DOI: 10.48305/jims.v41.i745.1045

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۴۵/هفته‌ی اول بهمن ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۱۳ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۶ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۱۱/۷

کاهش بیان ژن *PSMB9* در بیماران مبتلا به کارسینوم اندومتر

سید مرتضی جوادی راد[۱]، الهام شیشه‌بر[۲]، فریبا بهنام‌فر[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کارسینوم اندومتر، دومین نئوپلاسم شایع در زنان است و شناخت ژن‌های دخیل در بروز آن می‌تواند به درک رفتارشناسی این بیماری کمک کند و سپس در نحوه‌ی درمان، مؤثر باشد.

روش‌ها: تعداد ۳۵ نمونه بافت تازه منجمد کارسینوم اندومتر و ۲۴ بافت سالم اندومتر مجاور تومور، جمع‌آوری شد. استخراج RNA تام سلولی و سپس تیمار با آنزیم DNaseI، انجام شد. cDNA به کمک پرایمرهای تصادفی شش‌تایی ساخته شد. بیان ژن *PSMB9* به کمک پرایمرهای اختصاصی تقاطع اگزون و به روش RT-qPCR سنجیده شد. آنالیز آماری داده‌ها به کمک نرم‌افزار REST2009 انجام شد.

یافته‌ها: مشاهده‌ی دو باند RNAهای ریبوزومی، خرد نشدن RNA در طی مراحل استخراج را نشان داد. غلظت مناسب RNAهای استخراج شده در محدوده‌ی مناسب برای ساخت cDNA قرار داشت. بررسی منحنی ذوب نشان داد که تکثیر اختصاصی ژن *PSMB9* انجام شده است. تفاوت میزان بیان mRNA ژن *PSMB9* بین بافت مبتلا به کارسینوم اندومتر و بافت سالم مجاور، معادل ۰/۲۶۶ واحد بود که با توجه به مقدار P برابر با ۰/۰۰۸ معنی‌دار درنظر گرفته شد.

نتیجه‌گیری: کاهش بیان ژن *PSMB9* در بافت کارسینوم اندومتر نسبت به بافت سالم مجاور تومور مشاهده شد و این کاهش بیان می‌تواند نشان‌دهنده‌ی نقش سرکوب‌کنندگی تومور برای ژن *PSMB9* باشد.

واژگان کلیدی: کارسینوم اندومتر؛ *PSMB9*؛ ژن سرکوبگر تومور

ارجاع: سید مرتضی جوادی راد، شیشه‌بر الهام، بهنام‌فر فریبا. **کاهش بیان ژن *PSMB9* در بیماران مبتلا به کارسینوم اندومتر.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۴۵): ۱۰۵۱-۱۰۴۵

مقدمه

کارسینوم اندومتر، بعد از سرطان پستان، دومین سرطان شایع در زنان به شمار می‌آید و سن متوسط تشخیص آن، ۶۳ سال است (۱). از طرفی، شایع‌ترین سرطان سیستم تولید مثل در زنان به شمار می‌آید و هفتمین اختلال بدخیم شایع در سراسر جهان می‌باشد که بروز متفاوتی در مناطق مختلف دنیا دارد (۲). از طرف دیگر، افزایش میزان مرگ و میر ناشی از کارسینوم اندومتر نگران‌کننده است و نرخ زنده ماندن پنج ساله در بیماران مبتلا به نوع غیرمتاستاتیک بین ۷۴ تا ۹۱ درصد گزارش شده است (۳). کارسینوم اندومتر به عنوان دومین سرطان شایع در زنان ایرانی (بعد از سرطان تخمدان) نیز گزارش شده و تقریباً ۱۵۳۵ بیمار جدید مبتلا به این سرطان در سال ۲۰۲۰ تشخیص داده شدند (۴). این مطالعه همچنین نشان داد که میزان مرگ و میر ناشی از کارسینوم اندومتر در سال ۲۰۲۰ معادل ۵۳۷ نفر بوده است و نرخ مرگ و میر حاصل از این بیماری در ایران تا سال ۲۰۴۰ با افزایش ۱۱۵ درصد همراه خواهد بود (۴).

ژن بتا ۹ زیر واحد ۲۰S پروتئازوم (Proteasome 20S Subunit Beta 9) *PSMB9*، یک ژن کدکننده پروتئین با فعالیت اندوپپتیدازی وابسته به ترئونین است و نقش این ژن در ایجاد سندرم شماره ۳ خود التهابی مرتبط با پروتئازوم (Proteasome-Associated Autoinflammatory Syndrome 3) و دیابت نوع ۲ مشخص شده است (۵، ۶). این ژن جزء نقاط داغ نوترکیبی میوزی به شمار می‌آید و به نظر می‌رسد که یکی از مناطق

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه زنان و زایمان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: سید مرتضی جوادی راد: استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Email: javadirad@yahoo.com

مهم در تصمیم‌گیری وقایع نوترکیبی باشد (۷، ۸). ژن *PSMB9* همچنین در پردازش آنتی ژن نقش دارد و موش‌های فاقد این ژن، تولید پروتئازوم با فعالیت پپتیدازی تغییر یافته را در دستور کار خود قرار دادند و ارائه آنتی‌ژن نیز در این موشها دچار اختلال شد (۹). علاوه بر این، ارتباط بین اختلال تنظیم ایمونوپروتئازوم و بروز بیماری‌های انسانی، از جمله سرطان، بیماری های خودایمن و بیماری‌های قلبی- عروقی پیشنهاد شده است (۱۰-۱۲).

تشخیص زودهنگام کارسینوم اندومتر، بالقوه مهم می‌باشد؛ ولی هنوز نقش ژن *PSMB9* در بروز این سرطان در زنان مشخص نشده است. این مطالعه با هدف بررسی میزان بیان mRNA ژن *PSMB9* در کارسینوم اندومتر طرح ریزی شد. همچنین با توجه به اهمیت تشخیص سریع، دقیق و با هزینه مناسب، از روش PCR کمی مبتنی بر رونوشت‌برداری معکوس (RT-qPCR) استفاده شده است. لازم به ذکر است که مطالعات متعدد کارایی بالای روش RT-qPCR به عنوان روش استاندارد طلایی تشخیص میزان بیان این ژن را نشان می‌دهند (۱۳-۱۵).

روش‌ها

نمونه‌گیری: رضایت‌نامه از بیماران مبتلا به کارسینوم اندومتر گرفته شد و سپس ۳۵ نمونه بافت کارسینوم اندومتر و ۲٤ نمونه بافت اندومتر سالم مجاور تومور، طبق پروتوکل هلسینکی از بیمارستان امام خمینی شهر تهران خریداری شد. نمونه‌های بافت به سرعت بعد از جراحی و برش، درون نیتروژن مایع فریز شدند. برای تمام بافت‌های خریداری شده، اصول ورود و خروج بررسی شدند و بافت‌های نامناسب حذف شدند. علت اختلاف تعداد بافت سالم و تومور به همین دلیل است. نمونه بافت‌های حاوی خون بیش از حد، نمونه‌های با تشخیص بافت شناختی نامشخص یا مبهم و بافت‌های با وزن بسیار کم حذف شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA: میزان ۵ ± ۵۰ میلی گرم از بافت یخ زده در نیتروژن مایع، در هاون چینی حاوی نیتروژن مایع خرد شد. استخراج RNA به کمک کیت Total RNA Extraction Kit شرکت پارس طوس (پارس طوس، ایران، شناسه: A101231) و طبق دستورالعمل این شرکت انجام شد. کیفیت RNAهای استخراج شده، با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد سنجیده شد. خلوص و عدم وجود آلودگی پروتئین توسط اسپکتروفوتومتری (نانودراپ مدل OneC-آمریکا) انجام شد. نسبت جذب ۲٦۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر برای بررسی آلودگی به پروتئین سنجیده شد. نسبت جذب ۲٦۰ نانومتر به ۲۳۰ نانومتر برای بررسی آلودگی به فنل و مواد شیمیایی کیت استخراج سنجیده شد. نمونه‌های با کمیت و کیفیت نامناسب، از پروژه حذف شدند.

به منظور حذف باقی مانده‌های DNA ژنوم، تیمار با آنزیم DNase I (Thermofisher-آلمان- Lot: 00645766) و طبق دستورالعمل این شرکت انجام شد. غلظت ۱ میکروگرم از RNA تام استخراج شده، تحت تیمار آنزیمی قرار گرفت و سپس، ساخت cDNA با استفاده از کیت Easy cDNA Synthesis Kit شرکت پارس طوس (پارس طوس، ایران، شناسه: A101161) و مطابق با پروتکل این شرکت، انجام شد.

طراحی پرایمر و انتخاب ژن کالیبره کننده: از الگوی طراحی تقاطع اگزون (Exon-junction) موجود در نرم‌افزار Beacon Designer 8 (Premier Biosoft, USA) برای طراحی پرایمر ژن *PSMB9* استفاده شد و بیش از ۵۰ جفت پرایمر مورد بررسی اولیه قرار گرفت. بررسی تشکیل دایمر پرایمر و dG اتصال و تشکیل لوپ اضافه، توسط نرم‌افزار الیگو ۷ (Molecular Biology Insights, USA)، انجام شد و پرایمرهای دارای ساختارهای ثانویه حذف شدند. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش در جدول ۱ خلاصه شده است. ژن *SYMPK* به عنوان ژن کالیبره‌کننده در واکنش RT-qPCR انتخاب شد تا استانداردسازی داده‌ها به کمک آن انجام شود (۱٦).

جدول ۱. مشخصات پرایمرها و محصولات تکثیر شونده.

ردیف	نماد ژن (کد دسترسی NCBI)	واریانت مورد استفاده در طراحی پرایمر	تعداد اگزون	توالی پرایمر	طول محصول PCR	دمای بهینه اتصال پرایمر
۱	*PSMB9* (5698)	NM_002800.5	۶	TCACCACAGACGCTATTGCTCT-3´ R:5´--F:5´ CAGTTCATTGCCCAAGATGACTCG- 3´	۱۱۹ bp	۶۰ درجه سلسیوس
۲	*SYMPK* (8189)	NM_004819.3	۲۸	F:5´-CTTCACCAAGGTTGTGCTGGAG-3´ R:5´-GCGCTTGAAGATCAGGTCTCGA-3´	۱۳۰ bp	۵۸ درجه سلسیوس

برای روش PCR شیب دما از کیت Reddy to use PCR Master mix 2x شرکت سیناکلون (سیناکلون، ایران، شناسه: MM2062) استفاده شد و بر اساس Tm پرایمرها، محدوده‌ی دما بین ۵۵ تا ٦۵ درجه‌ی سلسیوس در نظر گرفته شد. با توجه به شدت باند محصولات تکثیر شده در دماهای مختلف، بر روی ژل آگارز، دمای بهینه‌ی اتصال پرایمرها تعیین شد.

واکنش RT-qPCR: واکنش RT-qPCR در دستگاه کرومو ٤ (Bio-Rad-USA) و با استفاده از کیت 2X SYBR Green Real Time PCR شرکت پارس طوس (پارس طوس، ایران، شناسه: C101022) و در حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر انجام شد. برنامه‌ی مورد استفاده شامل، واسرشت‌سازی اولیه و فعال‌سازی آنزیم در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس و به مدت ۱۰ دقیقه، ٤۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس، ۳۰ ثانیه دمای اتصال پرایمر و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به همراه خوانش چاهک‌ها در انتهای هر سیکل بود. برای تأیید نتایج مشاهده شده، تمامی واکنش‌ها به صورت تکرار سه‌تایی انجام شد. به ازای هر دور بررسی بیان، نمونه‌ی کنترل منفی DNA (فاقد الگوی cDNA) برای اطمینان از شناسایی آلودگی‌های بالقوه استفاده شد.

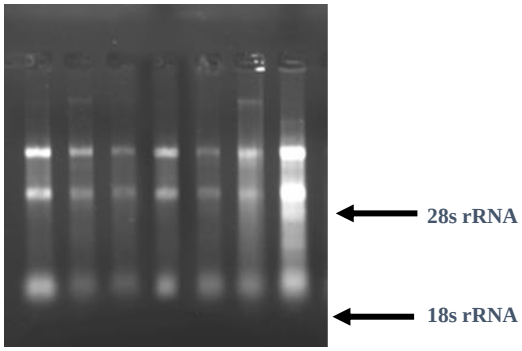
آنالیز Melting Curve: در انتهای چرخه RT-qPCR، اختصاصیت واکنش با استفاده از نمودار منحنی ذوب، مشخص شد. تغییرات شدت فلوئورسنس در کانال سبزرنگ و به ازای هر یک درجه افزایش دما از سطح پایه، قرائت و ثبت شد. محدوده‌ی دمایی بین ۵۵ درجه‌ی سلسیوس تا ۹۵ درجه‌ی سلسیوس (با افزایش تدریجی ۱ درجه سلسیوس) در نظر گرفته شد.

از آزمون آماری t استیودنت برای مقایسه‌ی میانگین بیان ژن هدف *PSMB9* بین نمونه‌های کارسینوم رحم و نمونه‌ی بافت سالم مجاور تومور و از روش لیواک برای بررسی بیان نسبی ژن *PSMB9* بین نمونه‌های تومور و نمونه‌ی بافت سالم مجاور تومور، استفاده شد (۱۷).

نمونه‌های مورد بررسی در این پژوهش با تأییدیه کداخلاق (IR.UI.REC.1398.057) دانشگاه اصفهان مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها

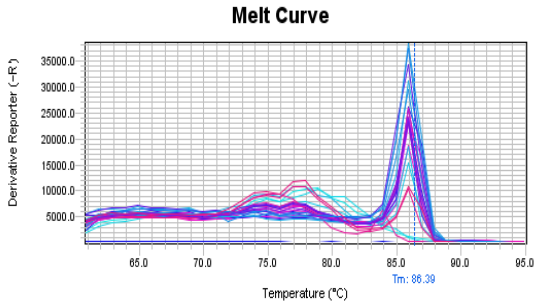
بررسی کیفیت و کمیت RNAهای استخراج شده: RNA استخراج شده از تومور و بافت‌های سالم با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، باندهای RNA ریبوزومی مشاهده شد. این RNAهای دست نخورده نسبت جذب ۱/۸ تا ۲/۲ را نشان دادند که نشان‌دهنده‌ی خلوص بالای آن‌ها بود (داده‌ها نشان داده نشده است). نمونه‌های فاقد باندهای RNA ریبوزومی بر روی ژل، یا نمونه‌های با نسبت جذب خارج از محدوده‌ی قابل قبول، از ادامه‌ی مطالعه حذف شدند.



شکل ۱. باند RNA ریبوزومی (rRNA)

دست نخورده ماندن RNAهای استخراج شده توسط شدت دوبرابری باند ۲۸S نسبت به باند ۱۸S تأیید می‌شود.

بررسی و منحنی ذوب محصول RT-qPCR: همه‌ی نمونه‌ها دارای یک قله‌ی منفرد در دمای ۸٦/۳۹ درجه‌ی سلسیوس، مطابق محدوده‌ی دمای پیش‌بینی شده به روش بیوانفورماتیک، بودند (شکل ۲). این مسأله صحت انجام واکنش RT-qPCR توسط پرایمرهای تقاطع اگزون طراحی شده را نشان داد. از طرف دیگر، فقدان هر گونه قله‌ی غیر اختصاصی به معنی عدم وجود دوتایی پرایمر، لوپ پرایمر و همچنین عدم تکثیر غیراختصاصی و عدم تولید محصولات فرعی بود.



شکل ۱. نمودار منحنی ذوب با قله در دمای ۸٦/۳۹ درجه سلسیوس

وجود قله منفرد نشان‌دهنده‌ی کیفیت بالای تکثیر ژن *PSMB9* توسط پرایمرهای تقاطع اگزون است. عدم وجود پیک اضافه، نشان‌دهنده‌ی عدم تکثیر محصولات فرعی حاصل از تکثیر RNAهای استخراج شده، در واکنش RT-qPCR است.

مقایسه‌ی داده‌های حاصل از RT-qPCR بهینه: نتیجه‌ی مقایسه‌ی میانگین بیان ژن *PSMB9* بین دو بافت کارسینوم اندومتر و بافت اندومتر شاهد متناظر توسط نرم‌افزار REST 2009، در جدول ۲ آورده شده است. کاهش بیان ژن PSMB9 در بافت کارسینوم اندومتر نسبت به بافت سالم مجاور تومور برابر با ۰/۲٦٦ و مقدار P = ۰/۰۰۸ بود.

جدول ۲. مقایسه‌ی بیان ژن *PSMB9* بین بافت کارسینوم رحم و بافت سالم مجاور تومور

نام ژن	نوع	بیان	خطای استاندارد	٪۹۵CI	P*
PSMB9	ژن هدف	۰/۲۶۶	۰/۲۰_۳/۸۷۴	۰/۰۰۲_۴۵/۴۳۰	۰/۰۰۸
SYMPK	ژن مرجع	۱/۰۰۰			

*: با توجه به سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۵۰، کاهش بیان ژن *PSMB9* (۰/۲۶۶) معنی‌دار گزارش می‌شود.

بحث

مطالعات متعددی برای شناسایی ژن‌های درگیر در کارسینوم رحم انجام شده است و در همین راستا، حذف ژن *PSMB9* در موش‌ها (*PSMB9*$^{-/-}$)، منجر به افزایش درصد حیوانات مبتلا به تومورهای آشکار بعد از سن ٦ ماهگی شد (۱۸). بر اساس نتایج همین مطالعه، شیوع تجمعی بیماری در ۳٦ درصد موش‌های ماده (۱۰ نفر از ۲۸ نفر) در سن ۱۲ ماهگی مشاهده شد. آن‌ها نتیجه گرفتند که چون *PSMB9*، نقش مهمی در پاسخ ایمنی داشته و از پیشرفت نئوپلاسم‌های خود به خودی رحم جلوگیری می‌کند، شیوع کارسینوم رحم در موش‌های ماده *PSMB9*$^{-/-}$ مشاهده می‌شود.

مطالعه‌ی دیگر نیز نشان داد که *PSMB9* به عنوان یک عضو مهم از ایمونوپروتئازوم بر پردازش آنتی‌ژن تأثیر می‌گذارد و می‌تواند با تنظیم پاسخ‌های ایمنی ذاتی و تطبیق‌پذیر، هموستاز سلولی را حفظ کند (۱۹). این مسأله ممکن است برای سلول‌های آلوده به عفونت، سلول‌های در معرض پیری یا سلول‌های با استرس اکسیداتیو مفید باشد.

مطالعه‌ی سلول‌های سرطان پستان سه‌گانه‌ی منفی (triple negative breast cancer) نیز نشان داد که افزایش بیان زیرواحد PSMB8 و PSMB9 پروتئوزوم می‌تواند با خروجی بهتر بیماری در ارتباط باشد و تومورهای با بیان بالای زیرواحدهای مذکور، پیش‌آگهی بهتری دارند (۲۰). بیان بیش از حد زیرواحدهای ایمونوپروتئازوم با بهبود بقای بیماران ملانوما نیز ارتباط نشان می‌دهد (۲۱). تجزیه و تحلیل مطالعه‌ی هم‌گروهی داروی lpilimumab نشان داد که همبستگی بالایی بین بیان دو ژن ایمنوپروتئوزوم PSMB8 و PSMB9 و پاسخ مثبت به این داروی فعال‌کننده‌ی سیستم ایمنی (از طریق مهار پروتئین CTLA4) وجود دارد (۲۲). در مقایسه با سایر ژن‌های منفرد، PSMB9 جزء برترین ژن‌هایی بود که به طور قابل‌توجهی با مزایای بالینی پایدار پس از درمان با این دارو قرار گرفت (۲۱). اما در یک تضاد آشکار، القاء بیش از حد و طولانی‌مدت ایمونوپروتئازوم ممکن است مضر باشد و به پاتوژنز بیماری‌های خودایمنی و سرطان کمک کند (۱۲). بنابراین مهار عملکرد ایمونوپروتئازوم در برخی موارد منجر به کاهش اندازه‌ی تومور، تضعیف علائم بیماری‌های خود ایمن و رهایی از استرس اکسیداتیو می‌شود (۲۳).

با وجود اینکه بیان تغییر یافته‌ی ایمونوپروتئازوم اغلب در سرطان‌های متعدد مشاهده می‌شود؛ اما با این حال، اثرات متضاد میزان بیان ایمنوپروتئازوم در انواع مختلف سرطان، حل نشده باقی مانده است (۱۹).

یافته‌های زیستی و بافت‌شناختی نشان داد که فقدان *PSMB9*، منجر به تکثیر غیرطبیعی سلول و پیشرفت تومور می‌شود و این مسأله در لیومیوسارکوم رحم (Uterine leiomyosarcoma) LMS مشاهده شده است (۲٤). مطالعات همچنین نشان داد که PSMB9 یک فاکتور القا شونده توسط اینترفرون گاما (INFɣ) است زیرا رونویسی ژن *PSMB9* از یک پروموتر حاوی توالی پاسخگو به *INFɣ* انجام می‌شود (۲۵). همچنین به نظر می‌رسد که جهش G781E (تغییر اسید آمینه گلیسین به گلوتامیک در موقعیت ۸۷۱) در جایگاه اتصال به ATP موجود در پروتئین جانوس کیناز ۱ (JAK1) منجر به اختلال در القای بیان *PSMB9* توسط INFɣ می‌شود (۲٦). بنابراین مسیر انتقال پیام JAK-STAT در بالادست پروتئین PSMB9 عمل می‌کند. از آن‌جا که بیان ژن *PSMB9* باعث سرکوب تومورزایی در موش‌های مبتلا به کارسینوم اندومتر می‌شود، این ژن بایستی دارای نقش اصلی در بروز این سرطان باشد و به عنوان یک مولکول سرکوبگر تومور عمل کند (۲۵).

مطالعات ایمنوهیستوشیمی با استفاده از نمونه‌های بافت انسانی نشان داد که بیان معیوب *PSMB9* احتمالاً یکی از عوامل خطر در بروز کارسینوم اندومتر انسان است (۲٦). از طرف دیگر کاهش بیان مولکول‌های کلاس MHC (مثل PSMB9) یکی از مکانیسم‌های زیست‌شناختی سلول‌های تومور برای فرار از نظارت ایمنی میزبان است. با این وجود، به نظر می‌رسد بیان *PSMB9* به جای ایجاد فرار از نظارت ایمنی، نقش مهمی در تنظیم منفی رشد سلول‌های سرطانی ایفا کند. بیان معیوب *PSMB9* احتمالاً یکی از عوامل خطر برای ایجاد کارسینوم رحم در انسان است و بنابراین، ژن‌درمانی با ناقل‌های بیان *PSMB9* ممکن است یک درمان جدید برای آن نوع از سرطان‌ها باشد که نقص در بیان *PSMB9* را نشان می‌دهند. از آن‌جایی که هیچ درمان مؤثری برای کارسینوم اندومتر به جز برداشت رحم وجود ندارد، نتایج این مطالعه ممکن است ما را به درمان‌های مولکولی خاصی برای درمان این بیماری برساند. یافته‌های این مطالعه نیز هم

راستا با نتایج مطالعات قبل نشان داد که میزان بیان ژن *PSMB9* در نمونه‌ی بافت‌های افراد مبتلا به کارسینوم اندومتر نسبت به بافت سالم مجاور کاهش یافته است و این کاهش بیان از نظر آماری معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری

تفاوت بیان ژن *PSMB9* بین بافت سالم مجاور کارسینوم اندومتر و بافت کارسینوم اندومتر نشان داد که کاهش بیان ژن مذکور می‌تواند در بروز این سرطان نقش داشته باشد. این نتایج همچنین تأییدکننده‌ی نقش سرکوبگر تومور برای ژن *PSMB9* در کارسینوم اندومتر بود.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه‌ی پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی مولکولی مصوب دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های زیستی دانشگاه اصفهان می‌باشد. بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهش و فن‌آوری دانشگاه اصفهان بابت هزینه‌های اجرای این پژوهش تشکر صمیمانه به عمل آید. نویسندگان مقاله از بیماران بابت همکاری در این پژوهش کمال تشکر را دارند.

References

1. Miller KD, Nogueira L, Devasia T, Mariotto AB, Yabroff KR, Jemal A, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022. CA Cancer J Clin 2022; 72(5): 409-36.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin 2021; 71(3): 209-49.
3. Vizza E, Cutillo G, Bruno V, Sperduti I, Mancini E, Baiocco E, et al. Pattern of recurrence in patients with endometrial cancer: A retrospective study. Eur J Surg Oncol 2020; 46(9): 1697-702.
4. Rostami S, Nahvijou A. Gynecologic Cancers Estimates in the I.R. Iran, 2012- 2040. Basic Clin Cancer Res 2022; 13(2): 111-8.
5. Brehm A, Liu Y, Sheikh A, Marrero B, Omoyinmi E, Zhou Q, et al. Additive loss-of-function proteasome subunit mutations in CANDLE/PRAAS patients promote type I IFN production. J Clin Invest 2015; 125(11): 4196-211.
6. Xu Y, Liu G, Zhou Y, Lu Z, Shi Z, Wang J. The genetic association between LMP2 and LMP7 polymorphisms and susceptibility of insulin dependent diabetes mellitus. Medicine (Baltimore) 2020; 99(13): e19482.
7. Gergelits V, Parvanov E, Simecek P, Forejt J. Chromosome-wide characterization of meiotic noncrossovers (gene conversions) in mouse hybrids. Genetics 2021; 217(1): 1-14.
8. Guillon H, de Massy B. An initiation site for meiotic crossing-over and gene conversion in the mouse. Nat Genet 2002; 32(2): 296-9.
9. Van Kaert L, Ashton-Rickardt PG, Eichelberger M, Gaczynska M, Nagashima K, Rock KL, et al. Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. Immunity 1994; 1(7): 533-41.
10. Del Rio Oliva M, Mellett M, Basler M. Immunoproteasome inhibition attenuates experimental psoriasis. Front Immunol 2022; 13: 1075615.
11. Xie X, Bi H-L, Lai S, Zhang Y-L, Li N, Cao H-J, et al. The immunoproteasome catalytic β5i subunit regulates cardiac hypertrophy by targeting the autophagy protein ATG5 for degradation. Sci Adv 2019; 5(5): eaau0495.
12. Tripathi SC, Vedpathak D, Ostrin EJ. The Functional and Mechanistic Roles of Immunoproteasome Subunits in Cancer. Cells 2021; 10(12): 3587.
13. Sultana GNN, Akter F, Israfil SMH, Ray UC, Jahan RA, Ali MS, et al. Quantitative analysis of serum cell-free DNA as a predictive and prognostic marker in breast cancer patients. Front Oncol 2023; 13: 1171412.
14. Adamski MG, Gumann P, Baird AE. A method for quantitative analysis of standard and high-throughput qPCR expression data based on input sample quantity. PLoS One 2014; 9(8): e103917.
15. Dutta D, Naiyer S, Mansuri S, Soni N, Singh V, Bhat KH, et al. COVID-19 Diagnosis: A Comprehensive Review of the RT-qPCR Method for Detection of SARS-CoV-2. Diagnostics 2022; 12(6): 1503.
16. Javadirad SM, Mokhtari M, Esfandiarpour G, Kolahdouzan M. The pseudogene problem and RT-qPCR data normalization; SYMPK: a suitable reference gene for papillary thyroid carcinoma. Sci Rep 2020; 10(1): 18408.
17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−ΔΔCT method. Methods 2001; 25(4): 402-8.
18. Hayashi T, Faustman DL. Development of spontaneous uterine tumors in low molecular mass polypeptide-2 knockout mice. Cancer Res 2002; 62(1): 24-7.
19. Chen B, Zhu H, Yang B, Cao J. The dichotomous role of immunoproteasome in cancer: Friend or foe? Acta Pharm Sin B 2022; 13(5): 1976-89.
20. Geoffroy K, Araripe Saraiva B, Viens M, Béland D, Bourgeois-Daigneault MC. Increased expression of the immunoproteasome subunits PSMB8 and PSMB9 by cancer cells correlate with better outcomes for triple-negative breast cancers. Sci Rep 2023; 13(1): 2129.
21. Kalaora S, Lee JS, Barnea E, Levy R, Greenberg P, Alon M, et al. Immunoproteasome expression is associated with better prognosis and response to checkpoint therapies in melanoma. Nat Commun 2020; 11(1): 896.
22. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic

melanoma. Science (80-) 2015; 350(6257): 207-11.
23. Leister H, Luu M, Staudenraus D, Lopez Krol A, Mollenkopf HJ, Sharma A, et al. Pro- and Antitumorigenic Capacity of Immunoproteasomes in Shaping the Tumor Microenvironment. Cancer Immunol Res 2021; 9(6): 682-92.
24. Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, et al. Potential role of LMP2 as tumor-suppressor defines new targets for uterine leiomyosarcoma therapy. Sci Rep 2011; 1(1): 180.
25. Hayashi T, Kobayashi Y, Kohsaka S, Sano K. The mutation in the ATP-binding region of JAK1, identified in human uterine leiomyosarcomas, results in defective interferon-γ inducibility of TAP1 and LMP2. Oncogene 2006; 25(29): 4016-26.
26. Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Ichimura T, Sudo T, et al. Potential diagnostic biomarkers: differential expression of LMP2/β1i and cyclin B1 in human uterine leiomyosarcoma. Tumori 2014; 100(4): 99e-106e.

DOI: *10.48305/jims.v41.i745.1045*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 41, No. 745, 1st Week, February 2024**

Received: 04.09.2023 Accepted: 16.01.2024 Published: 27.01.2024

Decreased Expression of *PSMB9* Gene in Patients with Endometrial Carcinoma

Seyed-Morteza Javadirad[1], Elham Shishebor[2], Fariba Behnamfar[3]

Original Article

Abstract

Background: Endometrial carcinoma is the second most common neoplasm in women, and understanding the genes involved in its occurrence can help in understanding the disease behavior and, ultimately, in treating it.

Methods: There were 35 samples of frozen endometrial carcinoma tissues and 24 samples of normal endometrium adjacent to the tumors. Cell total RNA was extracted, followed by DNaseI enzyme treatment. Using random hexamers cDNA was synthesized. We measured *PSMB9* gene expression by RT-qPCR using exon junction-specific primers. The statistical analysis was performed using REST2009 software.

Findings: The observation of two ribosomal RNA bands showed that RNA was not broken during extraction. The appropriate concentration of extracted RNA was in the appropriate range for cDNA. Examination of the melting curve showed that specific amplification of the *PSMB9* gene was performed. The difference in *PSMB9* mRNA expression between endometrial carcinoma tissue and adjacent normal tissue was 0.266 units. This was considered significant according to a P of 0.008.

Conclusion: There was a decrease in *PSMB9* gene expression in endometrial carcinoma tissues compared with normal endometrial tissues adjacent to the tumor. The fact that *PSMB9* expression has decreased may indicate that the gene has tumor suppressor functions.

Keywords: Endometrial carcinoma; *PSMB9*; Gene; Tumor suppressor

Citation: Javadirad SM, Shishebor E, Behnamfar F. **Decreased Expression of *PSMB9* Gene in Patients with Endometrial Carcinoma.** J Isfahan Med Sch 2024; 41(745): 1045-51.

1- Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, School of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2- MS Student, Department of Molecular Cell Biology and Microbiology, School of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Seyed-Morteza Javadirad, Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, School of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran; Email: javadirad@yahoo.com