنان نقش عملکردی برخی از آن‌ها در سرطان نامشخص است. لیو و همکارانش نشان دادند که *HOTAIR* به عنوان یک ceRNA عمل می‌کند و هدف miR-331-3p است، همچنین می‌تواند در تنظیمات پس از ترجمه فعالیت کند و ژن *HER2* را فعال کند. بنابراین mRNAها، lncRNAها و miRNAها یک شبکه نظارتی را برای تعامل ژن‌ها نشان می‌دهند [۲۰]. از این رو، با استفاده از این روش‌ها، می‌توان lncRNAهای مرتبط با بیماری‌های بیشتری را شناسایی کرد. مطالعه حاضر دیدگاه

## References:

1. Parsa N. Cellular and molecular basis of cancer in humans. *Cell Tissue J* 2012;2(4):365-76.
2. Athena C, Randolph M. Evolutionary foundations for cancer biology. *Evol Appl* 2013; 6(1): 144-59.
3. Nabi S, Kessler ER, Bernard B, Flaig TW, Lam ET. Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology. *F1000Res* 2018;7: 1-10.
4. Medina-Rico M, Ramos HL, Lobo M, Romo J, Prada JG. Epidemiology of renal cancer in

- developing countries: Review of the literature. *Can Urol Assoc J* 2018;12(3):E154.
5. Sánchez-Gastaldo A, Kempf E, del Alba AG, Duran I. Systemic treatment of renal cell cancer: a comprehensive review. *Cancer Treat Rev* 2017;60:77-89.
  6. Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2010;10(11):785-94.
  7. Pahle J, Menzel L, Niesler N, Kobelt D, Aumann J, Rivera M, et al. Rapid eradication of colon carcinoma by *Clostridium perfringens* Enterotoxin suicidal gene therapy. *BMC Cancer* 2017;17(1):1-4.
  8. Liu Y, Chen W, Ali T, Alkasi R, Yin J, Liu G, et al. Staphylococcal enterotoxin H induced apoptosis of bovine mammary epithelial cells in vitro. *Toxins* 2014;6(12):3552-67.
  9. Zhang X, Hu X, Rao X. Apoptosis induced by Staphylococcus aureus toxins. *Microbiol* 2017;205:19-24.
  10. Rudenko NV, Karatovskaya AP, Noskov AN, Shepelyakovskaya AO, Shchannikova MP, Loskutova IV, et al. Immunochemical assay with monoclonal antibodies for detection of staphylococcal enterotoxin H. *J Food Drug Anal* 2018;26(2):741-50.
  11. Petersson K, Pettersson H, Skartved NJ, Walse B, Forsberg G. Staphylococcal enterotoxin H induces V $\alpha$ -specific expansion of T cells. *J Immunol* 2003;170(8):4148-54.
  12. Hekmatimoghaddam S, Ahmadi T, Pourrajab F, Dehghani Firoozabadi A, Rahmani K. Altered expression of DNMT3A gene in B-cell acute lymphoblastic leukemia by mercaptopurine. *JUMS* 2021;19(1):44-53.
  13. Safarpour M, Kazemi Z, Doosti E, Doosti A. Cloning tagD gene from helicobacter pylori in PFLAG-CMV-3 eukaryotic vector to generate a DNA vaccine. *JUMS* 2016;14(4):43-50.
  14. Seim I, Jeffery PL, Thomas PB, Walpole CM, Maugham M, Fung JN, Yap PY, O'Keefe AJ, Lai J, Whiteside EJ, Herington AC. Multi-species sequence comparison reveals conservation of ghrelin gene-derived splice variants encoding a truncated ghrelin peptide. *Endocrine* 2016;52(3):609-17.
  15. Sotoodeh Jahromi A, Moradzadeh M, Kargar M, Kafizadeh F, Jamalidoust M. Effect of Crocin on miRNA-15a expression in EBV infected transformed B cell. *JUMS* 2020;18(3):21-31.
  16. Pahle J, Walther W. Bacterial toxins for oncoleaking suicidal cancer gene therapy. *Curr S Cancer Gene Ther* 2016; 209: 95-110.
  17. Chuan T, Li T, Yi C. Identification of CXCR4 and CXCL10 as potential predictive biomarkers in triple negative breast cancer (TNBC). *Med Sci Moni* 2020;26:e918281-1.
  18. Xiao B, Hang J, Lei T, He Y, Kuang Z, Wang L, Chen L, He J, Zhang W, Liao Y, Sun Z. Identification of key genes relevant to the prognosis of ER-positive and ER-negative breast cancer based on a prognostic prediction system. *Mol Biol Rep* 2019;46(2):2111-9.
  19. Safarpour-Dehkordi M, Doosti A, Jami MS. Impacts of the Staphylococcal Enterotoxin H on the Apoptosis and lncRNAs in PC3 and ACHN. *Mol Gen Microbiol Virol* 2020;35(3):180-8.
  20. Liu XH, Sun M, Nie FQ, Ge YB, Zhang EB, Yin DD, et al. LncRNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate HER2 expression by sponging miR-331-3p in gastric cancer. *Mol Cancer* 2014;13(1):92.

## Identification of renal cell carcinoma specific genes and in vitro confirmation of their expression in ACHN cell line in the presence of Staphylococcus aureus toxin *SEH*

Maryam Safarpour<sup>1</sup>, Abbas Doosti<sup>2\*</sup>, Mohammad-Saeid Jami<sup>3,4</sup>

Received: 2022.05.07

Revised: 2022.06.25

Accepted: 2022.06.29

1. PhD Student at Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Associate Professor at Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Assistant Professor at Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
4. Assistant Professor at Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.2, Summer 2022

Pars J Med Sci 2022;20(2):10-20

### Abstract:

#### Introduction:

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common type of kidney cancer in adults. The aim of the present study was to obtain specific genes in RCC, based on bioinformatics studies and to evaluate the expression change of candidate genes in ACHN cells after transfection of the *seh* gene of Staphylococcus aureus.

#### Material and Methods:

The expression correlations of genes involved in RCC were investigated in the TCGA database, and networks of genes was constructed. In vivo studies were performed in the ACHN cell model, in which the staphylococcal *seh* gene was cloned into the pcDNA3.1 (+) vector and transfected into ACHN cells. After confirming the correct function of the recombinant vector in these cells and inducing apoptosis, the expression of candidate genes was evaluated.

#### Results:

The results showed the successful identification of the expression correlations of genes involved in apoptosis and lncRNA-mRNA interaction network in RCC. Induction of apoptosis under the influence of toxin expression was confirmed by flow cytometry. Expression of *SOX9*, *SBF2/AS1*, *MAF* and *c-Maf* genes in cells ordered by recombinant vector was significantly reduced compared to control cells. Also, increased expression of *LINC00671* and *LINC02499* genes was observed in cells transfected with pcDNA3.1 (+)- *seh* vector compared to the control group ( $p < 0.05$ ) and This change in expression confirmed the accurate identification of genes involved in RCC cell apoptosis.

#### Conclusion:

The gene networks identified in this study can provide a new perspective for research aimed at identifying new molecular pathways and treating RCC.

**Keywords:** Kidney Cell Carcinoma, Bioinformatics Analysis, *SEH* Toxin, ACHN Cell Line

\* Corresponding author Email: bio.gene84@gmail.com