

## The role of the *PTEN* gene alterations in the pathogenesis of the endometrial carcinoma

Rola zaburzeń genu *PTEN* w etiopatogenezie raka *endometrium*

Роль расстройтва гена ПТЭН в этиопатогенезе рака эндометрия

<sup>1</sup> Zakład Genetyki Medycznej AM, Lublin. Kierownik: prof. dr hab. n. med. J. Wojciewowski

<sup>2</sup> I Oddział Chemioterapii Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej. Kierownik: dr E. Starosławska

Correspondence to: Tomasz Kubiawski, Zakład Genetyki Medycznej Akademii Medycznej w Lublinie,

ul. Radziwiłłowska 11, 20-950 Lublin, tel. (0\*81) 532 34 17

Source of financing: Department own sources

### Summary

Sporadic endometrial carcinoma, most frequently diagnosed in routine practice, can be divided into two biologically and clinically distinctive subtypes of which one is estrogen-related (type I), the other estrogen-unrelated (type II). The type I of endometrial carcinoma usually shows mutations of tumor suppressor phosphatase tensin homologue (*PTEN*) accompanied by *K-Ras* and *β-catenin* genes mutations and microsatellite instabilities whereas alterations of genes encoding *p53* and *p16* proteins or *her2/neu* amplifications are observed infrequently. Mutations of *PTEN* gene, localized on chromosome 10, leading to loss of gene function can increase the neoplastic transformation. PI3-k phosphorylation and accumulation of active forms of Akt within neoplastic cells lead to up-regulation of Bad protein resulting in Bcl-2, Bcl-xl proteins and caspase-9 mediated apoptotic pathway inhibition. Heterogeneity of *PTEN* gene expression observed in surgical specimens correlates to histological stage of carcinoma and prognosis. *PTEN* expression is an important prognostic factor reflecting longer overall survival in group of patients diagnosed with advanced stages of endometrial cancer treated with adjuvant chemotherapy. Loss of *PTEN* gene expression can suggest tumor progression. However, incorporation of *PTEN* expression analysis into routine diagnostic procedure is limited by the presence of *PTEN* pseudogene, which is actively transcribed in various neoplastic tissues including endometrial cancer but not in normal endometrial tissue.

**Key words:** endometrial cancer, *PTEN*, mutations, carcinogenesis

### Streszczenie

Nowotworami *endometrium* diagnozowanymi najczęściej w codziennej praktyce są sporadyczne raki *endometrium*, które pod względem biologicznym i klinicznym podzielić można na dwa typy, tj. nowotwory estrogenowo zależne (typ I) oraz estrogenowo niezależne (typ II). Nowotwory zaliczane do typu I charakteryzują się przede wszystkim obecnością mutacji genu *PTEN*. Zjawiskami towarzyszącymi są mutacje genów *K-Ras*, *β-kateniny* oraz niestabilności mikrosatelitarne. Rzadziej natomiast stwierdzane są takie zmiany, jak mutacje genów *p53*, *p16* czy amplifikacja *her2/neu*. Obecność mutacji w genie *PTEN* zlokalizowanym na chromosomie 10 prowadząca do utraty funkcji genu zwiększać będzie zdolność komórki do transformacji nowotworowej. Fosforylacja PI3-k oraz nagromadzenie aktywnych form Akt w komórkach nowotworowych prowadzić będą do aktywacji licznych białek antyapoptotycznych, m.in. białka Bad, czego wynikiem jest blokowanie białek Bcl-2, Bcl-xl oraz szlaku śmierci komórki pośredniczonego przez kaspazę 9. Heterogenność ekspresji genu *PTEN* stwierdzana w materiale klinicznym pozostaje w korelacji ze stopniem złośliwości histologicznej nowotworu oraz rokowaniem klinicznym. Ekspresja białka *PTEN* jest istotnym czynnikiem prognostycznym, mówiącym o dłuższym przeżyciu chorych ze zdiagnozowanymi zaawansowanymi postaciami raka *endometrium* poddanych uzupełniającej chemioterapii. Z kolei brak ekspresji genu *PTEN* wskazywać może na rozsiew choroby nowotworowej. Stosowanie analizy ekspresji genu *PTEN* w rutynowej diagnostyce u chorych z rozpoznany rakiem *endometrium* podlega licznym ograniczeniom. Jednym z nich jest obecność pseudogenu *PTEN* aktywnie transkrybowanego tylko w zmienionych nowotworowo tkankach, w tym także w zmienionym nowotworowo *endometrium*.

**Słowa kluczowe:** rak *endometrium*, *PTEN*, mutacje, karcinogeneza

## Содержание

Новообразованиями эндометрия, которые диагностируются чаще всего в ежедневной практике, являются спорадические новообразования эндометрия, которые с биологической и клинической точки зрения можно разделить на два типа, т.е. новообразования эстрогенно зависимые (тип 1) и эстрогенно независимые (тип 2). Новообразования относящиеся к первому типу характеризуются прежде всего наличием мутанта гена ПТЭН. Явлениями, которые ему сопутствуют, являются мутации генов К-Рас, b-катенина и микроспутниковые нестабильности. Зато реже встречаются такие изменения как мутация гена p53, p16 или амплификация гер2/неу. Присутствие мутации в гене ПТЭН, который обнаружен на хромосоме 10, ведущее к потере функции гена, будет увеличивать способность клетки к преобразованию новообразований. Фосфорилиция ПИ3-к и концентрация активных форм Акт в клетках новообразований приведет к активации многочисленных антиапоптотических белков, в частности белка Бад, следствием чего является блокировка белков Бцл-2, Бцл-ксл, а также дороги смерти клетки промежуточным путем каспазы 9. Гетерогенность выразительности гена ПТЭН, констатируемая в клиническом материале, остается в соотношении со степенью гистологической злокачественности новообразования и клиническим прогнозом. Выразительность белка ПТЭН является существенным прогностическим фактором свидетельствующим о длительном периоде жизни больных страдающих диагностированными видами развитого рака эндометрия, которые дополнительно лечились при использовании химиотерапии. Отсутствие выразительности гена ПТЭН может свидетельствовать о дисперсии болезни связанной с новообразованиями. Применение анализа выразительности гена ПТЭН в рутинной диагностике у больных с распознанным раком эндометрия связано с многочисленными ограничениями. Одним из них является наличие псевдогена ПТЭН активно транскрибированного только в тканях измененных под влиянием новообразований, в том числе также в измененном под влиянием новообразований эндометрия.

**Ключевые слова:** рак эндометрия, ПТЭН, мутации, канцерогенез

Endometrial cancer is one of the most commonly diagnosed malignancies of the female genital system. It rarely occurs in women younger than 40 years but its frequency increases in women older than 50. Worth underlining is the constant increase in incidence observed since the early 70s of the 20<sup>th</sup> century. This is due to changes in lifestyle as well as frequent estrogens uptake, including conjugate estrogens used in the prophylaxis of osteoporosis and diseases of the cardiovascular system. Other factors include more numerous population of older women (70% of new cases are diagnosed in women aged >50), obesity and infertility (lack of pregnancies and given births).

Due to the increasing incidence over the last decades, the endometrial cancer has been thoroughly investigated on the molecular level in order to establish the mechanisms leading to its formation and to distinguish protein products useful as markers of the neoplastic process. According to the principles of the molecular biology, all endometrial cancers may be divided into sporadic (non-hereditary) and familial. The latter, accounting for the minority of cases, develop on the basis of HNPCC (hereditary non-polyposis colon cancer). They are usually diagnosed 2 decades earlier than the sporadic cases. On the molecular level, they are characterized by the presence of microsatellite instabilities and mutations in the *MLH1* and *MSH2* genes. Their protein products are the key elements of the DNA repair system<sup>(1)</sup>. Sporadic endometrial cancer is the most common type diagnosed in everyday practice. Biologically and clinically, they can

Rak *endometrium* jest jednym z częściej rozpoznawanych nowotworów narządu rodowego. Rzadko występuje przed 40. rokiem życia, jego częstość znacząco wzrasta u kobiet, które ukończyły 50. rok życia. Godny podkreślenia jest stały wzrost liczby zachorowań obserwowany od początku lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia, wiążący się ze zmianą stylu życia, a także częstym przyjmowaniem estrogenów, w tym estrogenów skoniugowanych stosowanych w profilaktyce osteoporozy oraz schorzeń układu sercowo-naczyniowego. Spośród innych czynników wymienić należy zwiększenie się liczby kobiet w starszym wieku (70% nowych zachorowań wykrywanych jest u kobiet w wieku powyżej 50 lat), otyłość oraz niepłodność rozumianą jako brak przeżytych ciąż oraz odbytych porodów.

W związku z obserwowaną w ciągu ostatnich dziesięcioleci tendencją wzrostową zachorowalności na raka *endometrium* nowotwór ten był niezwykle intensywnie badany na poziomie molekularnym celem poznania mechanizmów prowadzących do jego powstawania oraz wyodrębnienia produktów białkowych mogących stanowić markery toczącego się procesu nowotworowego. Z punktu widzenia biologii molekularnej wszystkie raki *endometrium* podzielić możemy na sporadyczne (nieodziedziczone) oraz stanowiące niewielki odsetek przypadków raki uwarunkowane rodzinnie, rozwijające się na podłożu HNPCC (ang. *hereditary non-polyposis colon cancer*). Są one najczęściej diagnozowane dwie dekady wcześniej niż nowotwory sporadyczne, zaś na poziomie molekularnym charakteryzują się obecnością niestabil-

be subdivided into two types<sup>(2)</sup>. Type I includes estrogen-related cancers diagnosed in younger patients. They exhibit the expression of the estrogen and progesterone receptors, often coexist with the endometrial hyperplasia and have a fairly good prognosis. Type II cancers are diagnosed in older women as estrogen-unrelated cancers and often develop on the basis of atrophic lesions of the endometrium. The prognosis in the latter group is relatively poorer. The both mentioned groups differ significantly as far as molecular biology is concerned. Type I cancers, including endometrial adenocarcinoma, present with the *PTEN* gene mutations. Concomitant features are *K-Ras* and *β-catenin* gene mutations as well as microsatellite instabilities. Other changes such as the *p53* and *p16* gene mutations as well as *her2/neu* amplification are less frequently observed<sup>(1)</sup>.

The *PTEN/MMAC1* gene, localized on the chromosome 10q23, is presently recognized to play the key role in the development of the majority of the endometrial malignancies. *PTEN* mutations present in the germ cells lead to the formation of neoplastic syndromes with the autosomal dominant hereditary pattern<sup>(3)</sup>. Point mutations or deletions in the *PTEN* sequence resulting in the lack of its expression are connected with the development of the neoplastic process. They have been observed by many authors in the histopathological material of patients diagnosed with the endometrial cancer<sup>(4-6)</sup>. The above facts were confirmed in the research of Gao et al.<sup>(7)</sup> According to the mentioned researchers, *PTEN* gene expression on the mRNA level as well as the protein level were significantly lower in patients diagnosed with endometrial cancer or atypical endometrial hyperplasia in comparison with the healthy population. In case of the endometrial cancer there was a correlation between the *PTEN* expression and the degree of the histological differentiation of the cancer. Such a correlation did not apply to the degree of the myometrium infiltration and clinical stage. It is highly suggestive of the fact that these alterations are present in the early stages of the neoplastic process. The gene analysis performed by Yaginuma et al.<sup>(8)</sup> revealed that 60% of the mutations were localized in the exons 5 and 8. These are mainly frame shift mutations as well as missense and nonsense mutations<sup>(5)</sup>. It is worth underlining that the exon 5 is a functional domain of the *PTEN* gene and its mutations may lead to the loss of its function. Similar alteration were not observed in the physiological endometrium. Exons 4, 6 and 9 do not undergo mutations<sup>(6)</sup>. Moreover, interesting results were obtained from the research of Ikeda et al.<sup>(9)</sup> that analyzed *PTEN* mutations related to *K-Ras* gene mutations. The latter plays, like *PTEN*, an important role in the etiopathogenesis of the endometrial cancer<sup>(10-12)</sup>. The analysis of the changed endometrium revealed that the mutation could be found in either *PTEN* gene sequence or in *K-Ras* but never in both. It proves that the protein products of these genes play a part in the same pathway regulating the growth

ności mikrosatelitarnych oraz mutacji w genach *MLH1* i *MSH2*, których produkty białkowe stanowią kluczowe elementy systemu naprawy DNA<sup>(1)</sup>. Nowotworami *endometrium* diagnozowanymi najczęściej w codziennej praktyce są sporadyczne raki *endometrium*, które pod względem biologicznym i klinicznym podzielić można na dwa typy<sup>(2)</sup>. Typ I stanowią będą nowotwory estrogenowo zależne diagnozowane u młodszych chorych. Cechują się one ekspresją receptorów estrogenowego i progesteronowego, częstym współistnieniem hiperplazji *endometrium* oraz stosunkowo dobrym rokowaniem. Raki typu II wykrywane u starszych kobiet, będąc nowotworami estrogenowo niezależnymi, rozwijają się bardzo często na podłożu zmian atroficznych *endometrium* i cechują gorszym rokowaniem. Obie wymienione grupy nowotworów różnią się znacząco również pod względem biologii molekularnej. Nowotwory *endometrium* zaliczane do typu I, wśród których wyróżnić możemy gruczolowego raka endometrioidalnego, charakteryzują się przede wszystkim obecnością mutacji genu *PTEN*. Zjawiskami towarzyszącymi są mutacje genów *K-Ras*, *β-kateniny* oraz niestabilności mikrosatelitarne. Rzadziej stwierdzane są natomiast takie zmiany, jak mutacje genów *p53*, *p16* czy amplifikacja *her2/neu*<sup>(1)</sup>.

Gen *PTEN/MMAC1* zlokalizowany na chromosomie 10q23 uważany jest obecnie za kluczowy gen supresorowy dla rozwoju większości nowotworów pochodzenia endometrialnego. Mutacje genu *PTEN* obecne w liniach zarodkowych prowadzą do powstawania zespołów nowotworowych dziedziczonych autosomalnie dominująco<sup>(3)</sup>. Mutacje lub delecje sekwencji *PTEN* powodujące brak ekspresji tego genu są ściśle związane z rozwojem procesu nowotworowego i stwierdzane były przez wielu badaczy w materiale histopatologicznym pochodzącym od kobiet ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową *endometrium*<sup>(4-6)</sup>. Potwierdzenie powyższych obserwacji przyniosły badania Gao i wsp.<sup>(7)</sup> Stwierdzili oni, że ekspresja genu *PTEN* na poziomie mRNA oraz białka u chorych ze zdiagnozowanym rakiem *endometrium* lub atypowym przerostem *endometrium* była znacząco niższa niż ta stwierdzana w materiale pobranym od osób zdrowych. W przypadku raka *endometrium* ściśle korelowała ona ponadto ze stopniem histologicznego zróżnicowania nowotworu. Podobnej zależności nie stwierdzono w przypadku stopnia naciekania *myometrium* czy klinicznego zaawansowania nowotworu. Sugeruje to, że zmiany te występują już we wczesnych etapach rozwoju procesu nowotworowego. Analiza genu dokonana przez Yaginumę i wsp.<sup>(8)</sup> wykazała, że 60% mutacji zlokalizowanych było w egzonach 5 i 8. Są to najczęściej mutacje zmiany ramki odczytu oraz mutacje typu *missense* i *nonsense*<sup>(5)</sup>. Warty podkreślenia jest fakt, że egzon 5 jest funkcjonalną domeną genu *PTEN*, zaś mutacje w jego obrębie prowadzić mogą do utraty funkcji genu. Podobnych zmian nie stwierdzano w *endometrium* prawidłowym. Egzonami nieulegającymi mutacjom są egzony 4, 6 i 9<sup>(6)</sup>.

within the endometrium. The presence of *PTEN* mutations leading to the loss of function will surely increase the cell's ability of the neoplastic transformation and make the cell insusceptible to apoptosis.

The protein product of the *PTEN* gene plays the main role in the regulation of transducing the signal mediated by phosphatidyl-inositol kinase (PI3-k). Acting as a phosphatase, it catalyses the reaction of removing the phosphate residue from the position 3 in the inositol ring of the phosphatidyl-inositol triphosphate. This compound directly activates the protein kinase B (PKB/Akt), hence regulating the proliferation and survival of the cells<sup>(13)</sup>. Three isoforms of Akt (Akt1, Akt2 and Akt3) have been discovered so far. N-terminal PH domain of the PKB/Akt protein acts as an autoinhibitory domain. It has a high affinity to phosphatidyl-inositol bi- and triphosphate. Binding these compound, it moves towards the cell membrane and activates the catalytic domain. PI3-k phosphorylation and the accumulation of the Akt active forms<sup>(14)</sup> in the cancer cells lead to the activation of numerous antiapoptotic proteins. These include the Bad protein which physiologically blocks the Bcl-2 and Bcl-xl protein as well as the cell's death pathway mediated by the caspase-9. As a result, signalling pathways enabling the cell's survival are activated. According to Mazurek et al.<sup>(15)</sup>, the cytoplasmatic localization of the Bcl-2 protein was observed in 51.3% of the patients diagnosed with FIGO I endometrial cancer. As far as FIGO II and III endometrial cancers are concerned, the expression was found in 23.8% and 0% of the patients respectively. The correlation between Bcl-2 expression and the clinical stage is also interesting. Sakuragi et al.<sup>(16)</sup> proved that cytoplasmatic localization of Bcl-2 was rare in the cases of cancer with more profound infiltration of the myometrium. In addition, there was also a correlation between the nuclear localization of Bcl-2 and metastases to the pelvic lymph nodes. The localization in the nucleus, unlike in the cytoplasm, implied a definitely lower survival rate. As it is currently seen, the localization of Bcl-2 may be a valuable prognostic factor in the endometrial cancer, proving the malignancy of the process<sup>(17)</sup>. The neoplastic cells' survival is also associated with the excessive *COX-2* gene expression. The mentioned gene plays an important role in the activation of prostaglandin E2 and hence angiogenesis. According to St-Germain et al.<sup>(18)</sup>, *COX-2* expression in *PTEN*-negative cells with a high level of Akt phosphorylation was increased on the level of both mRNA and protein. It was accompanied by increased expression of Akt-dependent NFκB factor which activates the *COX-2* expression on the level of the promotor<sup>(19)</sup> as well as increased synthesis of the prostaglandin PGE2. Incubation of *PTEN*-negative cells with specific PI3-K inhibitors such as Wortmanina or LY294002 led to decreased extent of Akt phosphorylation. Hence, *COX-2* expression was decreased and apoptosis in the cancer cells facilitated.

Ciekawych wyników dostarczyły ponadto badania Ikedy i wsp.<sup>(9)</sup> analizujących mutacje w genie *PTEN* w odniesieniu do mutacji w genie *K-Ras*, odgrywającym, podobnie jak *PTEN*, ważną rolę w etiopatogenezie raka *endometrium*<sup>(10-12)</sup>. Badając tkanki zmienionego nowotworowo *endometrium*, stwierdzili oni występowanie mutacji w sekwencji genu albo *PTEN*, albo *K-Ras*, nigdy zaś w obu. Może to dowodzić, że produkty białkowe tych genów odgrywają pewną rolę w tym samym szlaku regulującym wzrost w obrębie *endometrium*. Obecność mutacji w genie *PTEN* prowadząca do utraty funkcji genu będzie zwiększać zdolność komórki do transformacji nowotworowej oraz czynić ją niewrażliwą na zjawisko apoptozy. Produkt białkowy genu *PTEN* odgrywa główną rolę w regulacji szlaku przekazywania sygnału pośredniczonego przez kinazę fosfatydyloinozytolową (PI3-k). Posiadając aktywność fosfatazy, katalizuje on reakcję odłączania reszty fosforanowej z pozycji 3. pierścienia inozytowego trójfosforanu fosfatydyloinozytolu. Związek ten, aktywując bezpośrednio kinazę białkową B (PKB/Akt), reguluje proliferację i przeżycie komórek<sup>(13)</sup>. Do chwili obecnej poznano trzy izoformy Akt, tj. Akt1, Akt2 i Akt3. N-końcowa domena PH białka PKB/Akt spełnia funkcję domeny autoinhibitorowej. Wykazuje ona wysokie powinowactwo do dwu- i trójfosforanu fosfatydyloinozytolu. Wiążąc je, przemieszcza się w kierunku błony komórkowej oraz aktywuje domeną katalityczną.



The equilibrium between activation and inactivation that is established between PI3-k and Akt and regulated by PTEN protein is extremely important for the neoplastic cell as far as its entering the cell cycle is concerned. The active form of the Akt protein catalyses the phosphorylation of serine-threonine kinase GSK3 (glycogen synthase kinase-3) and hence leads to its inactivation and accumulation of cyclin D within the cell. This, in turn, commences the cell division<sup>(13)</sup>. These observations have been confirmed in the research on PTEN-negative endometrial cancer cells. Adding exogenous PTEN protein to the culture led to the cell cycle being terminated in the G1 phase which resulted from the significant reduction of the cyclin D3 level as well as the increase in p21 inhibiting protein level. The latter is linked with the cyclin-dependent kinase CDK2. The stimulation of the PTEN-positive cells with exogenous cyclin D3 abolished the inhibitory influence of the PTEN protein, hence enabling the cells to enter the cell cycle<sup>(20)</sup>.

Discovering the role of the *PTEN* gene in the formation of the endometrial cancer was a springboard to analyses of correlations between the PTEN expression and clinical prognosis in patients diagnosed with endometrial cancer. It was proved by Minaguchi et al. that the presence of mutations in exons other than 5, 6 or 7 combined with FIGO stage I/II and G1 differentiation was associated with a significantly better clinical prognosis<sup>(21)</sup>. Interesting conclusions were also drawn from the research of Kanamori et al.<sup>(22)</sup> The correlation between *PTEN* expression and prognosis in the advanced endometrial cancer was analyzed. 98 patients diagnosed with endometrioid carcinoma and metastases to the retroperitoneal lymph nodes were taken into account. In 65.3% of the patients, disorders or lack of the PTEN expression were found. The obtained results revealed that the survival rate was significantly higher in PTEN-positive patients when compared with PTEN-negative ones or those who displayed a heterogeneous expression in the tumor. The *PTEN* expression did not depend on the patient's age, FIGO stage, the depth of the myometrium infiltration or the histological grade. Of 98 analyzed patients, 87 were, after the surgery, treated with subsequent radio- or chemotherapy. In the radiotherapy group, there was no connection between PTEN expression and the survival rate. Contrarily, in the chemotherapy group, the survival rate in PTEN-positive patients was significantly higher than in patients with negative or heterogeneous PTEN expression. According to a multivariate analysis, as far as survival rate is concerned, PTEN expression is a significant prognostic factor in patients with endometrial cancer who underwent chemotherapy. The results of Kanamori are similar to those obtained by other researchers<sup>(23)</sup>. Moreover, the loss of *PTEN* expression may imply that the disease is disseminated<sup>(24)</sup>.

There are, however, certain limitations in the possible use of *PTEN* expression analysis in the routine diagnosis in

Fosforylacja PI3-k oraz nagromadzenie form aktywnych Akt<sup>(14)</sup> w komórkach nowotworowych prowadzi będą do aktywacji licznych białek antyapoptotycznych, wśród których ważną rolę odgrywać będzie białko Bad blokujące w warunkach fizjologicznych białko Bcl-2, Bcl-xl oraz szlak śmierci komórki pośredniczony przez kaspazę 9. Skutkiem tego dochodzi w komórce do aktywacji szlaków sygnałowych warunkujących jej przeżycie. Jak wykazali Mazurek i wsp.<sup>(15)</sup>, cytoplazmatyczna lokalizacja białka Bcl-2 stwierdzana była u 51,3% chorych ze zdiagnozowanym rakiem *endometrium* w stopniu I wg FIGO. W analizie materiału pobranego od chorych z nowotworem w stopniu II lub III wg FIGO ekspresja ta odnotowywana była odpowiednio u 23,8% oraz 0% chorych. Niezwykle ciekawa jest zależność między ekspresją Bcl-2 i jego lokalizacją a stopniem zaawansowania procesu nowotworowego. Sakuragi i wsp.<sup>(16)</sup> rzadziej obserwowali cytoplazmatyczną lokalizację Bcl-2 w przypadkach, gdy rak naciekał głębsze warstwy mięśniówki macicy. Stwierdzono także zależność między lokalizacją jądrową Bcl-2 i przerzutami do węzłów chłonnych miednicy. Lokalizacja jądrowa, w przeciwieństwie do cytoplazmatycznej, wiązała się ponadto ze zdecydowanie krótszym okresem przeżycia. Obecnie uważa się więc, że w przypadku raków *endometrium* lokalizacja Bcl-2 może być bardzo cennym czynnikiem prognostycznym dowodzącym złośliwienia procesu nowotworowego<sup>(17)</sup>. Ze zjawiskiem przeżycia komórek nowotworowych wiąże się także stwierdzana w komórkach raka *endometrium* nadmierna ekspresja genu *COX-2* odgrywającego ważną rolę w aktywacji prostaglandyny E2, a tym samym zjawisk angiogennych. Jak wykazali St-Germain i wsp.<sup>(18)</sup>, ekspresja *COX-2* w komórkach PTEN-negatywnych charakteryzujących się wysokim stopniem ufosforylowania Akt była zwiększona na poziomie zarówno mRNA, jak i białka. Towarzyszyły temu zwiększona ekspresja czynnika NFκB zależnego od Akt, aktywującego ekspresję *COX-2* na poziomie promotora<sup>(19)</sup> oraz zwiększona synteza prostaglandyny PGE2. Podziało na komórki PTEN-negatywne specyficznymi inhibitorami PI3-K, takimi jak Wortmanina czy LY294002, prowadziło do zmniejszenia stopnia ufosforylowania Akt, a tym samym zmniejszenia ekspresji *COX-2* oraz nasilenia zjawiska apoptozy w komórkach raka *endometrium*.

Regulowane przez białko PTEN zachowanie równowagi zjawisk aktywacji i inaktywacji zachodzących między PI3-k oraz Akt jest niezmiernie ważne dla podejmowania przez komórkę nowotworową decyzji o jej „wchodzeniu” w cykl podziałowy. Aktywna postać białka Akt, katalizując fosforylację kinazy serynowo-treoninowej GSK3 (*glycogen synthase kinase-3*), prowadzi do jej inaktywacji i nagromadzenia w komórce cykliny D, zapoczątkowując przemianę cyklu podziałowego<sup>(13)</sup>. Obserwacje te potwierdzone zostały w badaniach na liniach komórkowych raka *endometrium* PTEN-negatywnych. Dodanie do hodowli egzogenego białka PTEN prowadziło do

patients with the endometrial cancer. One of them is the presence of *PTEN* pseudogene, that is actively transcribed only in neoplastically altered cells, endometrial cancer included<sup>(25)</sup>. The analysis of its expression on the protein level does not reveal protein products but the presence of *PTEN* pseudogene can limit the correctness of the result on the mRNA level. Hence, it requires incredibly meticulous probe selection.

The disorders of the *PTEN* gene function described above, frequently observed in the atypical endometrial hyperplasia, are currently recognized as early symptoms of progression in type I endometrial cancers<sup>(12)</sup>. In case of type II endometrial cancers, e.g. serous endometrial cancer, the main disorders are *p53* and *p16* mutations leading to the loss of function as well as *her2/neu* gene amplifications<sup>(2)</sup>. Microsatellite instabilities, *PTEN* mutations or *K-Ras* mutations are observed very rarely in this type of cancer. Taking into account such a complexity of the molecular processes, it will undoubtedly require further intensive molecular and clinical research to establish credible and specific markers enabling an early diagnosis.

#### BIBLIOGRAPHY: PIŚMIENNICTWO:

1. Lax S.F.: Dualistic model of molecular pathogenesis in endometrial carcinoma. *Zentralbl. Gynakol.* 2002; 124: 10-16.
2. Lax S.F.: Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch.* 2004; 444: 213-223.
3. Ali I.U., Schriml L.M., Dean M.: Mutational spectra of *PTEN/MMAC1* gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J. Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 1922-1932.
4. Mutter G.L., Ince T.A., Baak J.P. i wsp.: Molecular identification of latent precancers in histologically normal endometrium. *Cancer Res.* 2001; 61: 4311-4314.
5. Sun H., Enomoto T., Fujita M. i wsp.: Mutational analysis of the *PTEN* gene in endometrial carcinoma and hyperplasia. *Am. J. Clin. Pathol.* 2001; 115: 32-38.
6. Konopka B., Paszko Z., Janiec-Jankowska A., Goluda M.: Assessment of the quality and frequency of mutations occurrence in *PTEN* gene in endometrial carcinomas and hyperplasias. *Cancer Lett.* 2002; 178: 43-51.
7. Gao Q.L., Ye F., Li J. i wsp.: *PTEN* coding product: a marker for tumorigenesis and progression of endometrial carcinoma. *Ai Zheng* 2003; 22: 640-644.
8. Yaginuma Y., Yamashita T., Ishiya T. i wsp.: Abnormal structure and expression of *PTEN/MMAC1* gene in human uterine cancers. *Mol. Carcinog.* 2000; 27: 110-116.
9. Ikeda T., Yoshinaga K., Suzuki A. i wsp.: Anticorresponding mutations of the *KRAS* and *PTEN* genes in human endometrial cancer. *Oncol. Rep.* 2000; 7: 567-570.
10. Esteller M., Garcia A., Martinez-Palones J.M. i wsp.: The clinicopathological significance of *K-RAS* point mutation and gene amplification in endometrial cancer. *Eur. J. Cancer* 1997; 33: 1572-1577.
11. Lagarda H., Catusus L., Arguelles R. i wsp.: *K-ras* mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J. Pathol.* 2001; 193: 193-199.

zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1, co było wynikiem znacznej redukcji poziomu cykliny D3 oraz wzrostu poziomu białka inhibitorowego p21 związane z kinazą cyklinozależną CDK2. Stymulacja komórek *PTEN*-pozytywnych egzogenną cykliną D3 znosiła z kolei hamujący wpływ białka *PTEN*, umożliwiając tym samym wejście komórek w cykl podziały<sup>(20)</sup>.

Poznanie roli genu *PTEN* w procesie powstawania raka *endometrium* było punktem wyjściowym do analiz zależności między ekspresją *PTEN* a rokowaniem klinicznym u chorych ze zdiagnozowanym rakiem *endometrium*. Jak wykazali Minaguchi i wsp., obecność mutacji w egzonach innych niż 5, 6, 7, występująca w skojarzeniu z takimi cechami klinicznymi, jak I/II stopień zaawansowania klinicznego oraz stopień G1 złośliwości histologicznej, wiąże się ze znacząco lepszym rokowaniem klinicznym<sup>(21)</sup>. Do bardzo ciekawych wniosków doprowadziły także prace, które przeprowadzili Kanamori i wsp.<sup>(22)</sup> Analizowali oni zależność między ekspresją *PTEN* a rokowaniem w zaawansowanych rakach *endometrium*. Analizą objęli 98 pacjentek z rozpoznaniem rakiem endometrioidalnym oraz przerzutami do węzłów chłonnych przestrzeni zaotrzewnowej, stwierdzając u 65,3% chorych zaburzenie lub brak ekspresji tego białka. Korelacja uzyskanych wyników z czasem przeżycia wykazała, że w grupie chorych *PTEN*-pozytywnych był on znacząco dłuższy w porów-

## Laserowa terapia i diagnostyka optyczna

Pozwala na pokazanie diagnozy na ekranie monitora z 10x powiększeniem oraz zatrzymanie i zapisanie obrazu w dowolnej chwili.



### Kamera medyczna

Jedno z najnowocześniejszych urządzeń fotonowych do koagulacji. Zabieg jest bezbolesny, bezkrwawy, bezdymowy.



### Koagulator fotonowy

Precyzyjne i nowoczesne narzędzie do wykonania diagnostyki oraz najbardziej złożonych zabiegów chirurgicznych.



### Kolposkop

Szybko i precyzyjnie tnąc, odparowywuje i koaguluje tkankę z minimalną strefą martwicy.



### Laser chirurgiczny CO<sub>2</sub>

naniu z chorymi PTEN-negatywnymi lub wykazującymi heterogenność ekspresji w guzie. Ekspresja *PTEN* nie zależała od wieku pacjentki, stopnia zaawansowania wg FIGO, głębokości naciekania *myometrium* czy stopnia histologicznego zróżnicowania guza. Spośród 98 analizowanych chorych u 87 po leczeniu operacyjnym zastosowano uzupełniającą radio- lub chemioterapię. W grupie chorych poddanych radioterapii nie wykazano korelacji między ekspresją białka PTEN a czasem przeżycia chorych. Innych wyników dostarczyła analiza czasu przeżycia pacjentek poddanych chemioterapii uzupełniającej. W grupie tej czas przeżycia dla chorych PTEN-pozytywnych był zdecydowanie dłuższy niż dla chorych PTEN-negatywnych czy wykazujących heterogenność ekspresji. Jak wykazano w analizie statystycznej wielu zmiennych, ekspresja białka PTEN stanowi więc istotny czynnik prognostyczny mówiący o dłuższym przeżyciu u chorych ze zdiagnozowanymi zaawansowanymi postaciami raka *endometrium*, u których zastosowano uzupełniającą chemioterapię. Obserwacje, których dokonał Kanamori, pozostają w zgodzie z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy<sup>(23)</sup>. Utrata ekspresji *PTEN* może ponadto wskazywać na rozsiew choroby nowotworowej<sup>(24)</sup>.

Możliwość stosowania analizy ekspresji *PTEN* w rutynowej diagnostyce u chorych z rozpoznaniem rakiem *endometrium* podlega jednak pewnym ograniczeniom. Jednym z nich jest obecność pseudogenu *PTEN* aktywnie transkrybowanego tylko w zmienionych nowotworowo tkankach, w tym także zmienionym nowotworowo *endometrium*<sup>(25)</sup>. Analiza jego ekspresji na poziomie białka nie wykazuje obecności produktów białkowych, jednakże obecność pseudogenu *PTEN* może znacznie ograniczyć poprawność wyniku badania ekspresji genu na poziomie mRNA, implikując konieczność niezwykle starannego doboru użytych sond.

Opisane powyżej zaburzenia funkcji genu *PTEN*, stwierdzone z dużą częstością w atypowej hiperplazji *endometrium*, uważane są obecnie za wczesne objawy progresji nowotworów typu I<sup>(1,2)</sup>. W przypadku zaś raków *endometrium* typu II, których przykładem może być rak surowiczy *endometrium*, głównymi zaburzeniami molekularnymi są, powodujące utratę funkcji, mutacje genów *p53* i *p16* oraz amplifikacje genu *her2/neu*<sup>(2)</sup>. Zaburzenia takie jak niestabilności mikrosatelitarne czy mutacje w genach *PTEN* lub *K-Ras* stwierdzone są w tym typie nowotworu niezmiernie rzadko. Wobec tak dużej złożoności procesów molekularnych wyodrębnienie wiarygodnych diagnostycznie, specyficznych markerów umożliwiających wczesne wykrywanie procesu nowotworowego wymagać będzie dalszych intensywnych badań molekularnych i klinicznych.

12. Semczuk A., Berbec H., Kostuch M. i wsp.: K-ras gene point mutations in human endometrial carcinomas: correlation with clinicopathological features and patients' outcome. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1998; 124: 695-700.
13. Hlobilkova A., Knillova J., Bartek J. i wsp.: The mechanism of action of the tumour suppressor gene PTEN. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2003; 147: 19-25.
14. Kanamori Y., Kigawa J., Itamochi H. i wsp.: Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 892-895.
15. Mazurek A., Pierzynski P., Niklinska W. i wsp.: Angiogenesis and Bcl-2 protein expression in patients with endometrial carcinoma. *Neoplasma* 2002; 49: 149-154.
16. Sakuragi N., Ohkouchi T., Hareyama H. i wsp.: Bcl-2 expression and prognosis of patients with endometrial carcinoma. *Int. J. Cancer* 1998; 79: 153-158.
17. Saegusa M., Okayasu I.: Bcl-2 is closely correlated with favorable prognostic factors and inversely associated with p53 protein accumulation in endometrial carcinomas: immunohistochemical and polymerase chain reaction/loss of heterozygosity findings. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1997; 123: 429-434.
18. St-Germain M.E., Gagnon V., Mathieu I. i wsp.: Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2004; 24: 1311-1324.
19. St-Germain M.E., Gagnon V., Parent S., Asselin E.: Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Mol. Cancer* 2004; 3: 7.
20. Zhu X., Kwon C.H., Schlosshauer P.W. i wsp.: PTEN induces G(1) cell cycle arrest and decreases cyclin D3 levels in endometrial carcinoma cells. *Cancer Res.* 2001; 61: 4569-4575.
21. Minaguchi T., Yoshikawa H., Oda K. i wsp.: PTEN mutation located only outside exons 5, 6, and 7 is an independent predictor of favorable survival in endometrial carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 2636-2642.
22. Kanamori Y., Kigawa J., Itamochi H. i wsp.: PTEN expression is associated with prognosis for patients with advanced endometrial carcinoma undergoing postoperative chemotherapy. *Int. J. Cancer* 2002; 100: 686-689.
23. Terakawa N., Kanamori Y., Yoshida S.: Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 2003; 10: 203-208.
24. Salvesen H.B., Stefansson I., Kalvenes M.B. i wsp.: Loss of PTEN expression is associated with metastatic disease in patients with endometrial carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 2185-2191.
25. Yokoyama Y., Wan X., Shinohara A. i wsp.: Expression of PTEN and PTEN pseudogene in endometrial carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* 2000; 6: 47-50.