

شناسایی بیومارکرهای تشخیصی در سرطان کلیه با استفاده از آنالیز داده‌های RNAseq و تایید آنها به واسطه‌ی qRT-PCR

چکیده

دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۰۱ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۰ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳ آنلاین: ۱۴۰۳/۰۶/۰۱

زمینه و هدف: کارسینوم سلول کلیوی شفاف (Clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) شایعترین تومور بدخیم کلیه است و نرخ مرگومیر بالایی دارد. پاتورژن این سرطان پیچیده است و بیومارکرهای کارآمد برای تشخیص و پیش‌بینی آن محدود هستند. هدف این مطالعه شناسایی ژن‌های پیش‌بینی‌کننده در ccRCC از طریق تحلیل بیوانفورماتیک و تأیید آزمایشگاهی آنها بود.

روش بررسی: مطالعه حاضر از نوع مورد-شاهدی بود که نمونه‌گیری از بیماران و افراد سالم از بیمارستان لسانی‌نژاد تهران طی بازه مهر ۱۴۰۱ تا فروردین ۱۴۰۳ انجام شده و مراحل آزمایشگاهی روی نمونه‌ها در آزمایشگاه دکتر رستگار واقع در خیابان دکتر قریب، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران آغاز گردید. در ابتدا از طریق بیوانفورماتیک ژن‌های با بیان متفاوت در بیماران ccRCC با استفاده از داده‌های پروفایل بیان ژن از پایگاه داده Gene expression omnibus (GEO) با شماره GSE213324 شناسایی شدند. تحلیل داده‌ها با وب سرور Galaxy انجام شد و برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین با نرم‌افزارهای Cytoscape و STRING بررسی گردید و پس از بررسی موارد دیگر، در نهایت، دو ژن برای آزمایش Real-time PCR انتخاب شدند.

یافته‌ها: تحلیل بیوانفورماتیک منجر به شناسایی ۴۰۶۵ ژن با بیان متفاوت در بافت‌های RCC نسبت به بافت‌های سالم شد. این ژن‌ها در مسیرهای مرتبط با پاسخ‌های ایمنی و بیماری‌های کلیوی نقش دارند. پس از ترسیم شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین و شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت در بافت کلیه و خون، دو ژن MTTP و CALCA برای بررسی انتخاب شدند. در آزمون Mann-Whitney U test بیان ژن CALCA در گروه بیماران به‌طور معناداری ($P < 0.05$) کاهش یافت، اما کاهش بیان ژن MTTP معناداری نداشت.

نتیجه‌گیری: کاهش بیان ژن CALCA می‌تواند به‌عنوان بیومارکر مفید برای تشخیص ccRCC مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: نشانگرهای زیستی سرطان، ژن CALCA، سرطان سلول کلیوی شفاف، سرطان کلیه، ژن MTTP.

فاطمه سادات زنده‌دل^۱، سید عبدالحمید انگجی^{۱*}، بهناز بیک‌زاده^۲، بهزاد ناروئی^۳، مهدی محمدی^۴

۱- گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
۲- گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۳- گروه اورولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.
۴- گروه اورولوژی، مرکز تحقیقات اورولوژی و نفرولوژی، مرکز پزشکی شهید لسانی‌نژاد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم سلولی و مولکولی.

تلفن: ۰۲۱-۸۳۲۹۲۲۰

E-mail: angaji@khu.ac.ir

مقدمه

بیش از ۱۰۰۰۰۰۰ مرگومیر در سال می‌شود و همچنان در برابر درمان مقاوم است. کارسینوم سلول‌های شفاف کلیه (Clear cell renal cell carcinoma, (ccRCC) که مسئول حدود ۷۵٪ از تمامی موارد RCC است، سالانه بیشتر از سایر ساب‌تایپ‌های سرطان کلیه منجر به مرگ می‌شود که این امر آن را به یکی از کشنده‌ترین تومورهای اورولوژی

یکی از عوامل اصلی مرگومیر ناشی از سرطان در سراسر جهان، کارسینوم سلول‌های کلیه (Renal cell carcinoma, RCC) است که حدود ۳٪ از تمامی سرطان‌های انسانی را تشکیل می‌دهد و منجر به

آنالیزهای بیوانفورماتیک: داده‌های RNA-Seq از مجموعه داده GSE213324. شامل بافت توموری کلیه انسان و نمونه‌های بافت سالم کلیه که در آنالیز In silico مورد بررسی قرار گرفتند. تمام پروفایل‌های بیان ژن از داده‌های ثانویه Pair-ended بودند که از پایگاه داده GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی دانلود شده بودند.

در این مطالعه برای آنالیز داده‌ها، وب سرور گلکسی (<https://usegalaxy.eu>) مورد استفاده قرار گرفت. Galaxy تجزیه و تحلیل‌های پیچیده بیوانفورماتیک را با تعبیه ابزارهای لازم برای آنالیزهایی مانند کنترل کیفیت، هم‌ترازی، کمی‌سازی و آنالیز بیان دیفرنشیال داده‌های RNA-Seq ساده می‌کند.^۷ مجموعه داده به سرور وب Galaxy آپلود شد تا ژن‌های با بیان متفاوت شناسایی شوند. جدول کانت محاسبه شده در Galaxy پس از کنترل کیفیت داده‌ها با ابزار fastQC و مپینگ توالی‌ها با ژنوم رفرنس با استفاده از ابزار HISAT2، با استفاده از ابزار DESeq2، به یک فایل اکسل تبدیل شد و برای شناسایی ژن‌های DEG بین بافت‌های توموری و نمونه‌های بافت طبیعی مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه، ژن‌هایی که دارای مقدار تغییرات لگاریتمی (Log fold change) بیشتر از دو و کمتر از -۲ و مقدار $P < 0.01$ بودند، به ترتیب به‌عنوان ژن‌های Up-regulated و Down-regulated در نظر گرفته شدند.

پس از شناسایی ژن‌های DEG، برای بررسی تعاملات بین پروتئین‌ها، شبکه پروتئین-پروتئین (PPI) ساخته شد. این شبکه PPI با استفاده از نرم‌افزارهای سایتواسکیپ (ورژن ۳,۹,۱) و اپ STRING ترسیم شد. در شبکه‌های PPI، ارتباطات فیزیکی بین پروتئین‌ها نمایش داده می‌شوند، به طوری که گره‌ها پروتئین‌ها و خطوط تعاملات بین آنها را نمایان می‌کنند. تنظیمات برای ساخت شبکه PPI شامل استفاده از همه منابع برهم کنشی، از جمله متن کاوی، آزمایش‌ها و سایر پایگاه‌های داده و همچنین محدود کردن گونه به "Homo sapiens" و امتیاز اینتراکشن بیشتر از ۰/۴ بود.

به‌همراه پیش‌بینی شبکه، استرینگ قابلیت طبقه‌بندی پروتئین‌ها را در مسیرها و سیستم‌های عملکردی مربوطه به آنها را دارد که این اطلاعات شامل سه شاخه انتولوژی ژن (فرآیند زیستی)، عملکرد مولکولی و اجزاء سلولی، مسیرهای KEGG، کلمات کلیدی UniProtKB، Compartments و TISSUES است. این طبقه‌بندی

تبدیل کرده است.^۸ ccRCC را می‌توان به چهار مرحله پاتولوژیک شامل گرید I تا IV طبقه‌بندی کرد. مرحله IV پیش‌آگهی بدی دارد و نرخ بقای پنج ساله آن ۲۰٪ است.^۳

در دهه‌های اخیر، پیشرفت‌هایی در تکنیک‌های مولکولی به درک بهتر از ccRCC و توسعه عوامل درمانی جدید منجر شده است. پروفایل بیان ژن یک ابزار بسیار قدرتمند برای مطالعه فنوتیپ‌های سلولی است. در واقع، مطالعات متعددی که بیان mRNA را تجزیه و تحلیل می‌کنند، توانسته‌اند ژن‌های مرتبط با ccRCC را در سطح ترانسکریپتوم مشخص کنند. کل ترانسکریپتوم به طور کلی به مجموعه تمام مولکول‌های RNA در یک سلول در یک نقطه زمانی معین اشاره دارد.

با درک تغییرات توالی و فراوانی هر ژن در سلول، می‌توانیم بهتر بفهمیم که کدام مسیرها در کدام نقاط زمانی یا موقعیت‌ها فعال هستند. هر نوع سلول نرمال و سرطانی مسیرهای فعال شده خاصی در مقاطع زمانی مختلف دارند و ترانسکریپتوم برای منعکس کردن تفاوت در نوع و حالت بافت متفاوت است.^۹ توالی یابی نسل بعدی با توالی‌یابی RNA (RNA-seq) ابزاری قدرتمند برای کشف، تعیین پروفایل و کمی‌سازی RNA در سراسر ترانسکریپتوم است. این رویکرد با میکروآرایه‌ها متفاوت است در اینجا RNA-seq می‌تواند همه رونوشت‌های RNA را در یک نمونه توالی‌یابی کند، مستقل از اینکه قبلاً شناخته شده باشند یا خیر.^۶

روش بررسی

در این مطالعه‌ی مورد-شاهدی که در بازه‌ی مهر ۱۴۰۱ تا فروردین ۱۴۰۳ و در آزمایشگاه دکتر رستگار واقع در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران آغاز گردید، در ابتدا با توجه به اهمیت تعیین پروفایل بیان ژن در ccRCC، برای شناسایی کاندیدهای تشخیص این نوع از سرطان، داده‌های RNA-seq حاوی اطلاعات بیان ژن در بافت بیماران مبتلا به سرطان کلیه، آنالیز شده و پس از شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) در بافت‌های سرطان کلیه در مقایسه با بافت‌های طبیعی، دو ژن که هم در بافت کلیه و هم در بافت خون، بیان متفاوتی در بیماران مبتلا به سرطان کلیه داشتند، به‌عنوان کاندیدهای تشخیصی سرطان کلیه انتخاب شدند.

برای ساخت cDNA از RNA استخراج شده، پس از تعیین مقدار و غلظت RNA با استفاده از نانودراپ، از کیت سنتز AddBio cDNA استفاده شد. ابتدا، نمونه RNA به همراه بافر 10x و مخلوط dNTPs و Oligo dT و Random hexamer و آنزیم RT اضافه و در دمای ۲۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. در مرحله بعد، واکنش در دمای ۵۰ °C به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۹۵ °C به مدت پنج دقیقه برای غیرفعالسازی آنزیم RT قرار گرفتند. محصول واکنش در دمای ۴ °C نگهداری و سپس در دمای ۲۰ °C ذخیره شد. برای تأیید سنتز cDNA، از واکنش PCR برای ژن کنترل داخلی GAPDH استفاده شد. واکنش PCR شامل مراحل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت سه دقیقه، چرخه‌های PCR با ۳۵ تکرار و گسترش نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت سه دقیقه بود. در پایان، برای تشخیص باندهای DNA، از ژل الکتروفورز آگارز استفاده شد و در دستگاه الکتروفورز مشاهده شد. پروفایل دمایی سنتز cDNA (a) و PCR (b) در جدول ۱ درج شده است.

با توجه به حساسیت بالای تست Real-time PCR در تشخیص تغییرات کوچک در بیان ژن در مقایسه با تکنیک‌های میکروآرای، این تکنیک به عنوان یک روش قابل اعتماد برای سنجش بیان ژن‌های انتخاب شده، مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا، برای دو ژن MTTP و CALCA که توسط آنالیزهای بیوانفورماتیک انتخاب شده بودند، طراحی پرایمر انجام شد. توالی‌های این ژن‌ها از پایگاه داده NCBI دانلود شده و سپس با استفاده از نرم‌افزار Oligo7، پرایمرهای اختصاصی برای نواحی Exon-exon طراحی شدند. پس از آن، پرایمرهای طراحی شده با استفاده از ابزارهای OligoAnalyzer و Primer-BLAST آنالیز و ارزیابی شدند. توالی پرایمرهای طراحی شده در جدول ۲ درج شده است.

در مرحله بعد، از روش SYBR Green برای انجام تست Real-Time PCR استفاده شد. برای انجام این تست، از Master mix (Amplicon) و cDNA سنتز شده از RNA استخراج شده از خون بیماران مبتلا به ccRCC و پرایمرهای ژن‌های MTTP، CALCA و GAPDH، در دو واکنش مجزا و به صورت دو بار تکرار استفاده شد و تطابق نمودار منحنی تکثیر و ذوب دو نمونه تکرار با یکدیگر برای تمامی نمونه‌ها بررسی شد. همچنین تک قله بودن منحنی ذوب که نشان‌دهنده اختصاصی بودن عملکرد پرایمر می‌باشد و استاندارد بودن

براساس اطلاعات انوتیشن‌های مسیرهای پروتئین‌های موجود در دیتابیس استرینگ انجام می‌شود. در پایان فرآیند محاسباتی، تمام پیش‌بینی‌ها به طور خودکار در پایگاه داده‌ی داخلی استرینگ بارگذاری می‌شوند.^{۹۸} در این مطالعه، پس از ترسیم شبکه، پروتئین‌هایی که در شرایط سرطان کلیه، در خون بیان متفاوتی داشتند، به عنوان بیومارکرهای مناسب در نظر گرفته شدند، همچنین مسیرهای KEGG مرتبط با ژن‌های DEG شناسایی شده بررسی شدند.

مطالعات آزمایشگاهی: نمونه خون محیطی بیماران مبتلا به ccRCC با رعایت موازین اخلاقی از مراجعین بیمارستان لبابی‌نژاد تهران در بازه زمانی مهر ۱۴۰۱ تا فروردین ۱۴۰۳ جمع‌آوری شد. جامعه آماری این پژوهش، شامل ۲۶ بیمار مبتلا به ccRCC و ۲۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل بود. حجم نمونه خونی که از هر فرد جمع‌آوری شد، برابر با ۲ ml بود. پس از جمع‌آوری نمونه خون، بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شد و آزمایشات بعدی روی آن انجام گردید زیرا برای رسیدن به نتایج نزدیک به ایده‌آل باید فرآیند استخراج RNA روی خون تازه انجام شود.

پس از جمع‌آوری نمونه‌های خون، استخراج RNA با استفاده از کیت Favorgen و طبق پروتکل شرکت‌سازنده صورت گرفت. این فرآیند شامل استفاده از یک فرمول مبتنی بر نمک برای لیز سلولی، غیرفعال‌سازی Rnase و اتصال RNA به غشای سیلیکا بود. در مراحل استخراج RNA، نمونه‌های خون به میکروتیوب لیبیل‌دار منتقل شده و سپس لایز بافر را اضافه کرده و پس از پینتاژ، به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس و اسپین ورتکس شده و به مدت پنج دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. پس از آن، پروتیناز K اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. به ازای هر ۱۰ دقیقه ورتکس و اسپین ورتکس انجام گردید. سپس اتانول خنک به نمونه‌ها اضافه و پس از ورتکس به مدت پنج دقیقه روی یخ قرار داده شد. محتوای میکروتیوب به ستون RNA Binding منتقل شده و سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد، محلول‌های شستشو اضافه شده و سانتریفیوژ انجام شد. پس از آن، الوشن بافر اضافه شده و سانتریفیوژ انجام شد. در نهایت، پس از روی ژل بردن محتوای میکروتیوب و مشاهده‌ی باندها 28 s و 18 s (با شدت نسبت دو به یک که نشانگر کیفیت خوب استخراج RNA یوکاریوتی می‌باشد)، محلول حاوی RNA خالص در فریزر ۷۰ °C- نگهداری شد.

ژن به‌عنوان ژن‌های Down-regulated در بافت‌های سرطانی کلیه در مقایسه با بافت‌های طبیعی شد. یک هیت مپ و یک ولکانو پلات برای ژن‌های DEG با استفاده از ابزارهای وب سرور گلکسی ترسیم شد (شکل ۱).

نمودار ولکانو پلات، سطوح بیان ژن‌ها را نشان می‌دهد. نقاطی که به سمت مثبت طیف لگاریتم تفاوت بیان قرار دارند، ژن‌هایی را نشان می‌دهند که سطوح بیان بالاتری دارند، درحالی‌که نقاطی که در سمت منفی این طیف واقع شده‌اند، ژن‌هایی با سطوح بیان کمتر را نشان می‌دهند. نقاط موجود در نواحی صفر لگاریتم، نشان‌دهنده ژن‌هایی است که براساس معیار $P < 0.01$ و $|\log_2 FC| > 2$ هیچ تفاوت بیان معناداری ندارند. با ارزیابی روابط بین DEG های مختلف، یک شبکه پروتئین-پروتئین اینتراکشن (PPI) برای ارزیابی اهمیت این DEG ها با استفاده از STRING app نرم‌افزار سایتواسکیپ ساخته شد. این نوع از شبکه به محققان امکان می‌دهد تا بر روی مرتبط‌ترین اینتراکشن‌ها تمرکز کنند و ماژول‌های عملکردی مهم ژن‌های DEG را شناسایی کنند. اینتراکشن بین ژن‌های DEG در این مطالعه، شامل ۲۲۳۰ نود و ۲۵۰۴۵ اینتراکشن بوده و تراکم شبکه ۰/۱۱ بود. برای شناسایی پروتئین‌های مهم در ایجاد بروز سرطان کلیه، شبکه براساس اسکور بیان در بافت‌های کلیه و خون فیلتر شد. پروتئین‌هایی که اسکور بالای سه در خون و بافت کلیه داشتند و همچنین دارای Degree بالای ۲۰ بودند، انتخاب شدند و به‌صورت یک ساب‌نتورک از شبکه اصلی جدا شدند. شبکه جدید شامل ۱۱۶ نود و ۱۱۵۴ اینتراکشن بود (شکل ۲). پس از بررسی پروتئین‌های شبکه و همچنین مطالعه مقالات منتشر شده، دو پروتئین CALCA و MTTP برای بررسی بیشتر در بیماران مبتلا به سرطان کلیه انتخاب شدند و از تست‌های آزمایشگاهی برای ارزیابی آنها استفاده شد. در جدول ۴ مشخصات این دو پروتئین درج شده است.

نتایج مطالعات آزمایشگاهی: پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، با استفاده از پرایمرهای ژن کنترل داخلی GAPDH، یک مرحله PCR برای تایید فرآیند سنتز cDNA انجام شد. (a) و همچنین پس از انجام PCR با پرایمر ژن‌های CALCA و MTTP، محصولات PCR همراه با لدر 1 kb روی ژل آگارز، بارگذاری شد. (b) نتیجه ژل‌های الکتروفورز در شکل ۳ مشاهده می‌شود.

در این مطالعه، نتایج واکنش PCR Real-time برای ارزیابی بیان

منحنی تکثیر که نشان‌دهنده تکثیر مناسب قطعه موردنظر می‌باشد نیز بررسی گردید. در نهایت از میانگین عدد به‌دست آمده از CT نمونه‌های دوبار تکرار برای اعلام نتیجه نهایی استفاده گردید. پروتکل دمایی واکنش Real-time PCR در جدول ۳ درج شده است. داده‌های Real-time PCR براساس مقایسه سیکل‌های آستانه (CT) تحلیل شدند. در این مطالعه، اختلاف CT بین نمونه‌های بیماران مبتلا به ccRCC و نمونه‌های کنترل (افراد سالم) محاسبه شد. ابتدا، با محاسبه اختلاف بیان ژن‌های MTTP و CALCA با ژن کنترل داخلی GAPDH، ΔCt نمونه‌ها محاسبه شد. سپس، با استفاده از فرمول‌های:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ test sample} - \text{Average of } \Delta Ct \text{ Control sample}$$

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Fold change نمونه‌ها محاسبه شد. سپس، با استفاده از SPSS software, version 27 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) نرمال نبودن توزیع داده‌ها، میزان تغییر بیان هر ژن با آزمون غیرپارامتری Mann-Whitney U test محاسبه شد. سطح معناداری $P < 0.05$ به‌عنوان معیار تفاوت بیان معنادار بین گروه‌ها در نظر گرفته شد. در ادامه، نمودارهای مربوط به بیان ژن با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 10 ترسیم شدند. در این مطالعه، از معیارهای Sensitivity و Specificity برای ارزیابی دقت تشخیصی ژن‌ها استفاده شد. سپس، با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 10، نمودارهای ROC (Receiver operating characteristic) ترسیم شد و Area under the curve (AUC) برای هر ژن محاسبه شد تا دقت تشخیصی آنها ارزیابی شود.

یافته‌ها

نتایج آنالیزهای بیوانفورماتیک: آنالیز FastQC داده‌ها در وب‌سرور گلکسی نشان داد که تمامی نمونه‌ها دارای کیفیت خوبی بوده و هیچ نقص جدی در آنها مشاهده نشد. پس از میپینگ و تراز شدن توالی‌ها با ژنوم رفرنس Hg19 (Homo sapiens)، FeatureCounts نشان داد که تعداد کانت‌های تراز شده حدود ۷۰٪ بود که مقدار قابل قبولی برای خوانش ریدهاست. نتایج آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها در دو گروه توموری و نرمال، با استفاده از ابزار DESeq2، منجر به شناسایی ۲۱۲۲ ژن به‌عنوان ژن‌های up-regulated و ۱۹۴۳

ژن‌های CALCA و MTTP در نمونه‌های خون ۴۶ مراجعه‌کننده به بیمارستان لبافی‌نژاد تهران (۲۶ نمونه خون از بیماران مبتلا به سرطان کلیه ccRCC و ۲۰ نمونه خون از افراد سالم) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بیان ژن CALCA در گروه بیماران به‌طور معناداری کاهش یافته است، در حالی که ژن MTTP با وجود نشان دادن کاهش بیان در مراحل اولیه آنالیز، در آزمون Mann-Whitney U test تفاوت بیان معناداری در سطح $P < 0.05$ نشان نداد. هرچند با در نظر گرفتن سطح معناداری $P < 0.01$ ، کاهش بیان ژن MTTP نیز معنادار خواهد شد. شکل ۴a تفاوت‌های بیان ژن‌های CALCA و MTTP را در خون بیماران مبتلا به ccRCC نسبت به افراد سالم نشان می‌دهد. همچنین، نمودارهای ROC نیز، برای ارزیابی دقت تشخیصی و پتانسیل بیومارکری ژن‌های انتخاب شده، ترسیم شدند (شکل ۴b). نتایج نشان داد که AUC برای ژن CALCA برابر با 0.764 و معنادار ($P = 0.01$) بود، در حالی که برای ژن MTTP برابر با 0.58 بود و معناداری نداشت.

جدول ۱: (a) پروفایل دمایی سنتز cDNA

مرحله	دما	زمان
سنتز cDNA	۵۰ °C	۶۰ دقیقه
غیرفعال‌سازی آنزیم RT	۹۵ °C	۵ دقیقه
نگهداری	۴ °C	∞

جدول ۱: (b) پروفایل دمایی PCR

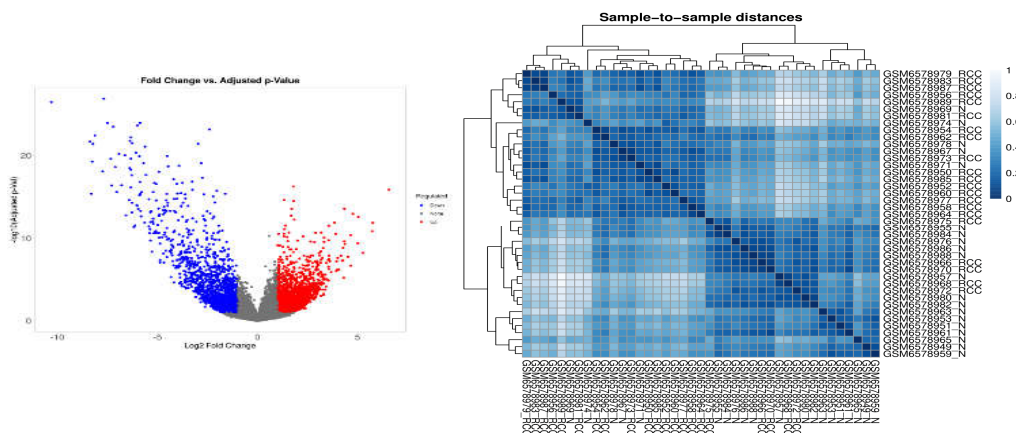
مرحله	دما	مدت زمان	تکرار
دنا تورا سیون اولیه	۹۵ °C	سه دقیقه	یک بار
دنا تورا سیون	۹۵ °C	۳۰ ثانیه	۳۵ بار
اتصال پرایمر	۶۰ °C	۲۰ ثانیه	تکرار
گسترش	۷۲ °C	۳ دقیقه	

جدول ۲: توالی پرایمرهای طراحی شده و پرایمر GAPDH

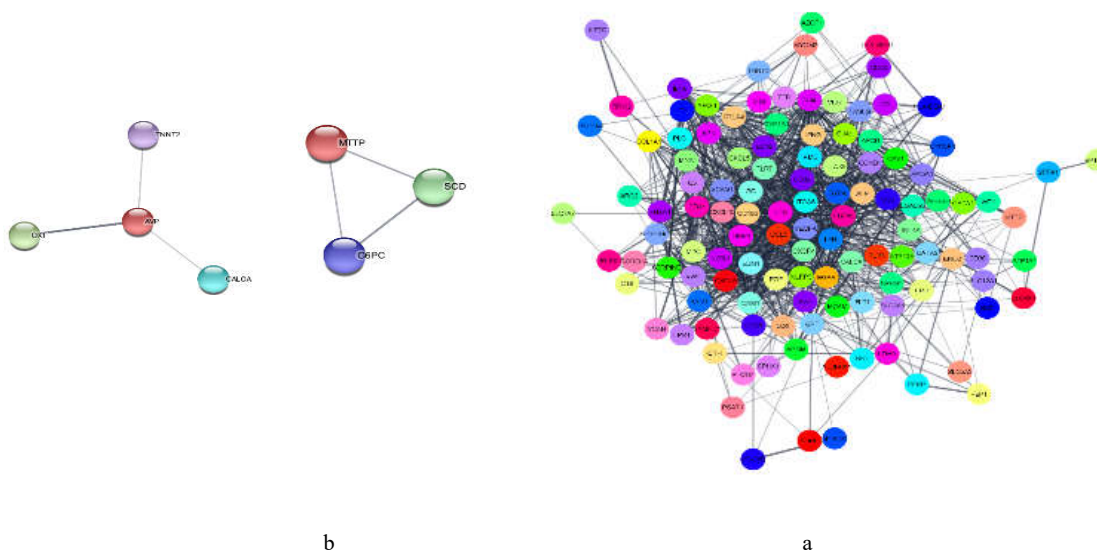
ژن	توالی پرایمر	Tm(°C)	GC content (%)
CALCA	Forward: 5'-GCAGCACCATTGCTCG-3' Revers: 5'-CT CTC TCT TGC TCCTGTCC-3'	F: ۵۸/۸۲ °C R: ۵۹/۵۴ °C	۵۷/۸۹ ۶۰/۰۰
MTTP	Forward: 5'-GTCTTCACGGTAGCCAGGTG-3 Revers: 5'-CAGAGTCCGTCTCTCGTTC-3'	F: ۶۰/۳۹ °C R: ۶۰/۹۹ °C	۶۰/۰۰ ۶۰/۰۰
GADPH	Forward: 5'-CTCAAGATCATCAGCAATGCCT-3' Revers: 5'-ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT-3'	F: ۵۸/۷۸ °C R: ۶۱/۰۶ °C	۴۵/۴۵ ۵۵/۰۰

جدول ۳: پروفایل دمایی qPCR

مرحله	دما	مدت زمان	تکرار
دنا تورا سیون اولیه	۹۵ °C	۱۵ دقیقه	۱ بار
دنا تورا سیون	۹۵ °C	۲۵ ثانیه	
اتصال پرایمر	بسته به دمای ذوب پرایمر متفاوت است	۳۰ ثانیه	۳۵ بار تکرار
گسترش	۷۲ °C	۳۰ ثانیه	



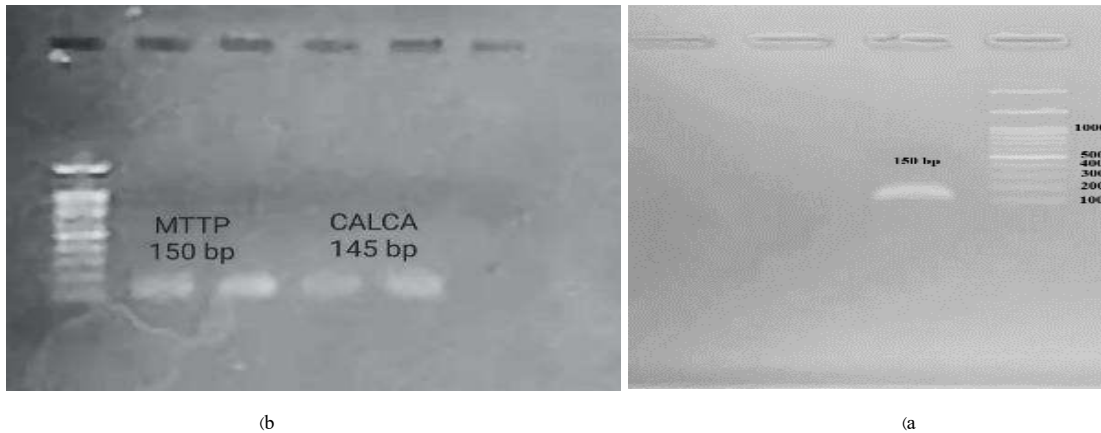
شکل ۱: نمودارهای ولکانو پلات و هیت مپ ژن‌های با بیان متفاوت شناسایی شده در بیماران مبتلا به سرطان کلیه



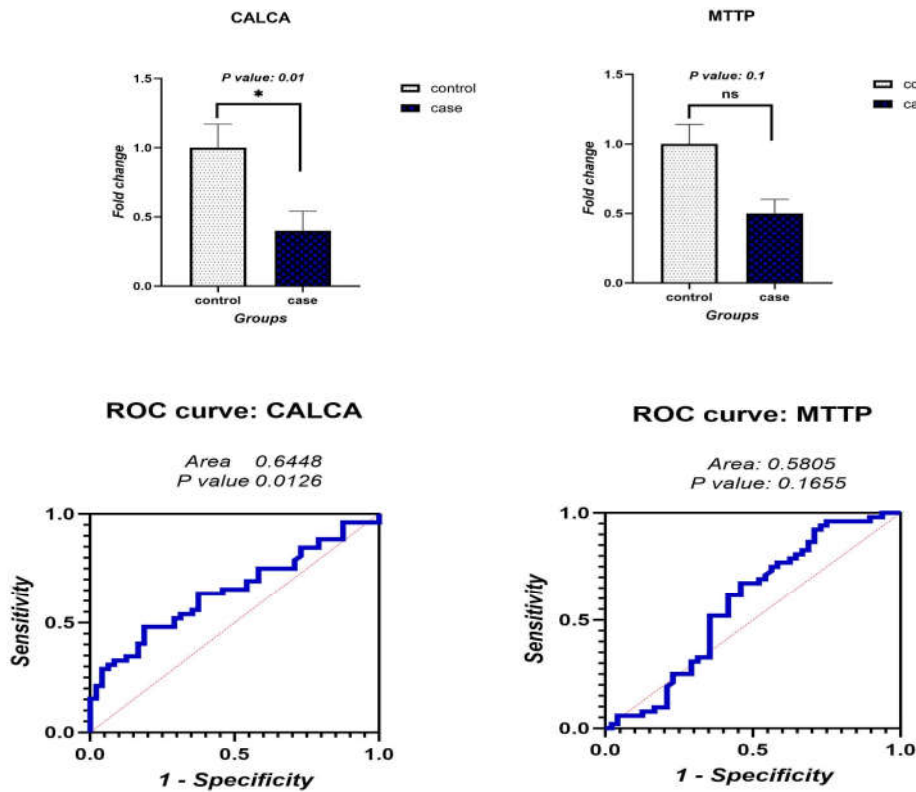
شکل ۲: شبکه حاصل از فیلتر پروتئین‌ها براساس اسکور حضور در بافت کلیه و خون. (a) شبکه حاصل از فیلتر پروتئین‌ها براساس اسکور حضور در بافت کلیه و خون. (b) Sub network ژن‌های MTP و CALCA

جدول ۴: ویژگی‌های آماری و ایتراکشن دو پروتئین CALCA و MTP براساس آنالیزهای انجام شده

tissue::kidney	tissue::blood	BetweennessCentrality	Degree	logFC	Adj-p-value	پروتئین
۳/۰۹	۳/۲	۰/۰۰۳	۵۴	-۵/۶	۰/۰۰۰۰۰۰۰۱	CALCA
۴/۵	۴/۴	۰/۰۰۰۴۰	۲۲	-۴/۴	۰/۰۰۰۰۰۰۰۲	MTP



شکل ۳: (a) ژل آگارز محصول PCR ژن GAPDH. (b) ژل آگارز محصول PCR ژنهای MTP و CALCA.



شکل ۴: (a) تفاوت بیان ژنهای CALCA و MTP در خون بیماران مبتلا به ccRCC در مقایسه با افراد سالم. * $P < 0.05$ است که برای ژن CALCA، ۰/۰۱ و برای ژن MTP، ۰/۱ محاسبه شد. (b) پتانسیل بیومارکری ژنهای CALCA و MTP در تشخیص ccRCC. معناداری برای ژن CALCA، ۰/۰۱ و برای ژن MTP، ۰/۱۶ محاسبه شد.

بحث

می‌شود که می‌تواند به‌طور مستقل انباشت لیپید را افزایش دهد.^{۱۱} تجمع لیپیدها یکی از مهمترین نشانه‌های ccRCC است. مورفولوژی سلولی شفاف از حضور قطرات چربی درون سلولی حاصل می‌شود. این قطرات چربی در شبکه آندوپلاسمی (ER) تولید می‌شوند، به‌عنوان سوخت بیوانرژی و برای تولید غشای سلولی عمل می‌کنند و ممکن است در محافظت در برابر استرس اکسیداتیو و ER نقش داشته باشند.^{۱۲} بنابراین، ممکن است کاهش بیان MTTP در بروز ابتلا به سرطان کلیه نقش داشته باشد. در مطالعه حاضر، کاهش معنادار بیان این ژن در نمونه‌های خون بیماران مبتلا به ccRCC مشاهده نشد، این امر می‌تواند به این دلیل باشد که مقدار RNA در بافت‌های سرطانی بیشتر است و بیان ژن MTTP در بافت‌ها ممکن است بهتر نمایان شود و همچنین دلایل دیگری از جمله تفاوت‌های فردی، تعداد نمونه، یا عوامل محیطی باشد که نیاز به تحقیقات بیشتر برای روشن شدن نقش دقیق MTTP در سرطان کلیه دارد.

در مطالعه حاضر، در ابتدا مشاهده شد که بیان ژن‌های MTTP و CALCA در نمونه‌های کنترل و بیماران مبتلا به سرطان کلیه نوع ccRCC، کاهش یافته است. ما این کاهش در بررسی‌های آزمایشگاهی به میزانی که از نتایج بیوانفورماتیک به دست آمد نبود به طوری که برای ژن CALCA معنادار و برای ژن MTTP بی‌معنی شد که نیاز به بررسی بیشتر در پژوهش‌های آینده دارد. ژن MTTP ممکن است باعث اختلال در متابولیسم لیپیدها و تجمع آنها در بافت کلیه شود. همچنین، ژن CALCA در طیف وسیعی از فرآیندهای سرطانی نقش دارد و می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر تشخیصی مهم در سرطان کلیه مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان "شناسایی ژن‌هایی با بیان متفاوت در سرطان کلیه با استفاده از آنالیز داده‌های RNAseq و تایید آنها به واسطه‌ی q-PCR" در مقطع کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی مولکولی-ژنتیک، در سال ۱۴۰۳ و کد A-10-7624-1 می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

در مطالعه حاضر، با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیک داده‌ی RNA-seq حاوی اطلاعات بیان ژن بیماران مبتلا به سرطان کلیه، ژن‌های با بیان متفاوت در بافت توموری کلیه شناسایی شدند. در آنالیزهای Enrichment، مشخص شد که این ژن‌ها در ایجاد بیماری‌های کلیوی، بیماری‌های لوله‌های کلیوی، بیماری‌های سیستم ادراری و همچنین در بروز پاسخ‌های ایمنی و التهاب نقش دارند. بنابراین، این ژن‌ها می‌توانند کاندیداهای مناسبی برای تشخیص زودهنگام سرطان کلیه باشند. از بین ژن‌های شناسایی شده، ژن‌هایی که علاوه بر بافت کلیه، در بافت خون هم بیان متفاوتی در این نوع سرطان داشته باشند، مورد توجه قرار گرفتند و در نهایت دو ژن CALCA و MTTP انتخاب شدند. در بررسی شبکه PPI مشخص شد که این ژن‌ها با ژن‌های دیگری تعامل دارند.

CALCA: ژن CALCA با ژن‌های AVP (آرژنین وازوپرسین)، OXT (اکسیتوسین) و TNNT2 (تروپونین T نوع ۲) و MTTP با ژن‌های SCD (استاریل کوآ دساجوراز ۱) و G6PC (گلوکز-۶-فسفاتاز) ارتباط مستقیم دارند. نتایج مطالعه ما نشان داد که در خون بیماران مبتلا به ccRCC، کاهش معناداری در بیان CALCA در مقایسه با افراد سالم وجود دارد. علاوه‌براین، این ژن با AUC معنادار ۰/۶۴ می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر تشخیصی برای شناسایی ابتلا به ccRCC مورد استفاده قرار گیرد.

MTTP: پروتئین انتقال تری‌گلیسیرید میکروزومی (MTTP) به میزان زیادی در بافت چربی بیان می‌شود و با تسهیل انتقال تری‌گلیسیرید بین وزیکول‌های غشایی، در تنظیم متابولیسم لیپیدها نقش دارد.^{۱۰} در طی چاقی، دیابت و پیری، افزایش در پروتئین‌های تنظیم‌کننده عنصر اتصال‌دهنده استرول (SREBPs) منجر به سنتز بیشتر اسیدهای چرب جدید، و در نتیجه انباشت لیپید و کاهش عملکرد کلیه می‌شود. همچنین نارسایی کلیه باعث کاهش FAO

References

1. Cui H, Xu L, Li Z, Hou KZ, Che XF, Liu BF, et al. Integrated bioinformatics analysis for the identification of potential key genes affecting the pathogenesis of clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Oncol Lett* 2020;20(2):1573-84.
2. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma. *Journal of Nature reviews Disease primers* 2017;3(1):1-19.

3. Zhang N, Chen W, Gan Z, Abudurexiti A, Hu X, Sang W. Identification of biomarkers of clear cell renal cell carcinoma by bioinformatics analysis. *Journal of Medicine* 2020;99(21).
4. Zhang F, Wu P, Wang Y, Zhang M, Wang X, Wang T, et al. Identification of significant genes with prognostic influence in clear cell renal cell carcinoma via bioinformatics analysis. *Journal of Translational andrology and urology* 2020;9(2):452.
5. Dizman N, Philip EJ, Pal SK. Genomic profiling in renal cell carcinoma. *Journal of Nature Reviews Nephrology* 2020;16(8):435-51.
6. Syed JS, Brito J, Pooli A, Boutros PC, Shuch B, editors. *Transcriptomics in RCC. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2020: Elsevier.
7. Batut B, van den Beek M, Doyle MA, Soranzo N. RNA-seq data analysis in Galaxy. *Journal of RNA Bioinformatics* 2021:367-92.
8. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Journal of Nucleic Acids Res* 2023;51(D1):D638-d46.
9. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Journal of Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D607-d13.
10. Wu Y, Terekhanova NV, Caravan W, Naser Al Deen N, Lal P, Chen S, et al. Epigenetic and transcriptomic characterization reveals progression markers and essential pathways in clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Nature Communications* 2023;14(1):1681.
11. Zhang F, Wu P, Wang Y, Zhang M, Wang X, Wang T, et al. Identification of significant genes with prognostic influence in clear cell renal cell carcinoma via bioinformatics analysis. *Journal of Translational andrology and urology* 2020;9(2):452.
12. Zhang Q, Deng T, Zhang H, Zuo D, Zhu Q, Bai M, et al. Adipocyte-derived exosomal MTTP suppresses ferroptosis and promotes chemoresistance in colorectal cancer. *Journal of Advanced Science* 2022;9(28):2203357.
13. Scerbo D, Son N-H, Sirwi A, Zeng L, Sas KM, Cifarelli V, et al. Kidney triglyceride accumulation in the fasted mouse is dependent upon serum free fatty acids[S]. *Journal of Lipid Research* 2017;58(6):1132-42.
14. van der Mijn JC, Fu L, Khani F, Zhang T, Molina AM, Barbieri CE, et al. Combined Metabolomics and Genome-Wide Transcriptomics Analyses Show Multiple HIF1 α -Induced Changes in Lipid Metabolism in Early Stage Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Journal of Transl Oncol* 2020;13(2):177-85.

Identification of diagnostic biomarkers in kidney cancer using RNAseq data analysis and their confirmation by qRT-PCR

Fateme Sadat Zendehtel Ph.D.¹
Seyyed Abdolhamid Angaji Ph.D.^{1*}
Behnaz Beikzadeh Ph.D.²
Behzad Narouie M.D.³
Mahdi Mohammadi M.D.⁴

1- Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

2- Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3- Department of Urology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

4- Department of Urology, Urology and Nephrology Research Center, Shahid Labbafinejad Medical Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Department of Cellular and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-88329220
E-mail: angaji@khu.ac.ir

Abstract

Received: 22 Jul. 2024 Revised: 31 Jul. 2024 Accepted: 13 Agu. 2024 Available online: 22 Agu. 2024

Background: Clear renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common malignant kidney tumor and has a high mortality rate. The pathogenesis of this cancer is complex and efficient biomarkers for its diagnosis and prediction are limited. This study aimed to identify predictive genes in ccRCC through analysis and laboratory validation. ccRCC is the most common malignant kidney tumor and has a high mortality rate.

Methods: The present study was a case-control study in which samples were taken from patients and healthy individuals from Labafi Nejad Hospital in Tehran between October 2012 and April 2014, and laboratory tests were performed on the samples.

First, genes with differential expression in ccRCC patients were identified by bioinformatics using gene expression profile data from the Gene Expression Omnibus (GEO) database with accession number GSE213324. Data analysis was performed using Galaxy web server, protein-protein interactions were checked using Cytoscape and STRING app software, and finally two genes were selected for real-time PCR testing.

Results: Analysis identified 4,065 genes with differential expression in RCC tissues compared to healthy tissues. These genes are involved in immune responses and renal disease pathways, suggesting their potential role in disease development. After constructing the protein-protein interaction network and identifying differentially expressed genes in kidney tissue and blood, two genes, MTTP and CALCA, were selected for further investigation. In the Mann-Whitney U test, the expression of the CALCA gene decreased significantly in the patient group ($P < 0.05$). On the other hand, the MTTP gene showed a decrease in expression, but not significantly. The AUC calculated to evaluate the diagnostic accuracy for the CALCA gene was 0.64 and significant ($P < 0.05$), demonstrating its potential as a useful biomarker for ccRCC diagnosis. However, the AUC for the MTTP gene was not significant.

Conclusion: The reduction in CALCA expression could serve as a useful biomarker for diagnosing ccRCC.

Keywords: cancer biomarkers, CALCA gene, clear cell renal cell carcinoma, kidney cancer, MTTP gene.