

# Jaký je prognostický význam molekulárně genetických faktorů u karcinomu endometria?

## What is the Prognostic Importance of Molecular Genetic Factors in Endometrial Carcinoma?

Křepinská E.<sup>1</sup>, Chmelařová M.<sup>2</sup>, Laco J.<sup>3</sup>, Palička V.<sup>2</sup>, Špaček J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Porodnická a gynekologická klinika, LF UK a FN v Hradci Králové

<sup>2</sup> Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN v Hradci Králové

<sup>3</sup> Fingerlandův ústav patologie, LF UK a FN v Hradci Králové

### Souhrn

**Východiska:** Kritické zhodnocení významu vybraných molekulárně genetických ukazatelů u karcinomu endometria na základě analýzy dosud publikovaných prací a u *K-ras* mutace též prezentace vlastních výsledků. Cílem původní části práce bylo porovnat výskyt této mutace v tkáni karcinomu oproti zdravému endometriu u pacientek léčených na našem pracovišti a posléze i zhodnocení jejího podílu na vzniku tohoto onemocnění v rámci multivariační analýzy. **Materiál a metody:** Byla provedena molekulárně biologická analýza vzorků endometriální tkáně pacientek léčených na Porodnické a gynekologické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Vyšetření mutací genu *K-ras* bylo provedeno z DNA získané z formalinem fixovaných a v parafínu zalitých vzorků. K detekci byla použita metoda *K-ras* StripAssay™, ViennaLab Diagnostics GmbH. **Výsledky:** Bylo vyšetřeno 30 vzorků endometroidního karcinomu ve stadiu I (dle FIGO), mutace genu *K-ras* byla prokázána v 7 případech (23%). V kontrolní skupině 20 vzorků normálního endometria byla sledovaná mutace nalezena ve 3 případech (15%). Mutace se častěji vyskytovala u stadia IA a ve skupině dobře diferencovaných nádorů. **Závěr:** Význam molekulárně genetických faktorů u karcinomu endometria se přelomově liší v závislosti na typu nádoru. U častějších endometroidních nádorů prvního typu nejsou dosud publikované výsledky zdaleka tak jasné jako u karcinomů druhého typu, kde je výskyt alterace *p53* uváděn až v 90%. Naše výsledky u představitelů místní populace podporují teorii o možném podílu *K-ras* mutace v procesu endometriální karcinogeneze u nádorů prvního typu ve smyslu časné události.

### Klíčová slova

karcinom endometria – gen *K-ras* – mutace

### Summary

**Background:** Evaluation of the importance of molecular genetic factors in endometrial carcinoma based on our review of available literature, and in the case of *K-ras* mutation based on our own data. The aim of the original part of our study was to compare the presence of *K-ras* mutation in early stages of endometroid carcinoma with normal endometrium and evaluate the role of the mutation in endometrial carcinogenesis. **Material and methods:** Molecular biological analysis was performed to detect *K-ras* mutation in samples of endometrial tissue obtained from women treated in the past at the Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Hradec Kralove. The detection was made from DNA isolated from paraffin-embedded sections using *K-ras* StripAssay™, ViennaLab Diagnostics GmbH. **Results:** *K-ras* mutation was found in 7 out of 30 specimens of endometroid carcinoma in stage I (23%) and in 3 of 20 specimens of normal endometrium in the control group (15%). *K-ras* mutations were more frequent in IA stage and grade 1 of endometroid carcinoma. **Conclusion:** The importance of molecular genetic factors in endometrial carcinoma differs depending on the type of carcinoma. In more common type 1 endometroid cancer, published data are not as clear as in type 2 carcinoma, in which prevalence of alteration of *p53* reaches 90%. Results of our study performed on local population of women support the theory about the possible role of *K-ras* mutation as an early event in the process of endometrial carcinogenesis in type 1 tumors.

### Key words

endometrial carcinoma – *K-ras* gene – mutation

Práce byla podpořena grantem Grantové agentury Univerzity Karlovy č. 157310.

This study was supported by grant of Grant Agency of the Charles University No. 157310.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Eva Křepinská

Porodnická a gynekologická klinika

LF UK a FN v Hradci Králové

Sokolská 581

500 05 Hradec Králové

e-mail: evajurkova@seznam.cz

Obdrženo/Submitted: 12. 12. 2011

Přijato/Accepted: 27. 6. 2012

## Úvod

Karcinom endometria je po karcinomu prsu nejčastější gynekologickou malignitou a jeho incidence neustále narůstá.

Ze zemí Evropské unie je jeho výskyt v České republice nejvyšší.

Od roku 1983 platí dualistická Bokhmanova teorie modelu karcinogeneze endometria, která vychází z klinického pozorování a histopatologických charakteristik [1]. Asi o deset let později byla tato dosud platná teorie podpořena studii na molekulární úrovni. Charakteristika obou základních subtypů souvisí i s odlišnou genetickou nestabilitou a molekulárními změnami [2].

U endometroidního karcinomu (typ I) jsou nejčastěji popisovány mutace *PTEN* tumor-supresorového genu [3], mikrosatelitální instabilita [4], mutace *K-ras* protoonkogenu [5] a *β-cateninu* [6]. Pro karcinomy typu II je charakteristická porucha funkce tumor-supresoru *p53* a některé práce uvádějí, že gen *p53* je alterován až v 90 % serózních karcinomů endometria [7]. Na rozdíl od typu I jsou u typu II vzácně popisované mutace *K-ras*, *β-cateninu*, dále mikrosatelitální instabilita a inaktivace *p16* [2,8–11].

V původní části naší práce jsme se zaměřili na úlohu mutace *K-ras* genu v patogenezi endometroidního typu karcinomu endometria.

*K-ras* patří do rodiny onkogenů *ras*, které jsou nejčastěji spojovány se vznikem lidských maligních nádorů. *Ras* proteiny jsou součástí buněčné membrány a vykazují GTPázovou aktivitu. Podílejí se na spouštění růstu a diferenciaci buňky. Mutovaný *K-ras* protein ztrácí schopnost spontánní inaktivace, což způsobí trvalou stimulaci buněčného růstu [12]. Z dostupných prací se mutace *K-ras* genu vyskytuje u 10–30 % případů endometroidního karcinomu [5,13], a to nejčastěji u nádorů středně a nízké diferencovaných [14]. To, že je mutace též přítomna asi v 16 % případů hyperplastického endometria, podporuje hypotézu o časně události v procesu karcinogeneze v této lokalizaci [15]. Jiné zdroje však naopak uvádějí možný vznik karcinomu endometria za přispění mutovaného *K-ras* protoonkogenu bez stadia hyperplazie [16].

## Materiál a metody

Byla provedena molekulárně biologická analýza 50 vzorků endometriální tkáně pacientek vyšetřených a léčených na Porodnické a gynekologické klinice LF UK a FN v Hradci Králové. Vzorky byly získány z archivu Fingerlandova ústavu patologie LF UK a FN v Hradci Králové, stáří vyšetřovaného materiálu nepřesáhlo 5 let. Vyšetřeno bylo 30 vzorků s endometroidním karcinomem ve stadiu I dle FIGO klasifikace. Dále byla vyšetřena kontrolní skupina 20 vzorků normálního endometria pacientek operovaných pro jinou, nezhoubnou diagnózu dělohy. Tyto vzorky byly histopatologem hodnoceny jako proliferativní, sekreční či klidové endometrium. Do kontrolní skupiny nebyl zařazen žádný vzorek hyperplastického endometria. Vyšetření mutací genu *K-ras* bylo provedeno z DNA získané z formalinem fixovaných, v parafinu zalitých vzorků tkání. DNA z parafinového bločku byla izolována pomocí kitu firmy Qiagen. Vlastní vyšetření *K-ras* mutace bylo realizováno metodou *K-ras StripAssay™* (ViennaLab Diagnostics GmbH). Tento test zahrnuje vyšetření 10 mutací v *K-ras* genu (kodon 12 a 13). PCR amplifikace s využitím biotinylovaných primerů byla provedena dle protokolu výrobce, pro analýzu bylo použito 25 ng izolované DNA. Amplifikace byla uskutečněna v termocykléru Veriti (Applied Biosystems, CA). Amplifikační reakce využívala teplotní profil: 94 °C 2 min, 35 cyklů (94 °C 1 min, 70 °C 50 s, 56 °C 50 s, 60 °C 1 min) a 60 °C 3 min. Amplifikaci následovala kontrolní elektroforéza na 2% agarosovém gelu (délky PCR produktů

151 bp a 204 bp). Amplifikované produkty byly dle protokolu výrobce hybridizovány na testovací strip (proužek) obsahující alelově-specifické imobilizované oligonukleotidové proby. Navázané biotinylované sekvence byly detekovány s využitím streptavidin-alkalické fosfatázy a barevného substrátu.

Ke statistickému zpracování získaných dat byl použit  $\chi^2$  test.

## Výsledky

Vlastní soubor sestával ze 30 karcinomů a 20 zdravých kontrol. Věkový medián pacientek s karcinomem byl 65 roků (rozmezí 52–77 roků) a 56 roků (rozmezí 50–79 roků) u pacientek kontrolní skupiny.

Vyšetřeno bylo 30 vzorků endometroidního karcinomu ve stadiu I (dle FIGO), mutace genu *K-ras* byla prokázána v 7 případech (23%). V kontrolní skupině 20 vzorků normálního endometria byla sledovaná mutace nalezena ve 3 případech (15%). Se spolehlivostí 0,95 je rozmezí výskytu mutace pro ženy s endometroidním karcinomem 10% až 42%, pro zdravé ženy je to 3% až 38%. Rozdíl mezi četností výskytu mutace v obou skupinách je však statisticky nevýznamný.

S ohledem na jednotlivá stadia a grade nádoru se mutace častěji vyskytovala ve stadiu IA a ve skupině dobře diferencovaných nádorů (tab. 1 a 2).

V kontrolní skupině byla sledovaná mutace popsána ve 3 vzorcích. Ve dvou případech se jednalo o normální proliferativní endometrium a v jednom o klidové endometrium u postmenopauzální ženy.

Tab. 1. *K-ras* mutace ve stadiu I dle FIGO endometroidního karcinomu.

Stadium	IA n = 4	IB n = 18	IC n = 8
<i>K-ras</i> mutace	3 (75 %)	3 (17 %)	1 (13 %)

Tab. 2. *K-ras* mutace s ohledem na grade endometroidního karcinomu.

Grade	1 n = 9	2 n = 18	3 n = 3
<i>K-ras</i> mutace	3 (33 %)	3 (17 %)	1 (33 %)

**Tab. 3. Genetické alterace u endometriálního karcinomu.**

Genetická alterace	Typ I karcinomu	Typ II karcinomu
<i>K-ras</i>	15–30 %	0–5 %
<i>PTEN</i>	35–50 %	10 %
<i>p53</i>	10–20 %	90 %
<i>Her2/neu</i>	10–20 %	9–30 %
<i>β-catenin</i>	31–47 %	0–3 %
mikrosat. instabilita	20–40 %	0–5 %

### Diskuze

Kromě zcela základních charakteristik, ze kterých obvykle vycházíme (stupeň postižení, typ nádoru a grading), existuje řada dalších ukazatelů, které mohou mít svoji prognostickou významnost. Nejínak je tomu u karcinomu endometria. Gynekologické zhoubné nádory představují skupinu chorob, u kterých je prognóza závislá také na subtilních genomických, epigenetických a proteomických změnách.

Tab. 3 ukazuje nejčastěji se vyskytující genetické alterace karcinomu endometria (typ I, II).

Ve vztahu k molekulární genetice je výrazněji profilován druhý typ karcinomu, který je méně častý a prognosticky horší (nevzniká na podkladě hyperplazie a není závislý na estrogenní stimulaci). Tento typ karcinomu je molekulárně geneticky charakterizován mutacemi genu *p53* a četnými ztrátami heterozygoty. Některé práce uvádějí, že gen *p53* je alterován až u 90 % serózních karcinomů [7]. Podle jiných autorů je mutace genu *p53* dvakrát častěji popisována u tumorů bez přítomnosti hyperplazie (estrogen non-dependentních) než u tumorů s hyperplazií (estrogen dependentních) [16,17]. Zvýšená exprese *p53* koreluje se špatnou diferenciací nádorů endometria, hloubkou myometriální invaze, pokročilým stadiem a metastatickým šířením [18,19].

Naopak zdaleka ne tak jasná je situace u prvního typu karcinomu, který vzniká na podkladě atypické hyperplazie a je podmíněn estrogenní stimulací. Stále není jasně prokázáno, která ze změn maligní transformaci iniciuje. Zdá se, že většina genetických alterací charakteristických pro toto nádorové onemocnění vzniká již na počátku tumorigeneze.

Nejčastěji se vyskytující genetickou poruchou u endometriálního karcinomu je mutace *PTEN* tumor-supresorového genu, která je popisována u 25–83 % všech tumorů [20]. Zatímco u jiných typů nádorů je tato alterace genu *PTEN* asociována s pokročilým onemocněním včetně metastatického postižení, u karcinomu endometria je tomu naopak a ztráta funkce *PTEN* genu je považována za časnou událost a navíc je spojována s velmi dobrou prognózou [21]. K nejčastěji popisovaným molekulárním abnormitám u endometroidního typu karcinomu patří spolu s mutací genu *PTEN* také mikrosatelitální instabilita (MI) způsobená poruchou funkce DNA mismatch repair (MMR) genů. Několik prací uvádí shodu ve výskytu MI a *PTEN* mutací; mutace je popisována u 60–86 % MI-pozitivních endometroidních karcinomů a pouze u 24–35 % tumorů, kde MI prokázána nebyla. Pro sporadické formy endometroidního karcinomu je typická inaktivace MMR genu *MLH1* následovaná poruchou exprese genů *MSH2* a *MSH6* [22]. Přítomnost MI je asociována s dobrou prognózou endometroidního karcinomu [8,23]. *β-catenin* je další z genů, jehož porušená funkce je spojována s procesem endometriálního karcinogeneze. Jeho mutace je signifikantně častěji popisována u endometroidních lézí (31–47 %) ve srovnání s non-endometroidním typem nádorů (0–3 %) [24]. Jiné práce uvádějí častější výskyt u endometriální hyperplazie, což by svědčilo pro podíl této mutace v časné karcinogenezi [25]. *Her2/neu* patří do skupiny protoonkogenů, jehož overexprese je popisována u 10–20 % endometroidních karcinomů se středním a nízkým stupněm diferenciací a některými autory je dávana do souvis-

losti s progresí onemocnění a horší prognózou. Mutace je dále popisována u 9–30 % serózních karcinomů a spolu s alterovaným genem *p53* je asociována s velmi špatnou prognózou u non-endometroidního typu nádorů [26,27].

Z dostupných pramenů je patrné, že mutace *K-ras* protoonkogenu je detekována u 10–30 % případů endometroidního karcinomu [5,13]. Také výsledky naší práce potvrzují účast mutace *K-ras* genu v procesu vzniku karcinomu endometria ve smyslu časné události [28,29]. Prezentace dosavadních výsledků o *K-ras* mutaci u karcinomu endometria a prognostický význam tohoto ukazatele však nejsou jednotné. Například S. F. Lax ve své práci připouští, že pro vznik endometroidního karcinomu lze použít podobný model patogeneze jako u kolorektálního karcinomu. Působení *K-ras* mutace přichází v úvahu jednak na úrovni přechodu z atypické hyperplazie do dobře diferencovaného endometroidního karcinomu, ale především potencuje progresi do méně diferencovaných forem nádoru [9]. Z práce Mizuchiho et al (n = 49) vyplývá, že *K-ras* mutace je nezávislý rizikový faktor odpovědný za agresivní chování endometriálního karcinomu [30]. Podobného názoru jsou i Ito et al (n = 221), kteří mutaci *K-ras* signifikantně spojují s přítomností metastáz v lymfatických uzlinách a předpokládají její důležitou roli v mechanismu odpovědném za nepříznivé biologické chování endometroidního karcinomu u postmenopauzálních pacientek [31].

Semczuk et al (n = 57) na souboru pacientek s karcinomem endometria neprokázali souvislost přítomnosti *K-ras* mutace s věkem, stadiem, hloubkou invaze ani gradingem nádoru. Data podporují hypotézu o náhodné aktivaci *K-ras* genu v lidském neoplastickém endometriu a dále autoři naznačují, že by průkaz mutovaného protoonkogenu mohl být negativním prognostickým faktorem [32]. Naproti tomu práce kolektivu Esteller et al (n = 55) dokazuje, že *K-ras* mutace je relativně běžnou událostí v procesu endometriálního karcinogeneze, ale bez jasného prognostického významu [33]. Ani Jones et al (n = 32) neprokázali vliv přítomnosti

*K-ras* mutace na prognózu onemocnění. Autoři srovnávali výskyt mutace *p53* a *K-ras* a jejich vztah k celkovému přežití pacientek s karcinomem endometria, kdy mutace *p53* silně korelovala s krátkým přežitím, *K-ras* však nikoli [34]. Studie autorů Pijnenborga et al (n = 44) se zabývala otázkou *K-ras* mutace u recidivujícího endometriálního karcinomu, kdy nebyl pozorován vliv této mutace na vznik recidivy onemocnění [35]. Několik prací se zabývalo také problematikou mutovaného *K-ras* genu u žen léčených Tamoxifenem. Prasad et al (n = 29) porovnávali pacientky s karcinomem endometria vzniklým při léčbě Tamoxifenem s pacientkami se sporadickým endometriálním karcinomem, kdy nebyl prokázán statistický rozdíl mezi četností výskytu mutace u obou vyšetřovaných skupin [36]. Tsujioka et al (n = 28) prokázali mutovaný *K-ras* gen u 46 % pacientek léčených Tamoxifenem. Po zastavení léčby u pacientek mutace již prokázána nebyla. Z práce vyplývá, že ukončení léčby Tamoxifenem by mohlo redukovat riziko vzniku karcinomu endometria cestou mutovaného genu *K-ras* [37].

V porovnání se sporadickými formami endometriálního karcinomu je genetické pozadí u hereditárních forem nádoru mnohem méně prozkoumané. Jedná se především o endometriální karcinomy vznikající v souvislosti s Lynchovým syndromem neboli HNPCC (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). Endometriální karcinom je nejčastější malignita, která se u pacientek s Lynchovým syndromem vyskytuje [38]. Lynchův syndrom je spojován s mutací genů patřících do rodiny mismatch repair (MMR), např. *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* nebo *PMS2* [39]. Zdá se, že mechanismus vzniku endometriálního karcinomu v rámci HNPCC je důsledkem poruchy odlišných genů, než je tomu u kolorektálního karcinomu. Inaktivace komplexu genů *MSH2/MSH6* hraje pravděpodobně zásadní roli v procesu karcinogeneze [40]. Další genetickou alterací, která se uplatňuje v nádorovém procesu, je mutace *PTEN* genu, která se vyskytuje asi v 90 % případů endometriálního karcinomu u pacientek s Lynchovým syndromem [41].

## Závěr

Prognostický význam molekulárně genetických faktorů u karcinomu endometria se přelomově liší v závislosti na typu nádoru. Jasně je definován u tumor-supresorového genu *p53* a nádorů druhého typu, kde koreluje s horší prognózou. U častějších endometrioidních nádorů prvního typu však nejsou dosud publikované výsledky zdaleka tak jasné. Jako nejčastější událost na této úrovni je u nich popisována mutace genu *PTEN* a mikrosatelitální instabilita.

Naše výsledky u představitelk místní populace podporují teorii o možném podílu *K-ras* mutace v procesu endometriálního karcinogeneze u nádorů prvního typu ve smyslu časné události.

## Literatura

1. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983; 15(1): 10–17.
2. Liu FS. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2007; 46(1): 26–32.
3. Mutter GL. Pten, a protean tumor suppressor. *Am J Pathol* 2001; 158(6): 1895–1898.
4. Esteller M, Levine R, Baylin SB et al. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* 1998; 17(18): 2413–2417.
5. Caduff RF, Johnston CM, Frank TS. Mutations of the *Ki-ras* oncogene in carcinoma of the endometrium. *Am J Pathol* 1995; 146(1): 182–188.
6. Saegusa M, Hashimura M, Yoshida T et al. Beta-catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. *Br J Cancer* 2001; 84(2): 209–217.
7. Tashiro H, Isacson C, Levine R et al. *p53* gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* 1997; 150(1): 177–185.
8. Catusas L, Machin P, Matias Guiu X et al. Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. *Hum Pathol* 1998; 29: 1160–1164.
9. Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch* 2004; 444(3): 213–223.
10. Tashiro H, Blazes MS, Wu R et al. Mutations in *PTEN* are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* 1997; 57(18): 3935–3940.
11. Tashiro H, Lax SF, Gaudin PB et al. Microsatellite instability is uncommon in uterine serous carcinoma. *Am J Pathol* 1997; 150(1): 75–79.
12. Cibula D, Petruželka L et al. *Onkogynekologie*. Praha: Grada Publishing 2009.
13. Engelsens IB, Akslen LA, Salvesen HB. Biologic markers in endometrial cancer treatment. *AMPIS* 2009; 117(10): 693–707.
14. Lax SF, Kurman RJ. A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analysis. *Verh Dtsch Ges Patol* 1997; 81: 228–232.
15. Sasaki H, Nishii H, Takahashi H et al. Mutation of the *Ki-ras* protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53(8): 1906–1910.

16. Koul A, Willén R, Bendahl PO et al. Distinct sets of gene alteration in endometrial carcinoma implicate alternate modes of tumorigenesis. *Cancer* 2002; 94(9): 2369–2379.
17. Kaku T, Kamura T, Hirakawa T et al. Endometrial carcinoma associated with hyperplasia – immunohistochemical study of angiogenesis and *p53* expression. *Gynecol Oncol* 1999; 72(1): 51–55.
18. Pilka R, Mickova I, Lubusky M et al. Expression of *p53*, *Ki-67*, *bcl-2*, *c-erb-2*, estrogen, and progesterone receptors in endometrial cancer. *Ceska Gynekol* 2008; 73(4): 222–227.
19. Pilka R, Markova I, Duskova M et al. Immunohistochemical evaluation and lymph node metastasi in surgically staged endometrial carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2010; 31(5): 530–535.
20. Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The molecular biology of endometrial cancers and implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer Control* 2009; 16(1): 8–13.
21. Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL et al. *PTEN* mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathological characteristics. *Clin Cancer Res* 1998; 4(12): 3005–3010.
22. Okuda T, Sekizawa A, Purwosunu Y et al. Genetics of endometrial cancers. *Obstet Gynecol Int* 2010; 2010: 984013.
23. Maxwell GL, Risinger JI, Alvarez AA et al. Favorable survival associated with microsatellite instability in endometroid endometrial cancers. *Obstet Gynecol* 2001; 97(3): 417–422.
24. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sánchez C et al. Abnormalities of the *APC/β-catenin* pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 2002; 21(52): 7981–7990.
25. Nei H, Saito T, Yamasaki H et al. Nuclear localization of *β-catenin* in normal and carcinogenic endometrium. *Mol Carcinog* 1999; 25(3): 207–218.
26. Slomovitz BM, Broaddus RR, Burke TW et al. *Her-2/neu* overexpression and amplification in uterine papillary serous carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22(15): 3126–3132.
27. Williams JA Jr, Wang ZR, Parrish RS et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of *HER-2/neu*, *c-myc*, and *p53* in endometrial cancer. *Exp Mol Pathol* 1999; 67(3): 135–143.
28. Krepinska E, Chmelarova M, Palicka V et al. Mutation of *K-ras* gene in carcinogenesis of endometrial carcinoma. Book of abstracts 13th Biennial Meeting of the International Gynecological Cancer Society, Prague, October 23–26, 2010.
29. Krepinska E, Chmelarova M, Laco J et al. Mutation of *K-ras* gene in pathogenesis of endometrial carcinoma. Book of abstracts 17th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology, Milan, Italy, September 11–14, 2011.
30. Mizuuchi H, Nasim S, Kudo R et al. Clinical implications of *K-ras* mutations in malignant epithelial tumors of the endometrium. *Cancer Res* 1992; 52(10): 2777–2781.
31. Ito K, Watanabe K, Nasim S et al. *K-ras* point mutations in endometrial carcinoma: Effect on outcome is dependent on age of patient. *Gynecol Oncol* 1996; 63(2): 238–246.
32. Semczuk A, Berbec H, Kostuch M et al. *K-ras* gene point mutations in human endometrial carcinomas: correlation with clinicopathological features and patients' outcome. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124(12): 695–700.
33. Esteller M, García A, Martínez-Palones JM, et al. The clinicopathological significance of *K-RAS* point mutation and gene amplification in endometrial cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33(10): 1572–1577.
34. Jones MW, Kounelis S, Hsu C et al. Prognostic value of *p53* and *K-ras-2* topographic genotyping in endometrial

carcinoma: A clinicopathologic and molecular comparison. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16(4): 354–360.

35. Pijnenborg JM, Dam-de Veen GC, Kisters N et al. RASSF1A methylation and K-ras and B-raf mutations and recurrent endometrial cancer. *Ann Oncol* 2007; 18(3): 491–497.

36. Prasad M, Wang H, Douglas W et al. Molecular genetic characterization of tamoxifen-associated endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 96(1): 25–31.

37. Tsujioka H, Hachisuga T, Fukuoka M et al. Monitoring of Endometrial K-ras Mutation in Tamoxifen-Treated Pa-

tients With Breast Cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19(6): 1052–1056.

38. Koornstra JJ, Mourits MJ, Sijmons RH et al. Management of extracolonic tumours in patients with Lynch syndrome. *Lancet Oncol* 2009; 10(4): 400–408.

39. Peltomäki P, Vasen HF, Bisgaard ML et al. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997; 113(4): 1146–1158.

40. Schweizer P, Moisio AL, Kuismanen SA et al. Lack of MSH2 and MSH6 characterizes endometrial but not colon carcinomas in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61(7): 2813–2815.

41. Zhou XP, Kuismanen S, Nystrom-Lahti M et al. Distinct PTEN mutational spectra in hereditary non-polyposis colon cancer syndrome-related endometrial carcinomas compared to sporadic microsatellite unstable tumors. *Hum Mol Genet* 2002; 11(4): 445–450.