



DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

El carcinoma endometrial és la tercera neoplàsia més freqüent en la dona en els països desenvolupats i la primera del tracte genital femení. Al llarg dels darrers anys s'ha realitzat un destacat avenç en el coneixement de l'etiologia, la millora del diagnòstic i del pronòstic d'aquesta patologia. Tanmateix, també s'ha fet més evident la necessitat d'aprofundir en els aspectes genètics i moleculars associats a la transformació i progressió neoplàsica d'aquest teixit, els quals es podrien equiparar als fonaments sobre els quals se sustenta la patologia neoplàsica.

Per aquest motiu el nostre grup s'ha interessat, des de fa anys, en el coneixement del complex entramat molecular que regeix la neoplàsia endometrial, motiu pel qual l'estratègia plantejada en l'equip de recerca ha estat l'estudi dels patrons d'expressió gènica diferencial entre el teixit endometrial sa, hiperplàsic i tumoral, així com la cerca de nous gens associats al fenotip carcinomatos endometrial amb potencial valor diagnòstic i/o pronòstic. Amb aquest propòsit s'ha obtingut un perfil d'expressió gènica diferencial entre mostres de fenotip normal i fenotip tumoral a partir de la tècnica d'hibridació de filtres de cDNA (*microarrays* de cDNA). El treball d'aquesta tesi s'ha centrat en l'estudi de dos dels gens identificats per aquest mètode, *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM*. Dos gens que es troben sobreexpressats en l'adenocarcinoma endometrial endometriode, concretament en la fase en la qual el carcinoma esdevé invasiu.

21. Anàlisi dels perfils d'expressió gènica diferencial obtinguts per *microarrays* de cDNA en l'EEC

L'endometri és un teixit que es troba en constant remodelació. Al llarg de la vida fèrtil l'endometri pateix un canvi permanent a causa de les variacions dels nivells hormonals

d'estrògens i progesterona que ocorren fisiològicament en la dona. És conegut que el nivell d'esteroides ovàrics, així com dels seus receptors, poden influir sobre l'expressió gènica en l'endometri; no obstant això, l'aparició del carcinoma endometrial s'origina principalment després de la menopausa. El carcinoma endometrial és el resultat de la transformació neoplàsica de les cèl·lules epitelials glàndulars, les quals segueixen un patró de successos que condueixen el teixit normal, passant per la hiperplàsia simple i complexa, fins al teixit pròpiament tumoral. Anàlisis prèvies utilitzant la tecnologia dels *microarrays* de cDNA s'havien en la caracterització de l'expressió gènica entre diferents histiotips de carcinoma endometrial ⁽²⁴⁹⁾, però mai s'havien estudiat els perfils d'expressió gènica en l'endometri atròfic "normal", en la hiperplàsia simple, la hiperplàsia complexa i el carcinoma alhora. Com ja ha estat anteriorment comentat, els esdeveniments moleculars que estableixen l'aparició i el desenvolupament del carcinoma endometrial resten encara per aclarir. Per trobar nous gens candidats a ser marcadors moleculars així com perfils gènics característics de la patologia endometrial s'ha utilitzat la tecnologia dels *microarrays* de cDNA. Els *microarrays* (*LifeGridTM*) contenen 8345 sondes de cDNA, principalment de gens coneguts, que equivalen a un 33% del repertori transcripcional humà ⁽²⁵⁷⁾. Les comparacions dels nivells d'expressió es van realitzar hibridant cDNAs de quatre mostres tumorals de carcinoma endometrioides i dues mostres d'endometri sa. Les dues mostres d'endometri sa corresponien a un conjunt de mostres d'endometri atròfic (n=16) i a un altre conjunt de mostres d'endometri normal proliferatiu de dones en edat fèrtil (n=4). Aquestes dues mostres controls es van dissenyar, per una banda, per tenir una mitjana de l'expressió de gens en condicions normals, i per una altra per incrementar el volum de mostra atròfica, atès que aquest teixit és escàs ja que està constituït per un epiteli monocapa; així doncs, es podia disposar de suficient cDNA per fer la hibridació dels filtres. A més, es va tenir en compte el fet de diferenciar dos tipus de mostres normals, l'endometri atròfic i l'endometri proliferatiu. L'endometri atròfic, per les seves característiques, de ser el teixit majoritari en la dona postmenopàusica, es va constituir com a l'estat basal d'expressió dels gens en condicions normals. Per tant s'ha establert la sobreexpressió o infraexpressió de les seqüències aïllades en funció de l'estat d'expressió gènica d'aquest teixit. L'endometri, en l'etapa fèrtil, presenta una renovació constant, per tant el fet d'incloure mostra endometrial normal en fase proliferativa ens ha permès discriminar falsos positius, és a dir tots aquells gens que s'expressen pel sol fet d'estar implicats en el procés normal de proliferació endometrial. A més totes les mostres d'aquest grup es trobaven al

mateix dia del cicle menstrual; d'aquesta manera també es van descartar diferències d'expressió gènica degudes al component hormonal. Nogensmenys, el fet d'eliminar els gens expressats en l'endometri proliferatiu ens ha impedit detectar qualsevol d'aquests, que, a més de participar en la proliferació fisiològica, ho faci també en el creixement tumoral. De les mostres híbrides, a part dels dos controls d'endometri normal, es van incloure 4 mostres tumorals; 3 d'estadi baix IA i una d'estadi més avançat IIB, per tal de veure l'expressió gènica en diferents etapes de l'evolució tumoral (Taula 12). Un cop establerts els diferents criteris que ens permetien aproximar-nos de manera objectiva als gens alterats degut a l'estat tumoral es van realitzar les diferents comparacions entre les mostres normals i tumorals. Es van seleccionar tots aquells gens que es trobaven 1,25 vegades per sobre o 0,75 vegades per sota els nivells d'expressió basals, que és el nivell d'expressió diferencial amb significació estadística acceptat ⁽²⁵²⁻²⁵⁵⁾. Així, es van obtenir 53 seqüències de cDNA que es trobaven significativament alterades en les mostres tumorals, que corresponien al 0,635% del total de seqüències del filtre (Fig. 41, Taula 16). Aquest gens es poden classificar en 7 categories funcionals en funció del nombre de gens de cada categoria: **1)** metabolisme cel·lular (24%), **2)** senyalització cel·lular (21%), **3)** regulació de la transcripció (21%), **4)** regulació del cicle cel·lular i proliferació (11%), **5)** receptors de membrana (9%), **6)** resposta immunològica (8%), **7)** trànsit cel·lular (6%). Com era d'esperar, les diferents categories establertes responen a funcions essencials de la cèl·lula, les quals es troben alterades quan la cèl·lula esdevé tumoral. On s'han trobat més gens alterats ha estat en les categories de regulació del metabolisme, senyalització intracel·lular, transcripció i proliferació cel·lular (Fig. 43). Per tant aquests resultats semblen coherents amb els criteris que es van establir per portar a terme els experiments d'hibridació.

Per poder avaluar l'informació generada es va realitzar una anàlisi d'agrupament o de *clustering* (ordenament jeràrquic dels gens en funció de les semblances quant als nivells d'expressió, (Fig. 41). D'aquesta manera vam poder seleccionar els gens que ens van semblar més interessants per dur a terme l'estudi. L'anàlisi d'agrupament genera dos tipus de distribucions: una segons la semblança entre les diferents mostres, en funció dels perfils d'expressió gènica que presenten, i una altra segons les semblances del nivell d'expressió de cadascun dels gens. La distribució en arbre de les mostres va presentar tres branques ben diferenciades (Fig. 42b). A la primera (color taronja), s'hi trobava la mostra d'endometri normal proliferatiu, mostra utilitzada per calibrar els possibles falsos positius. La segona branca (color blau) corresponia a

les mostres de carcinoma endometrial d'estadi baix IA, és a dir mostres amb carcinogènesi inicial que només s'estenen al teixit endometrial. I finalment la tercera branca (color negre), la qual comprenia la mostra d'estadi alt IIB, en què el tumor s'estén fins a l'estroma endocervical. Una de les crítiques que se solen fer als *microarrays* de cDNA és la variabilitat que hi ha entre les diferents hibridacions. Aquest problema s'intenta solventar incorporant un conjunt de controls interns al filtre que garanteixen la correcta hibridació; tanmateix aquesta variació existeix i a més, també s'ha de tenir en compte la variació intraespecífica (no totes les mostres d'un mateix tipus es comporten igual). Tenint en compte aquestes limitacions, l'anàlisi bioinformàtica de *clustering* a partir de les variacions entre mostres amb significació estadística, va agrupar cadascuna de les mostres pel seu histiotip respectiu. Aquests resultats, per una banda es van utilitzar com a control de qualitat per validar la reproduïbilitat de les hibridacions, i per l'altra banda per suggerir que el perfil d'expressió gènica de cada histiotip podria mostrar l'evolució de la tumorigènesi, així com l'estadi tumoral en el càncer d'endometri.

La segona distribució que va generar l'anàlisi de *clustering* jeràrquic, segons les semblances del nivell d'expressió de cadascun dels gens, també va presentar tres branques majoritàries (Fig. 42c). A la primera branca (color verd) hi havien aquells gens que s'infraexpressaven en relació amb l'endometri atròfic. La segona branca (color vermell) representava aquells gens que es sobreexpressaven en relació amb l'endometri atròfic. La tercera branca (color negre) incloïa aquells gens que presentaven una expressió variable entre les diferents mostres, fet que reflexa la variabilitat intraespecífica que anteriorment es comentava. La distribució jeràrquica per gens resultant presenta una certa complexitat. Per facilitar la visualització d'aquest tipus de distribució s'han diferenciat diversos grups de gens. Cal destacar dos subgrups a cadascun dels extrems: els gens que s'infraexpressaven en tots els histiotips (1-7. Fig. 41, Taula 16) i els gens que es sobreexpressaven en tots els histiotips (51-53. Fig. 41, Taula 16). Aquests dos grups de gens ens van resultar molt interessants per dues raons: en primer lloc perquè eren els gens amb el nivell d'expressió més alterat de tota l'anàlisi i en segon lloc, pel fet que l'alteració, tant sobreexpressió com infraexpressió, es trobava en totes les mostres tumorals i no en les normals, la qual cosa suggereix un possible paper d'aquests dos grups de gens en la tumorigènesi endometrial.

Un altre subgrup de gens que es trobava representat en la distribució jeràrquica contenia els gens que presenten una expressió diferencial entre mostres d'histiotip baix IA, mostres

d'histiòtip alt IIB i la mostra control atròfica. Són els gens que s'infraexpressaven en les mostres d'histiòtip baix (8-29. Fig. 41, Taula 16) i els gens que se sobreexpressaven en les mostres d'histiòtip més alt (37-50. Fig. 41, Taula 16). També cal destacar aquest conjunt d'alteracions, perquè els resultats fan pensar que aquests gens podrien estar implicats en la progressió tumoral, l'evolució del tumor i possiblement en el desenvolupament metastàtic. A partir d'aquest ampli conjunt de dades ens vàrem plantejar començar a estudiar els gens que estiguessin englobats en algun d'aquests grups amb major significació patològica.

L'estudi comportava la confirmació de l'expressió diferencial d'RNA per una tècnica més sensible, en aquest cas la PCR a temps real, així com la caracterització de l'expressió a nivell de proteïna per *western blot* i immunohistoquímica. El treball també comportava l'estudi de l'evolució de l'expressió al llarg de l'establiment del procés tumorigènic. Aquest estudi es va realitzar a partir de la construcció de *microarrays* de teixit partint del teixit normal atròfic, passant pel teixit preneoplàsic (hiperplàsia simple i hiperplàsia complexa), fins arribar al teixit tumoral endometrial. Finalment també ens vàrem plantejar la caracterització funcional i la significació patològica de l'expressió gènica diferencial. Es va decidir començar a treballar pels dos gens que van aparèixer més alterats en l'anàlisi de *microarrays* de cDNA. El gen *RUNX1/AML1* i el gen *ETV5/ERM*, que pertanyien al grup de gens amb sobreexpressió en totes les mostres tumorals respecte del nivell d'expressió basal, grup possiblement relacionat amb la tumorigènesi endometrial. A més, eren gens que presentaven antecedents d'estar relacionats amb alteracions oncològiques. A continuació es descriu en detall cadascun d'aquests gens, així com els antecedents bibliogràfics i les raons que ens van portar a llur elecció.

22. *RUNX1/AML1* gen sobreexpressat en l'EEC

22.1. El gen *RUNX1/AML1*

El gen *RUNX1* (de l'anglès *Runt-related transcription factor 1*), també anomenat *AML1* (*acute myeloid leukaemia 1*), *PEBP2 α B* (*B alpha subunit of polyomavirus enhancer-binding protein 2*) o *CBF α 2* (*core binding factor alpha*)⁽²⁵⁸⁾, pertany a la família de factors de transcripció caracteritzats per presentar el domini Runt, responsable tant de la unió al DNA com de l'heterodimerització amb el factor de transcripció *PEBP2 β /CBF β* ^(259, 260). La família de factors de transcripció amb domini Runt està representada per tres membres, el gens *RUNX1/AML1*, *RUNX2* i *RUNX3*.

22.3. Localització i funció del gen *RUNX1/AML1*

El gen *RUNX1/AML1* ⁽²⁵⁸⁾, es troba localitzat al braç llarg del cromosoma 21 ⁽²⁶⁹⁾ concretament a la posició 22.3 ⁽²⁷⁰⁾. *RUNX1/AML1* codifica la subunitat alfa de la proteïna PEBP, que es combina amb la subunitat beta per formar el factor de transcripció heterodimèric PEBP o CBF que és funcionalment actiu. La funció de *RUNX1/AML1* com a factor de transcripció difereix depenent de la seva interacció amb altres cofactors. Per una banda *RUNX1/AML1* actua com a activador transcripcional de gens relacionats amb l'hematopoesi a través de la interacció amb el coactivador histona acetiltransferasa p300/CBP ⁽²⁷¹⁾. Però per una altra part, pot comportar-se com a repressor transcripcional mitjançant la interacció amb un corepressor ⁽²⁷²⁾. El gen *RUNX1/AML1* juga un rol important en l'hematopoesi, i la seva desregulació funcional comporta la desregulació de la proliferació i la diferenciació cel·lulars. Per aquest motiu la seva alteració està fortament associada a la leucèmia mieloide ⁽²⁵⁶⁾. A més, també s'ha demostrat que *RUNX1/AML1* pot regular l'aparició de cèl·lules mare hematopoètiques a partir de les cèl·lules hematogèniques endotelials ⁽²⁷³⁾.

22.4. Alteracions de *RUNX1/AML1* i càncer

Una de les alteracions més freqüentment descrites en aquest gen és la que el situa com a diana de translocació associada a la leucèmia humana ^(270, 274, 275). Entre les més comunes es troben: *AML1-ETO* a t[8;21], *CBFβ-SMMHC* a inv[16], *AML1-Evi1* a t[3;21], i *TEL-AML1* a t[12;21] ^(276, 277). En molts casos els gens quimèrics generats a partir de les translocacions cromosòmiques en el locus de *RUNX1/AML1* inhibeixen la pròpia funció del gen. Tanmateix en altres casos apareix un guany de funció. En general l'absència o la reducció de la funció de *RUNX1/AML1* bloqueja la diferenciació granulocítica, que normalment va acompanyada de proliferació cel·lular. Contràriament, però, altres estudis recents han mostrat que l'alteració de *RUNX1/AML1* regula el cicle de manera negativa. Si els gens quimèrics de *RUNX1/AML1* que inactiven la funció de *RUNX1/AML1* poden causar leucèmia, llavors la pèrdua de funció per mutació de *RUNX1/AML1* també pot causar leucèmia. Recentment s'han identificat i descrit moltes mutacions puntuals del gen *RUNX1/AML1* en diversos tipus de leucèmies, cosa que suggereix que la incidència de les mutacions puntuals sobre *RUNX1/AML1* és comparable a les translocacions cromosòmiques clàssiques que pateix el gen ⁽²⁷⁸⁾. Una de les conseqüències de la mutació en el domini Runt és la pèrdua de la capacitat d'unió al DNA, amb la consegüent pèrdua de funció de la proteïna ⁽²⁷⁹⁾. A més de la pèrdua de funció per translocació o mutació,

el guany de funció del gen ha estat recentment relacionat amb possibles efectes en la gènesi de la leucèmia. S'ha descrit l'amplificació del gen en la leucèmia d'una fins a tretze còpies ⁽²⁸⁰⁻²⁸⁴⁾. Un clar exemple de l'amplificació del gen *RUNX1/AML1* és dona en persones afectades per la Síndrome de Down o trisomia del cromosoma 21, cromosoma on es troba el gen *RUNX1/AML1*. S'ha descrit que certs tipus de leucèmies es diagnostiquen fins a 10 vegades més en nens que presenten aquesta síndrome ^(285, 286). Sembla, a més, que les alteracions en la dosi gènica de *RUNX1/AML1* en aquests pacients predisposaria a patir alteracions en el desenvolupament dels megacariòcits, cèl·lules precursors de les plaquetes ⁽²⁸⁷⁾.

La primera prova obtinguda que el gen *RUNX1/AML1* intacte podia tenir un potencial oncogènic intrínsec va sorgir dels experiment de transfecció en fibroblasts 3T3, en què es va descriure que el gen *RUNX1/AML1* ectòpic induïa transformació morfològica i conversió tumorigènica, un procés que requeria el domini Runt d'unió al DNA funcional i intacte ^(288, 289). A més altres estudis mostren que aquest efecte estaria relacionat amb la part N terminal de la proteïna, en concret, la de la isoforma majoritària AML1b ⁽²⁹⁰⁾. Altres propietats que confereixen un paper de dominant oncogènic potencial al gen *RUNX1/AML1* inclouen l'acceleració de la progressió de la fase S en les cèl·lules mieloides 32Dcl3 ⁽²⁹¹⁾ a part de l'habilitat de rescatar la proliferació de les cèl·lules mieloides 32Dcl3 i limfoides Ba/F3 que presenten expressió d'inhibidors dominants negatius ⁽²⁹²⁻²⁹⁴⁾. D'altra banda un estudi recent de desenvolupament en què s'utilitza com a model la garota de mar (*Paracentrotus lividus*) revela una forta correlació entre l'expressió de l'homòleg de *RUNX1/AML1* (*SpRunt*) i els teixits proliferants, i sembla que aquest és necessari per a la divisió cel·lular durant l'embriogènesi ⁽²⁹⁵⁾. Un dels últims resultats publicats pel que fa al nivell d'expressió de *RUNX1/AML1* en línies cel·lulars mieloides i limfoides descriu un augment del nivell proteic de *RUNX1/AML1* en la transició G1-S a causa de l'estabilització de la proteïna. A més, aquest augment indueix l'expressió del gen de la ciclina D3, també implicada en la transició G1-S ⁽²⁹⁶⁾. Per tant una desregulació d'aquest mecanisme que impliqui un augment de la proteïna estable, ja sigui per mutació o per sobreexpressió gènica, i per tant un balanceig a favor de la transició G1-S, i consegüentment de la progressió tumoral, estaria potencialment relacionada amb la transformació neoplàsica. Finalment, el grup de Ramaswamy i Golub van caracteritzar el gen *RUNX1/AML1* com un dels 17 gens que determinen una signatura molecular predictiva de metastasi en adenocarcinoma de diferents orígens, entre els que hi ha inclosos els càncers ginecològics d'úter, mama i ovari ⁽²⁹⁷⁾.

El nostre estudi per tant ha aportat el coneixement, per primera vegada, d'una nova alteració en el carcinoma endometrial endometriode, en concret la sobreexpressió del gen *RUNX1/AML1* ⁽¹³⁸⁾. Així doncs, es va decidir continuar l'estudi amb aquest gen no només per ser un gen amb un potencial paper oncogènic en el càncer d'endometri, sinó també per aportar nous coneixements a les bases moleculars del carcinoma endometrial.

23. *ETV5/ERM*, gen sobreexpressat en l'EEC

23.1. El gen *ETV5/ERM*

El gen *ETV5* (de l'anglès, *ETS translocation variant 5*), també anomenat *ERM* (*ETS-related molecule*) o (*ETS variant gene 5*), pertany a la família proteica de factors de transcripció caracteritzats per presentar el domini ETS. En concret *ETV5/ERM* pertany a la subfamília PEA3 de factors de transcripció ETS. ETS és un domini conservat d'aproximadament 85 aminoàcids responsable de la unió al DNA. El domini *ETS* s'uneix al DNA i reconeix el motiu central A/GGAA/T per regular en cooperació amb altres factors de transcripció i cofactors l'expressió d'un conjunt de gens ⁽²⁹⁸⁾. La subfamília de factors de transcripció PEA3 relacionats amb el domini ETS està composta per tres membres coneguts: els gens *PEA3 (ETV4)* ^(299, 300), *ERM(ETV5)* ⁽³⁰¹⁾ i *ER81(ETV1)* ⁽³⁰²⁻³⁰⁴⁾. Les diferents subfamílies de factors de transcripció relacionats amb el domini ETS s'agrupen en funció de la semblança del seu domini ETS. En el cas de la subfamília PEA3 tenen una semblança de més del 95% en el domini ETS i més d'un 85% en el domini d'activació ⁽³⁰⁵⁾.

23.2. Estructura genòmica d'*ETV5/ERM*

El gen humà consta de 14 exons distribuïts al llarg de 65 kb de DNA genòmic. Estudiant les parts del gen es poden diferenciar dos dominis funcionals principals, el domini acídic o de transactivació i el domini ETS o d'unió al DNA. Aquests dos dominis es troben, cadascun, codificats per tres exons diferents. La regió 3' no traduïda d'*ETV5/ERM* consta de 2.1 kb, mentre que la regió 5' consta de 0.3 kb; això permet que la transcripció d'*ETV5/ERM* generi un transcrit de 4 kb. Per llurs característiques, aquests tres gens provenen d'un gen ancestral comú, ja que la semblança entre els tres gens és de més del 95%; tots tres codifiquen per un domini N-terminal d'activació transcripcional de 72 residus i un domini, més situat cap a la regió C terminal, d'unió al DNA, el domini ETS, de 85 residus ⁽³⁰⁶⁾. El gen que es va

identificar a partir de la hibridació dels *microarrays* de cDNA com a més sobreexpressat en carcinoma endometrial respecte a les mostres normals corresponia al membre *ETV5/ERM* de la família de *PEA3* ⁽¹³⁸⁾.

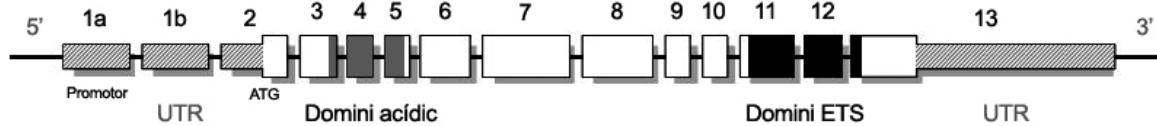
Gen *ETV5/ERM*

Figura 65, esquema del gen *ETV5/ERM* ⁽³⁰²⁾: esquema on es mostra l'estructura del gen *ETV5/ERM*. Les caixes representen els 13 exons del gen. En negre es mostra el domini ETS, de l'exó 11 al 13, també es destaca el domini àcidic. En gris es mostren les regions no traduïdes (UTR).

23.3. Localització i funció del gen *ETV5/ERM*

El gen *ETV5/ERM* humà es troba localitzat a la regió 28 del braç llarg del cromosoma 3 ⁽³⁰⁷⁾. *ETV5/ERM* codifica el factor de transcripció *ETV5/ERM*, una característica del qual és la presència del domini ETS ⁽³⁰⁸⁾. El factor de transcripció *ETV5/ERM* es troba implicat en processos de desenvolupament, però el seu rol específic al llarg d'aquest procés no està clar. Estudis recents han descrit una forta expressió d' *ETV5/ERM* a les cèl·lules pluripotents de la cresta neural. S'han descrit aspectes de la funció d'*ETV5/ERM* en el desenvolupament de la cresta neural a partir d'experiments d'interferència d'RNA. Si es bloqueja l'expressió del gen *ETV5/ERM* s'observa una dràstica disminució de la taxa de proliferació de les cèl·lules de la glia, cosa que suggereix que *ETV5/ERM* té un paper específic en el control de la progressió del cicle cel·lular en les cèl·lules de la glia. Així doncs, en contrast amb altres membres de la subfamília *PEA3* que es troben implicats en processos finals de la neurogenèsi, *ETV5/ERM* sembla que es requereix en etapes inicials del desenvolupament de la cresta neural. A més, les dades senyalen papers d'*ETV5/ERM* específics de les cèl·lules mare de la cresta neural i les seves derivades, cosa que indica que la funció d'*ETV5/ERM* depèn del context extrínsec i intrínsec de la cèl·lula ⁽³⁰⁹⁾.

23.4. Alteracions d'ETV5/ERM i càncer

ETV5/ERM, a part de jugar un rol en processos de desenvolupament, també ha estat relacionat amb l'oncogènesi degut a fenòmens de sobreexpressió, mutació o translocació. Hi ha constància de la relació entre la subfamília PEA3 i l'oncogènesi mamària. S'ha observat sobreexpressió d'aquest gen en diversos tumors mamaris, així com en tumors mamaris induïts ^(305, 310, 311). Experiments de cotransfecció dels membres de PEA3, conjuntament amb vectors que contenen elements de resposta a ETS en línies cel·lulars de carcinoma mamari suggereixen que les proteïnes de la subfamília PEA3, potser per interacció amb altres factors de transcripció com el c-jun ⁽³¹²⁾, són factors de transcripció altament actius a les línies cel·lulars de carcinoma mamari ⁽³⁰⁵⁾. També han estat descrits altres promotors de gens implicats en el carcinoma mamari que contenen elements actius de resposta a ETS. Aquests estudis han mostrat que el promotor de l'oncogèn *c-erbB2/neu* conté un lloc d'unió a ETS actiu a línies cel·lulars de carcinoma mamari i també la presència d'una proteïna ETS de 60 kDa amb interacció al lloc d'unió ETS ⁽³¹³⁾. Més endavant es va veure que aquesta proteïna corresponia a *ETV5/ERM* ⁽³⁰⁵⁾. Un altre aspecte interessant és la presència d'elements d'unió a membres de la família ETS en tots els promotors induïbles de metal·loproteases de matriu MMPs ⁽³¹⁴⁾. A més, hom ha descrit un paper del membre ETS-1 com a regulador de l'expressió de les proteases MMP-1, MMP-3 MMP-9, del plasminogen tipus uroquinasa (uPA), així com del factor de creixement vascular endotelial (VEGF) i del seu receptor, fet que el relaciona amb l'angiogènesi, la migració cel·lular i la invasió tumoral associada a l'increment de l'activitat proteolítica de les cèl·lules tumorals invasores ⁽³¹⁵⁾. L'expressió d'un membre de la família PEA3: *ETV4* ha estat correlacionada amb la sobreexpressió d'MMP-1 i la progressió del càncer colorectal ⁽³¹⁶⁾. Finalment, membres de la família ETS han estat relacionats amb la malignitat en el carcinoma endometrial. En concret, la sobreexpressió del gen *Elf-1* es relaciona amb el potencial maligne del carcinoma endometrial ^(317, 318).

Aquest estudi a permès descriure una altra alteració no descrita abans en el carcinoma endometrial endometriode, la sobreexpressió del gen *ETV5/ERM* ⁽¹³⁷⁾. A més, els resultats de l'estudi d'hibridació dels *microarrays* de cDNA el situaven com al gen amb major sobreexpressió en condicions tumorals ⁽¹³⁸⁾. Per tant, es va decidir continuar l'estudi de caracterització de l'expressió gènica diferencial en la patologia endometrial endometriode tenint en compte les alteracions dels gens *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM*.

24. Anàlisi del nivell d'expressió gènica de *RUNX1/AML1* i d'*ETV5/ERM* per PCR a temps real en l'EEC

Per validar la sobreexpressió tant de *RUNX1/AML1* com d'*ETV5/ERM*, es van valorar els nivells d'expressió d'ambdós gens per PCR a temps real en un panell ample de 30 mostres d'EEC. Aquest panell estava representat per mostres agrupades per diferents estadis. Els grups contenien des de l'estadi menys invasiu IA fins a l'estadi metastàtic IIIA (Taula 10). Aquest assaig ens va permetre no només validar la sobreexpressió dels dos gens, sinó també caracteritzar la distribució dels nivells d'expressió gènica depenent de l'estadi tumoral del carcinoma endometrial. L'expressió de *RUNX1/AML1* i d'*ETV5/ERM* es va normalitzar utilitzant dos controls: teixit endometrial atròfic (EA) (estat postmenopàusic) i teixit endometrial en cicle (ENP) (estat premenopàusic) (vegeu *M i M*). Així doncs, vàrem poder veure els nivells d'expressió gènica de les mostres tumorals en dues circumstàncies diferents. D'una banda utilitzant un control de calibració premenopàusic, que presenta un entorn hormonal actiu i el teixit endometrial es troba en proliferació ENP, i d'altra banda fent servir un segon control de calibració postmenopàusic, que no presenta entorn hormonal actiu i el teixit és atròfic EA. El fet d'utilitzar aquests dos controls és una estratègia per veure la influència dels estats proliferatiu i hormonal sobre els perfils d'expressió gènica. A partir de l'anàlisi bioinformàtica realitzada sobre els resultats dels *microarrays* de cDNA es va poder descartar la influència tant de l'estat proliferatiu com de l'entorn hormonal. Per tant l'anàlisi de la PCR a temps real ens ha permès comprovar que la sobreexpressió dels gens *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM* no està influenciada ni per l'estat proliferatiu ni per l'estat hormonal, ja que els perfils d'expressió, obtinguts de la calibració amb el control atròfic i el control proliferatiu, han resultat ser molt semblants en totes les mostres (Fig. 45a i 45b, Fig. 47a i 47b).

24.1. Expressió del gen *RUNX1/AML1*

Com es pot observar en el perfil d'expressió gènica de *RUNX1/AML1* en normalitzar els nivells d'expressió de *RUNX1/AML1* amb les mostres calibradores EA (Fig. 45a) i ENP (Fig. 45b) va resultar trobar-se clarament sobreexpressat en l'EEC. A més, l'estudi es va acompanyar d'una rigorosa anàlisi estadística del conjunt de dades de les diferents poblacions que van dotar de significació estadística ($p=0.001$) la sobreexpressió de *RUNX1/AML1* (Fig. 46). Estudiant tot el conjunt de població de mostres es va fer evident que el màxim nivell d'expressió corresponia a

l'estadi histopatològic de la F.I.G.O. IC, estadi definit per extendres al teixit contigu. L'estadi IC comprèn els tumors que presenten un nivell d'infiltració al miometri superior al 50%. IC es considera el primer estadi amb una important difusió del carcinoma fora del teixit endometrial. Estudiant l'expressió de *RUNX1/AML1* en estadis inicials de la carcinogènesi endometrial es va obtenir sobreexpressió amb significació estadística ($p=0.002$) en els estadis IA, on el tumor no és infiltrant i en els estadis IB on la infiltració miometrial representa menys d'un 50%. En estadis més avançats de la carcinogènesi endometrial (estadis II i III), es va obtenir una sobreexpressió de *RUNX1/AML1* tot i que a un nivell menor ($p=0.001$). Observant el perfil d'expressió gènica al llarg dels estadis es va observar que l'expressió de *RUNX1/AML* s'acostava a un model de distribució normal, en forma de campana, amb un augment progressiu de l'expressió als estadis baixos IA i IB, un màxim d'expressió a l'estadi IC i un descens de l'expressió als estadis II i III. Aquest perfil, que presenta una correlació significativa entre l'augment d'expressió i el nivell d'infiltració del miometri ($p=0,001$), ha permès especular sobre el fet que el gen *RUNX1/AML1* podria estar implicat en processos d'invasió miometrial i per tant, a part de tenir un paper destacat en la patologia endometrial, podria esdevenir un marcador de progressió tumoral. Les actuals investigacions del grup estan dirigides en aquest sentit.

24.2. Expressió del gen *ETV5/ERM*

Els resultats obtinguts per PCR a temps real, d'una banda van confirmar les diferències d'expressió entre les mostres control i les mostres tumorals (Fig. 47a i 47b), i per l'altra varen mostrar que *ETV5/ERM* es troba sobreexpressat en els estadis inicials de la carcinogènesi endometrial, especialment en l'EEC, i en concret en l'estadi histològic IC, en el qual el tumor es troba confinat al cos uterí i presenta una infiltració miometrial de més del 50% (Fig. 48). El perfil d'expressió d'*ETV5/ERM* seguia una distribució semblant a la de *RUNX1/AML1*, però es diferenciava en què l'expressió baixava a nivells basals al llarg de la progressió tumoral. En realitzar la normalització dels nivells d'expressió, en funció tant del teixit atrofíic com del teixit proliferatiu, es van obtenir perfils similars. Per tant aquests resultats constaten el fet que l'augment d'expressió de les mostres tumorals no depèn de l'estat proliferatiu o de l'entorn hormonal sinó que, com passava amb el gen *RUNX1/AML1*, depèn de factors intrínsecs al tumor. Realitzant la correlació entre els perfils d'expressió d'*ETV5/ERM* i *RUNX1/AML1* al llarg dels estadis histològics es va obtenir una correlació significativa tant pel test de la *Rho*

d'Spearman com pel test de Wilcoxon per dades aparellades. Per tant aquests resultats van permetre especular sobre el fet que *ETV5/ERM* pogués tenir un paper destacat en el procés d'invasió miometrial, degut al fet d'estar sobreexpressat en l'estadi on es dona la invasió miometrial a un nivell més alt IC, i en segon lloc per ser un gen descrit com a activador de diverses proteases⁽³¹⁴⁻³¹⁶⁾. Els resultats també suggerien que *ETV5/ERM* podria estar actuant conjuntament amb *RUNX1/AML1* per dur a terme aquest procés. Finalment, el fet que en estadis més avançats decaigui l'expressió d'*ETV5/ERM* podria tenir sentit, perquè en aquest punt de la carcinogènesi ja s'ha dut a terme el procés d'invasió i sortida del tumor de la cavitat uterina i es limita a estendre's per altres teixits, per tant decau l'expressió de moltes proteases així com la dels factors i cofactors que les activen.

25. Estudi proteic de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM en l'EEC

25.1. Anàlisi de l'estructura proteica de RUNX1/AML1

A nivell proteic, el factor de transcripció RUNX1/AML1 presenta dos dominis principals: el domini d'unió al DNA o Runt i el domini de transactivació, situats als extrems N terminal i C terminal respectivament^(263, 319). El domini d'unió al DNA Runt permet seguir la filogènia d'aquest grup de proteïnes, ja que les proteïnes d'aquesta família es classifiquen en funció de Runt, un domini que està molt conservat. El domini Runt és d'una importància crucial, ja que no tan sols permet la unió al DNA sinó que també permet l'heterodimerització amb el factor de transcripció PEBP2 β /CBF β per poder portar a terme la seva funció. La cristal·lització i resolució de l'estructura tridimensional de RUNX1/AML1 va ser realitzada pel grup de Tang i col·laboradors l'any 1999⁽³²⁰⁾ i posteriorment se'n va refinar l'estructura tridimensional⁽³²¹⁾. Aquests estudis han permès descriure que el domini Runt està format per dues làmines beta antiparal·leles enfrontades. Els estudis de visualització molecular utilitzant el programa de renderització bioinformàtica i visualització molecular *Protein Explorer 7.0*[©] desenvolupat per Eric Martz (<http://www.proteinexplorer.org>), i utilitzant les dades públiques de cristal·lització de RUNX1/AML1 (NCBI, *3D Domains*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ens han permès visualitzar la unió del complex RUNX1/AML1-PEBP2 β /CBF β al DNA (Fig. 66a i 66b).

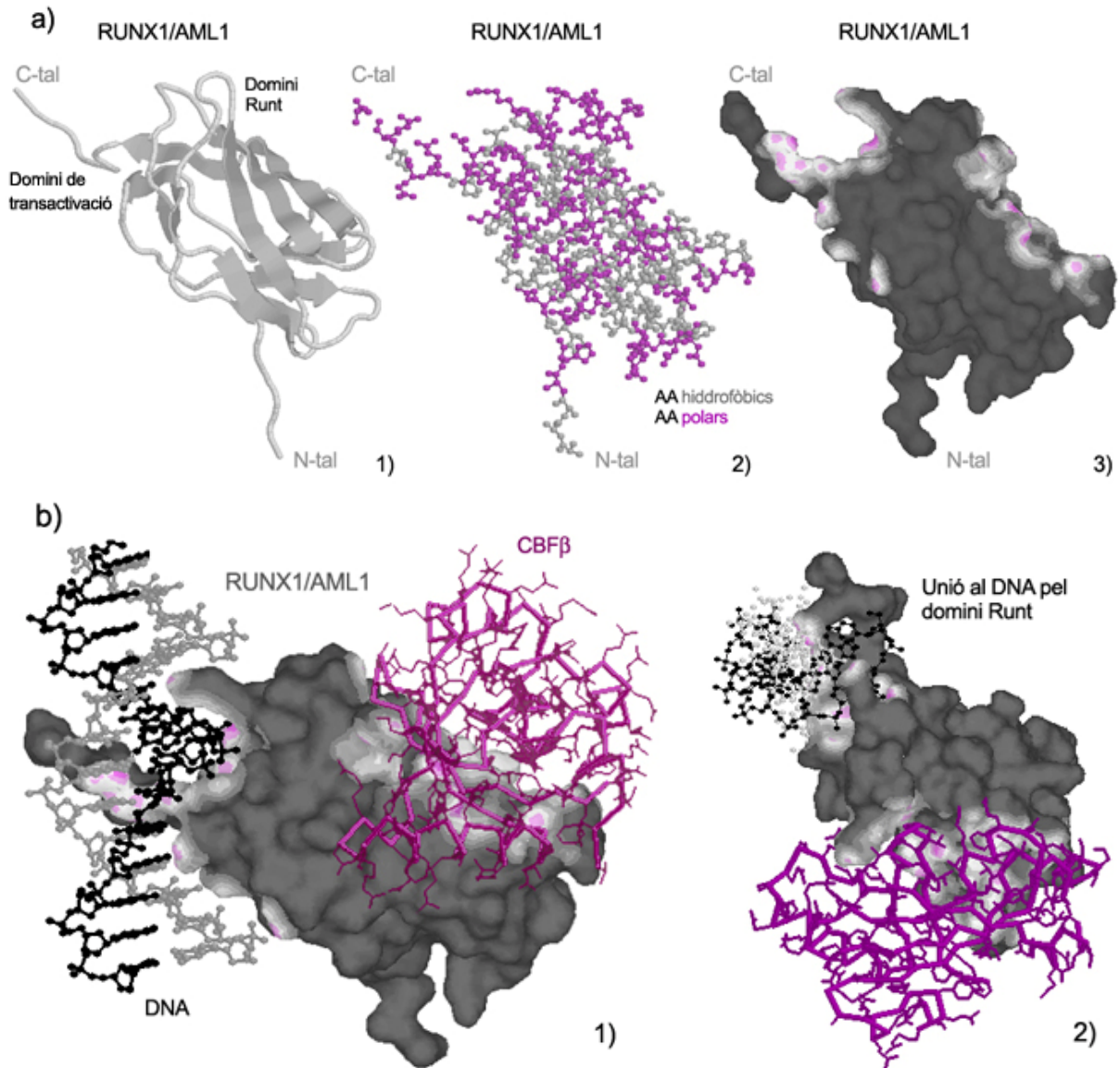


Figura 66a, imatge 3D de la proteïna RUNX1/AML1: imatges de la reconstrucció estructural de la proteïna RUNX1/AML1 obtingudes amb el programa *Protein Explorer 7.0*[®] 1) estructura esquemàtica de la proteïna RUNX1/AML1 en la qual s'observen les 11 làmines beta antiparal·leles que en formen part. També s'indiquen el domini Runt i el domini de transactivació; 2) estructura atòmica de la proteïna RUNX1/AML1, es destaquen en gris els AA hidrofòbics i en violeta els AA polars. Cal destacar els AA del domini Runt i els del domini de transactivació són gairebé tots polars; 3) esquema on es mostra la superfície de van der Waals de la proteïna RUNX1/AML1. Les zones clares mostren els punts de contacte amb el DNA i la proteïna CBFβ.

Figura 66b, imatge 3D del Heterodímer RUNX1/AML1-CBFβ i el DNA: la reconstrucció estructural amb el programa *Protein Explorer 7.0*[®] ha permès visualitzar la dimerització de RUNX1/AML1 amb CBFβ i la seva unió al DNA. 1) la imatge mostra al dimerització de RUNX1/AML1 (superfície de van der Waals gris) amb CBFβ (esquema estructural violeta). També es mostra l'unió al DNA pel domini Runt i el domini de transactivació, així com els punts de contacte de RUNX1/AML1 amb les dues molècules (color blanc i rosat); 2) la imatge mostra una altra orientació de la visualització del dímer RUNX1/AML1-CBFβ unit al DNA. Destaca la grapa que formen el domini Runt i el domini de transactivació per unir-se al DNA.

Amb el programa *Morph Viewer*[®] (<http://www.molmovdb.org>), hem reconstruït la successió de processos de canvis en l'estructura de RUNX1/AML1, des de l'heterodimerització fins a la unió al DNA. En aquesta reconstrucció es pot observar la mobilitat remarcable de l'extrem C terminal de RUNX1, on es troba el domini de transactivació, per entrar dins el solc ample del DNA, així com del domini d'unió al DNA Runt (Fig. 67).

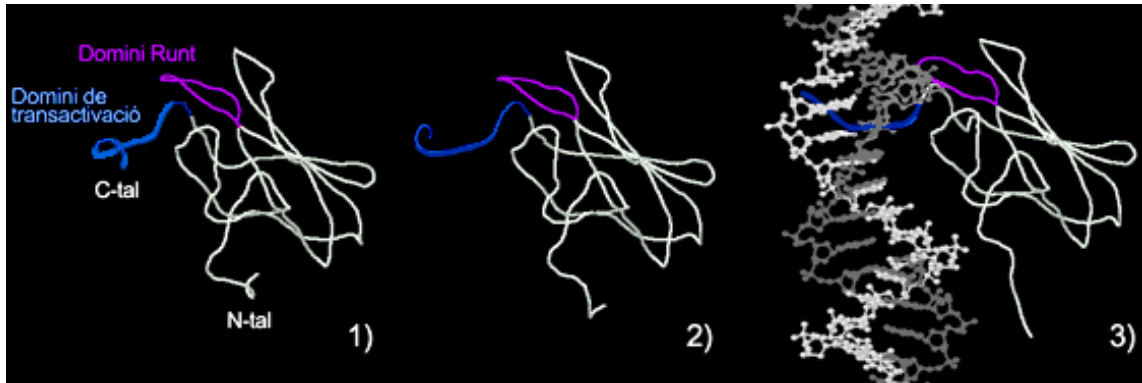


Figura 67, imatge de la reconstrucció 3D de la unió de RUNX1/AML1 al DNA: la imatge obtinguda amb el programa *Morph Viewer*[®] permet observar el moviment que fa la proteïna RUNX1/AML1 al unir-se al DNA. 1) representació esquemàtica de la proteïna RUNX1/AML1: en blau es destaca el domini de transactivació i en violeta el domini Runt; 2) s'observa com el domini de transactivació i el domini Runt es van desplegant; 3) el domini Runt contacta amb el DNA i el domini de transactivació entra desplegant-se pel solc ample del DNA.

25.2. Anàlisi dels nivells d'expressió proteica de RUNX1/AML1

25.2.1. Anàlisi de *western blot*

L'anàlisi de *western blot* per determinar l'expressió del factor de transcripció RUNX1/AML1 a l'EEC no només ens va permetre validar els resultats trobats tant en l'assaig de *microarrays* de teixit, com en l'assaig de PCR a temps real, sinó que ens va aportar els primers resultats d'expressió diferencial proteica de RUNX1/AML1 en el carcinoma endometrial. Els resultats mostraven una clara sobreexpressió proteica de RUNX1/AML1 a l'EEC en comparació amb les mostres de teixit atròfic sa (Fig. 49a i 49b). Aquests resultats van aportar nous coneixements a l'alteració descrita de *RUNX1/AML1*, cosa que va permetre correlacionar l'augment d'mRNA amb l'augment de proteïna. Respecte al perfil d'expressió proteica en funció dels estadis I o II els resultats han mostrat que hi ha un decrement de l'expressió quan es comparen les mostres IC amb la mostra IIB. La disminució de l'expressió en la mostra

d'estadi més avançat per una banda concorda amb el perfil d'expressió gènica obtingut per a *RUNX1/AML1* i per l'altra suggereix que la sobreexpressió de *RUNX1/AML1* estaria associada als estadis inicial de carcinogènesi endometrial. Els estudis proteics, però, s'han completat amb l'estudi immunohistoquímic en els *arrays* de teixit endometrial.

25.2.2. Anàlisi immunohistoquímica en arrays de teixit endometrial

Per tal de caracteritzar l'expressió *RUNX1/AML1* a nivell proteic en el carcinoma endometriode es va optar per l'estratègia de construir diversos *arrays* de teixit. D'aquesta manera es podia descriure l'evolució de l'expressió de la proteïna al llarg del desenvolupament del procés neoplàsic, des del teixit atròfic fins al carcinoma endometriode passant per les hiperplàsies simples i complexes. És a dir, poder caracteritzar l'expressió de *RUNX1/AML1* en un ampli panell de mostres representatives dels teixits més rellevants que es troben en pacients postmenopàusiques amb i sense patologia endometrial. En l'*array* d'endometri atròfic, utilitzat com a control normal d'expressió, s'observa un marcatge negatiu tant en les glàndules epitelials atròfiques com en l'estroma endometrial (en la majoria de casos no s'observa marcatge ni citoplasmàtic ni nuclear). Tot i així, en algun punt es pot trobar un marcatge puntual i lleu de les glàndules endometrials, majoritàriament a la part perinuclear i apical de l'epiteli glandular (Fig. 52a). L'epiteli de superfície, negatiu en la majoria dels punts, també mostra un patró semblant quan presenta positivitat. Quan es compara aquest teixit amb la hiperplàsia simple, la complexa i el carcinoma, s'observa una destacada gradació en la intensitat de marcatge de *RUNX1/AML1*, que augmenta a mesura que progressa la patologia. Així doncs, trobem des de marcatges pràcticament negatius del teixit atròfic, marcatges mitjos (1-2) en les hiperplàsies simples (HS) i (1-3) en les complexes (HC) i els marcatges intensos (2-3) en el carcinoma endometrial (EEC). Observant amb detall la intensitat del marcatge es pot constatar que tant l'HC com l'EEC no presenten cap mostra amb marcatge negatiu és a dir, sempre hi ha un nivell d'expressió destacable (Fig. 52b i 52c). L'anàlisi quantitativa i l'estudi estadístic realitzat sobre els resultats atorguen significació a aquestes diferències d'expressió entre les diferents mostres i a l'augment d'expressió en el procés tumorigènic. Aquests resultats per una banda confirmen la sobreexpressió de *RUNX1/AML1* en el carcinoma endometrial del tipus endometriode i per una altra mostren la gradació positiva en els nivells d'expressió al llarg del desenvolupament tumoral des del teixit normal fins al carcinoma. Hom es podria preguntar pels resultats dels nivells d'expressió tenint només en compte els estadis de les mostres tumorals, com a l'estudi realitzat per PCR a temps real. Sobre aquest fet cal dir

que, tot i que s'ha observat una tendència cap a nivells d'expressió majors en els estadis primerencs I, en concret en els estadis IC on hi ha major invasió miometrial i en estadis no gaire més avançats com els IIA, no s'ha pogut dotar de significació estadística. Una possible explicació seria la sensibilitat de la tècnica de la PCR a temps real. Aquesta tècnica és molt més sensible i ens permet jugar més amb les diferències quant als nivells d'expressió que la immunohistoquímica amb diaminobenzidina (DAB) convencional, que només permet diferenciar entre marcatges baixos, mitjos i alts. Per tant els resultats de major expressió de RUNX1/AML1 en els estadis IC podrien restar apantallats.

Un altre aspecte interessant s'obté de l'estudi en detall del marcatge clarament epitelial de la tinció. A nivell cel·lular s'observa un important marcatge citoplasmàtic de RUNX1/AML1, conjuntament amb un marcatge puntejat nuclear en algunes cèl·lules (Fig. 52b). Per una part el marcatge citoplasmàtic de RUNX1/AML1 suggereix l'existència d'un reservori d'aquest factor de transcripció que es podria translocar al nucli per realitzar la seva funció, així mateix també podria suggerir una funció a citoplasma. A més la sobreexpressió de RUNX1/AML1 trobada en el carcinoma endometrial reforçaria la seva possible implicació en la patologia endometrial. Els resultats de localització es van corroborar amb la construcció de la proteïna de fusió RUNX1/AML1-GFP transfectada a la línia cel·lular HEC-IA i els posteriors assaigs de col·localització de la proteïna RUNX1/AML1 fusionada amb la GFP. Recentment s'ha descrit un nou mecanisme de regulació *in vivo* pel factor de transcripció RUNX1/AML1 que consisteix en un intercanvi dinàmic entre el nucli i la matriu nuclear⁽³²²⁾. Aquest treball també descriu la localització nuclear puntejada de RUNX1/AML1, així com s'ha descrit en el nostre grup, i suggereix un paper en el control de la transcripció. Els resultats aquí mostrats, en què s'observa localització tant nuclear com citoplasmàtica de RUNX1/AML1 suggereixen un intercanvi dinàmic entre el nucli i el citoplasma que podria representar un nivell addicional de regulació en el carcinoma endometrial.

RUNX1/AML1, pel fet de ser un factor de transcripció, regula l'expressió d'altres gens, per tant és factible pensar que podria estar regulant l'expressió de gens implicats en el carcinoma endometrial. S'ha dit que RUNX1/AML1 es troba implicat en l'activació transcripcional mitjançant l'organització de diferents factors en els promotors i *enhancers* dels gens dianes, els quals s'associen amb altres factors i cofactors que són necessaris per la regulació gènica⁽³²³⁾. Sembla que l'àcid retinoic podria ser el responsable de l'activació de l'expressió de RUNX1/AML1 tot i que *upstream* l'activació de RUNX1/AML1 és poc coneguda; *downstream* se'n

té un coneixement millor. S'han descrit diferents promotors de gens que presenten elements dianes de les proteïnes RUNX, tot i que és sabut que aquesta interacció és part d'un complex multiproteic. Dins les principals dianes descrites per a RUNX1/AML1, hi ha proteïnes reguladores del cicle cel·lular com p21^{WAF1/CIP1} o p14^(272, 324, 325). L'efecte de RUNX1/AML1 sobre els promotors dels dos gens dóna lloc a un augment de la seva expressió en diverses línies cel·lulars. Cal destacar, però, l'efecte inhibidor que té RUNX1/AML1 sobre p21^{WAF1/CIP1} en la línia de fibroblasts NIH3T3⁽²⁷²⁾. Per tant, efectes en la desregulació de l'expressió de *RUNX1/AML1* com la sobreexpressió descrita en el carcinoma endometrial podrien tenir efectes directes en la regulació del cicle cel·lular a partir de les alteracions de reguladors de cicle cel·lular com p21^{WAF1/CIP1} o p14.

25.3. Anàlisi de l'estructura proteica d'ERM/ETV5

Malgrat que el factor de transcripció ETV5/ERM no ha estat mai cristal·litzat i tampoc no s'ha pogut determinar l'estructura tridimensional de la proteïna, es coneix que presenta dos importants dominis: el domini ETS, que permet la unió d'ETV5/ERM al DNA i es troba localitzat a l'extrem C terminal i el domini de transactivació localitzat a l'extrem N terminal⁽³⁰⁶⁾. El domini ETS, com el domini Runt, es troba altament conservat, fet que és d'una gran importància perquè permet definir una família de proteïnes.

A partir de la informació cristal·logràfica del domini ETS i de les diverses proteïnes de la família ETS, com és el cas d'ETS-1⁽³²⁶⁾, obtinguda en les bases de dades públiques (NCBI, *3D Domains*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) i utilitzant els programes de predicció d'estructura tridimensional *SWISS-MODEL*[©] (<http://swissmodel.expasy.org>) i de visualització molecular *Protein Explorer 7.0*[©] (<http://www.proteinexplorer.org>) s'ha pogut realitzar la predicció de l'estructura tridimensional del factor de transcripció ETV5/ERM. L'estructura d'ETV5/ERM presenta dos dominis, l'ETS i el de transactivació. Cal destacar el domini ETS amb una estructura de hèlix-gir-hèlix de 85 residus, responsable del contacte entre el factor de transcripció i el DNA (Fig. 68).

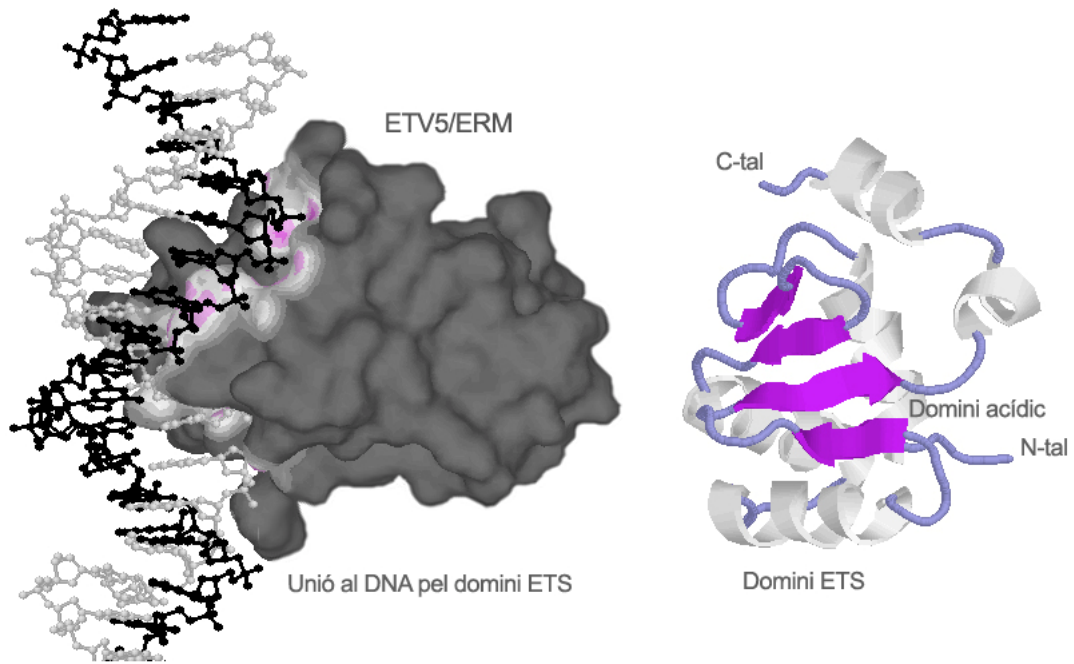


Figura 68, imatge de la predicció 3D de la proteïna ETV5/ERM: la programa SWISS-MODEL[®] ha permès la predicció de l'estructura 3D d'ETV5/ERM basant-se amb les dades cristal·logràfiques de la família ETS. La imatge mostra la superfície de van der Waals de la proteïna ETV5/ERM, així com la seva interacció amb el solc ample del DNA a través del domini ETS. Les zones clares i rosades mostren els punts de contacte. A la dreta de la fig. es mostra l'esquema proteic d'ETV5/ERM, el qual conté 4 hèlix alfa i 4 làmines beta.

25.4. Anàlisi dels nivells d'expressió proteica d'ERM/ETV5

25.4.1. Anàlisi de *western blot*

L'expressió proteica del factor de transcripció ETV5/ERM a l'EEC també es va valorar per *western blot* amb la mateixa intenció que per a la proteïna RUNX1/AML1. Els resultats obtinguts a nivell proteic es corresponien amb els resultats obtinguts a nivell gènic és a dir, s'observava una sobreexpressió d'ETV5/ERM a l'EEC en comparar-lo amb l'expressió en les mostres d'endometri atròfic sa, validant així la sobreexpressió descrita per ETV5/ERM tant en *microarrays* de cDNA com en la tècnica de la PCR a temps real (Fig. 50a i 50b). Els resultats de *western blot* per ETV5/ERM no només mostraven la sobreexpressió proteica d'aquest factor de transcripció a l'EEC sinó que, a més, també mostraven un perfil d'expressió més elevat per a les mostres d'estadi IC que per a les mostres d'estadi IIB com en el cas del seu perfil d'expressió gènic. Aquests resultats, sorprenentment, coincidien també amb els obtinguts per a RUNX1/AML1, cosa que suggeria que la sobreexpressió d'ETV5/ERM no només estaria

associada a estadis inicials de carcinogènesi endometrial sinó que ETV5/ERM podria estar desenvolupant un paper cooperatiu amb RUNX1/AML1 en aquest procés. Com en el cas de RUNX1/AML1 els estudis proteics s'han completat amb l'anàlisi immunohistoquímica dels *arrays* de teixit endometrial.

25.4.2. Anàlisi immunohistoquímica en arrays de teixit endometrial

De la mateixa manera que es va realitzar per a RUNX1/AML1, també es va voler caracteritzar l'expressió proteica d'ETV5/ERM al llarg del desenvolupament tumoral mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica en *arrays* de teixit en diferents etapes de la tumorigènesi endometrial. En primer lloc cal destacar que la localització de l'expressió d'ETV5/ERM es va mostrar clarament epitelial tant en el teixit normal com en les hiperplàsies i al carcinoma (Fig. 53a). Aquest fet incrementa la significació dels resultats d'expressió obtinguts, ja que el marcatge és específic d'epiteli i obvia la possible contribució del component estromal. Els resultats mostraven una clara sobreexpressió d'ETV5/ERM en l'*array* de carcinoma endometrial, tot corroborant els resultats obtinguts tant en el *microarray* de cDNA com en la PCR a temps real. Aquests resultats no només confirmen la sobreexpressió d'ETV5/ERM, sinó que descriuen una gradació en l'augment d'expressió a través del procés tumorigènic, partint del teixit atròfic amb valors d'expressió baixos (0-1), seguit de valors mitjos en la hiperplàsia simple (0-2), mitjos-alts en la complexa (1-3) i finalitzant amb els valors més alts en el carcinoma (2-3) (Fig. 53b). Aquesta gradació en el nivell d'expressió, per tant, aporta noves proves que recolzen la idea que la sobreexpressió d'ERM/ETV5 podria estar jugant un rol important en l'aparició i/o desenvolupament del carcinoma endometrial. Analitzant el marcatge d'ETV5/ERM a nivell cel·lular es va observar un marcatge principalment citoplasmàtic acompanyat d'un patró puntejat al nucli, que semblava que es trobava localitzat als dominis subnuclears. Estudis d'especificitat de marcatge, amb la transfecció *in vitro* de la proteïna ERM/ETV5-GFP en la línia cel·lular HEC-IA, varen corroborar aquesta informació. Una altra característica a destacar del marcatge d'ETV5/ERM ha estat la localització en molts casos d'una tinció més destacada en la part basal de la glàndula (Fig. 53a). Aquesta característica es podria explicar pel fet que diversos estudis han correlacionat l'expressió de membres de la família ETS (ETS-1)⁽³²⁷⁾, o fins hi tot de la subfamília PEA3 (ETV4/E1AF)^(316, 328) amb la progressió tumoral. Per tant, els marcatges més destacats d'ETV5/ERM en la zona basal de les glàndules es correlacionarien amb el front de progressió del carcinoma, que exactament es localitza en aquesta regió. A més,

com ja ha estat anteriorment comentat a l'apartat del gen d'ETV5/ERM, cal esmentar que hi ha diversos treballs que a part de correlacionar les proteïnes ETS amb la progressió tumoral descriuen la presència d'elements d'unió d'aquestes proteïnes als promotors de diferents metal·loproteases de matriu (MMPs) ^(314, 329, 330).

Un dels membres més importants de la família ETS, el protooncogèn *c-ets1*, ha estat descrit com a marcador valuós en la carcinogènesi endometrial ⁽³¹⁸⁾. *c-ets1* controla l'expressió de gens implicats en la remodelació de la matriu extracel·lular. Ha estat descrit com a regulador de l'expressió de les proteases MMP-3 ⁽³³¹⁾. A més s'ha descrit que ETS-1 regula l'expressió d'MMP-3, MMP-9 ⁽³¹⁵⁾, del plasminogen tipus uroquinasa (uPA) ⁽³³²⁾, així com del factor de creixement vascular endotelial (VEGF) i del seu receptor, fet que el relaciona amb l'angiogènesi, la migració cel·lular i la invasió tumoral associada a l'increment de l'activitat proteolítica de les cèl·lules tumorals invasores ⁽³¹⁵⁾. També s'ha correlacionat l'expressió de membres més propers a ETV5/ERM, com és el cas de ETV4/ E1AF, amb la sobreexpressió d'MMP1 i la progressió del càncer colorectal ⁽³¹⁶⁾, el càncer gàstric ⁽³²⁸⁾, el càncer de mama i el càncer d'ovari ^(333, 334). Sembla doncs que la sobreexpressió d'ETV5/ERM pot jugar un paper important en la progressió del carcinoma endometrial, mitjançant l'activació de l'expressió de diverses metal·loproteases de matriu que permetrien la infiltració del carcinoma al teixit adjacent. Una altra prova en aquest sentit és el fet d'haver trobat la major sobreexpressió d'ETV5/ERM, determinada per PCR a temps real, en l'estadi IC, estadi on es dona la major infiltració al miometri.

26. Anàlisi de possibles mecanismes d'acció de la sobreexpressió de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM en l'EEC

Per tal d'aprofundir en els resultats obtinguts de RUNX1/AML1 i d'ERM/ETV5 en l'EEC, ens vàrem plantejar iniciar dels efectes de la sobreexpressió d'ambdós gens en la carcinogènesi endometrial. L'estudi s'està duent a terme a dos nivells, en primer lloc l'anàlisi de la relació d'ambdós gens en la carcinogènesi endometrial, degut al seu estret paral·lelisme, i en segon lloc a l'estudi de les seves respectives dianes de regulació per obtenir resultats a nivell *downstream* a fi i efecte de poder comprendre l'efecte de la sobreexpressió en l'EEC.

26.1. Anàlisi de les interrelacions entre RUNX1/AML1 i ETV5/ERM

Estudiant els resultats obtinguts en l'anàlisi tant de PCR a temps real com d'immunoquímica sobre *arrays* de teixit, pel que fa a l'expressió de RUNX1/AML1 i ERM/ETV5, s'ha pogut constatar que els dos gens segueixen perfils d'expressió pràcticament idèntics tant quant al nivell d'expressió gènica com proteica. Aquests resultats han suggerit el realitzar un estudi de correlació estadística entre els nivells d'expressió d'ambdós gens per tal de poder-los relacionar. Aplicant el test de Wilcoxon per a dades aparellades pel que fa als perfils d'expressió gènica de RUNX1/AML1 i d'ERM/ETV5, on la significació es troba a una ($p \leq 0,05$), s'ha obtingut una significació de ($p=0,001$). Així mateix aplicant el test *Rho* d'Spearman per a variables no paramètriques també s'ha obtingut una significació de ($p=0,001$). El test *Rho* d'Spearman permet obtenir una correlació, fins i tot major, quan s'aplica al nivell d'expressió proteica amb una significació de ($p=0,0001$). Aquesta possible interacció es veu reforçada pel fet que hom ha descrit que un nou membre de la família ETS, concretament NERF/ELF-2, s'uneix a RUNX1/AML1 per una regió propera al domini ETS⁽³³⁵⁾. A més hi ha altres proves d'unió entre membres de la família ETS i RUNX1/AML1. S'ha descrit que l'activitat d'unió al DNA està modulada a través de la interacció amb RUNX1/AML1⁽³³⁶⁾. Finalment, en una revisió molt recent publicada a *Nature Reviews* sobre els gens RUNX i el càncer descriu la interacció entre membres de la família ETS i RUNX1/AML1 perquè pugui portar a terme l'activació transcripcional de diversos promotors diana⁽³³⁷⁾. Aquest conjunt de proves ens han permès especular sobre el fet que RUNX1/AML1 i ERM/ETV5 podrien estar implicats conjuntament en el desenvolupament del carcinoma endometrial. A més seria factible que poguessin estar cooperant conjuntament per portar a terme l'activació d'altres gens implicats en fenòmens d'invasió, ja que és en l'estadi més invasiu IC on s'ha trobat la màxima expressió dels dos marcadors.

26.2. Estudi de dianes de regulació de RUNX1/AML1 i d'ERM/ETV5

La família de proteïnes RUNX presenta un rol important en la repressió de la transcripció de manera específica depenent del tipus cel·lular, cosa que dona lloc a una repressió temporal o a un silenciament epigenètic irreversible⁽³³⁸⁾. Hom ha descrit complexos estables de RUNX1/AML1 amb corepressors com histones desacetilases i metiltransferases⁽³³⁹⁾. A més, el patró d'expressió de *RUNX1/AML1* determinat per PCR a temps real, que mostra un pic als estadis inicials d'invasió miometrial, també ens ha permès especular que la sobreexpressió de

RUNX1/AML1 a l'EEC podria estar associada amb la metilació de promotors com un mecanisme de silenciament transcripcional de gens involucrats en els primers nivells d'invasió de l'endometri tumoral al teixit adjacent. Per aquesta raó en el grup hem començat a estudiar aquest possible paper de les alteracions descrites en la carcinogènesi endometrial mitjançant l'estudi dels mecanismes funcionals de la sobreexpressió tant de RUNX1/AML1 com d'ERM/ETV5. Inicialment per portar a terme l'anàlisi s'ha pretès estudiar l'efecte *downstream* de RUNX1/AML1 escollint dos gens diana amb els quals RUNX1/AML1 interacciona: $p21^{WAF1/CIP1}$ i $PTEN$ ^(256, 337). Els criteris d'elecció dels gens, a part de ser dianes directes de RUNX1/AML1, s'han cenyit per una banda al fet que es trobessin alterats en la carcinogènesi endometrial i per altra banda a la presència d'illes de metilació CpG ⁽³⁴⁰⁾ per a una possible regulació a nivell epigenètic.

26.2.1. $p21^{WAF1/CIP1}$: diana de regulació de RUNX1/AML1

$p21^{WAF1/CIP1}$, proteïna de control de cicle, és una diana directa de p53 que actua d'inhibidor dels complexos CDK/Ciclins i causa aturada a G1-S quan es detecta un dany en el DNA. El perfil d'expressió gènica obtingut per PCR a temps real, sorprenentment, mostra una sobreexpressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ fins i tot superior a $RUNX1/AML1$ en molts punts (Fig. 59a, 59b i 59c). L'estudi estadístic aplicant el test de Wilcoxon permet obtenir una correlació significativa entre $p21^{WAF1/CIP1}$ i $RUNX1/AML1$ amb un màxim als estadis IC ($p=0,021$). Aquests resultats suggereixen que RUNX1/AML1 en lloc de promoure la repressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ en produiria l'activació. Cal destacar que hi ha diversos treballs en la mateixa direcció que mostren sobreexpressió del nivells de $p21^{WAF1/CIP1}$ en diversos teixits ⁽³⁴¹⁻³⁴³⁾. En el cas de $p21^{WAF1/CIP1}$ també hem determinat l'expressió per *western blot* i IHQ sobre *arrays* de tumor endometrial (Fig. 60a i 60b, Fig. 61, Fig. 62a i 62b), els quals ens han permès obtenir uns resultats idèntics pel que fa a la sobreexpressió gènica de $p21^{WAF1/CIP1}$ en les mostres tumorals, tot obtenint una correlació fins i tot major amb els nivells proteics de RUNX1/AML1 ($p=0,0001$) (Fig. 63a i 63b). Biakin i col·laboradors han descrit que la sobreexpressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ en la neoplàsia pancreàtica podria reflexar un increment de l'activitat Ras, mitjançant l'activació directa de les mutacions de *K-Ras* o per la consegüent sobreexpressió de *HER-2/neu*, alteracions per altra banda importants en la carcinogènesi endometrial ⁽³⁴⁴⁾. Aquestes observacions, conjuntament amb els resultats que hem obtingut, suggereixen un primer nivell en què s'observa sobreexpressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ en els estadis inicials de

carcinogènesi endometrial on el tumor es troba confinat a l'endometri i no hi ha infiltració. En aquest nivell $p21^{WAF1/CIP1}$ podria tenir un rol independent de l'expressió de *RUNX1/AML1*. En un segon nivell, quan el carcinoma endometrial comença a envair el miometri (estadis IB i IC) hi ha una alta correlació entre els nivells d'expressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ i *RUNX1/AML1*, cosa que indica un paper relacionat amb la invasió miometrial. En general sembla que *RUNX1/AML1* facilita la progressió G1-S, al contrari un excés de $p21^{WAF1/CIP1}$ bloqueja aquesta transició. Per tant, en general, seria d'esperar que alts nivells de *RUNX1/AML1* estessin associats a baixos nivells de $p21^{WAF1/CIP1}$, i/o altres inhibidors de ciclins/CDKs. Però sembla que l'efecte de *RUNX1/AML1* en l'epiteli endometrial és diferent i s'estimula l'expressió de $p21^{WAF1/CIP1}$, en qualsevol cas hom esperaria un menor índex proliferatiu en els tumors amb major expressió de $p21^{WAF1/CIP1}$. És a dir, en concordança amb els resultats obtinguts, tumors més relacionats amb la invasió que no pas amb la proliferació. Un possible mecanisme de la cooperació en la sobreexpressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ a través de *RUNX1/AML1* a l'EEC implicaria la transcripció de $p21^{WAF1/CIP1}$ a través de la via de senyalització del TGF β . Es conegut que els factors de transcripció RUNX interaccionen directament amb les proteïnes de regulació SMADs, efectors importants de la senyalització a través del TGF β ⁽²⁷²⁾. El TGF β pot activar els gens *RUNX* a nivell transcripcional i posttranscripcional amb l'estabilització de les proteïnes RUNX ⁽³³⁷⁾. A més, alteracions de les proteïnes SMAD4 i del receptor TGF β RII, conjuntament amb la descripció d'una major expressió en els carcinomes infiltrants en comparació amb els carcinomes no infiltrants, podrien ser molt importants en la infiltració del teixit miometrial a l'EEC ⁽³⁴⁵⁾. Basant-nos en els mecanismes comentats, hem hipotetitzat que $p21^{WAF1/CIP1}$ i *RUNX1/AML1* podrien estar cooperant durant els primers nivells de la disseminació de l'EEC a l'infiltració miometrial, a través de la via TGF β /SMAD i/o a través d'un balanç entre el creixement cel·lular i la diferenciació cel·lular a favor d'un fenotip invasiu enfront d'un fenotip proliferatiu. Conjuntament en aquest estudi també es va analitzar la correlació entre $p21^{WAF1/CIP1}$ i *ETV5/ERM* obtenint, curiosament, una correlació significativa, tant a nivell gènic com proteic, en els estadis inicials de carcinogènesi. Per tant aquests resultats suggereixen que *ETV5/ERM* també podria formar part del complex de regulació que conclou amb la sobreexpressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ en els estadis inicials de la carcinogènesi endometrial.

26.2.2. PTEN: diana de regulació de RUNX1/AML1 (estudis preliminars)

La següent diana de regulació de RUNX1/AML1 que es va escollir per aprofundir en l'anàlisi funcional de la sobreexpressió de RUNX1/AML1 va ser PTEN. Aquests estudis s'estan portant a terme en l'actualitat, per tant només es disposen de resultats preliminars; no obstant això, resulten força interessants i per aquest motiu s'exposen resumidament a continuació.

PTEN és un supressor tumoral que actua bloquejant el cicle cel·lular i permet l'activació de l'apoptosi. La inactivació del supressor tumoral PTEN és el defecte genètic més comú en el carcinoma endometrial. El perfil d'expressió gènica trobat per PCR a temps real mostra un perfil invers de PTEN al trobat per RUNX1/AML1, és a dir hi ha una baixada en els nivells d'expressió a mesura que augmenta l'expressió de RUNX1/AML1 amb un màxim a l'estadi IC moment en el qual hi ha el mínim nivell d'expressió de PTEN; consegüentment hi ha una recuperació dels nivells d'ambdós gens.

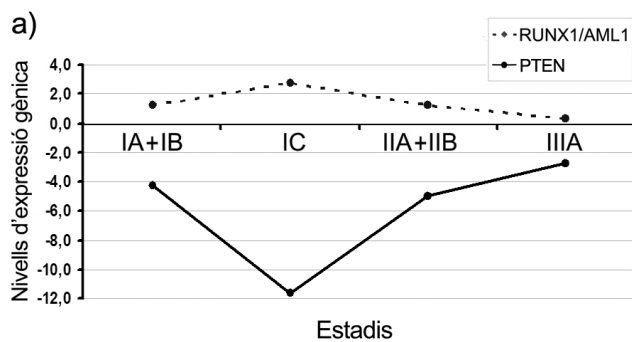


Figura 69a, imatge de la correlació inversa de l'expressió gènica de PTEN i RUNX1/AML1: el gràfic mostra els nivells d'expressió de PTEN i RUNX1/AML1, agrupats per estadis, respecte del teixit endometrial atròfic. En el gràfic es pot observar un perfil invers d'expressió per ambdós gens. Destaca l'estadi IC en el qual hi ha la màxima expressió RUNX1/AML1 i la mínima expressió de PTEN.

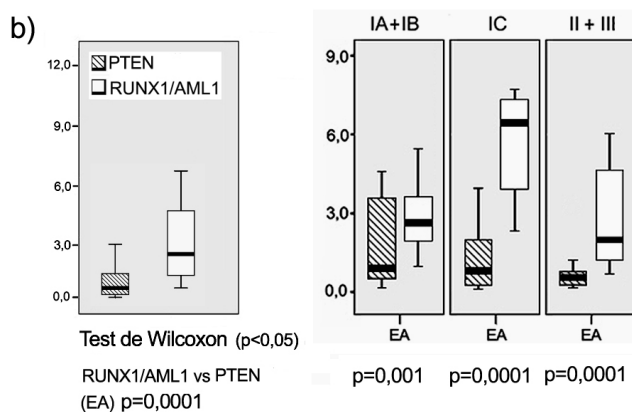


Figura 69b, diagrama dels resultats estadístics de la correlació gènica: la representació gràfica del test de Wilcoxon mostra la correlació inversa dels nivells d'expressió gènica de PTEN i RUNX1/AML1 respecte del teixit endometrial atròfic. A l'esquerra de la fig. s'observa la correlació inversa a nivell de totes les mostres tumorals. A la dreta de la fig. s'observa les mostres agrupades per estadis. A l'estadi IC és on hi ha la màxima correlació inversa. A la part inferior de la fig. es representa els valors de significació del test estadístic.

Els estudis estadístics aplicant el test de Wilcoxon ens mostren una destacada correlació en sentit invers entre els dos gens ($p = 0,0001$). Aquests resultats suggereixen que RUNX1/AML1 podria estar actuant promovent canvis epigenètics sobre el promotor de PTEN per

reclutament de diversos factors, de manera que n'apagués l'expressió i promogués la proliferació cel·lular. Però el fet de que els nivells de PTEN es recuperin posa en dubte aquest model. Una altra explicació podria ser que *RUNX1/AML1* modulés directament l'expressió de PTEN. Recentment s'ha descrit un paper dual de *RUNX1/AML1* com a repressor o activador de la transcripció segons la cooperació amb diferents cofactors i el seu estat epigenètic ⁽³³⁷⁾. Aquesta modulació podria explicar la disminució de l'expressió de PTEN en augmentar els nivells de *RUNX1* i una recuperació d'aquesta quan *RUNX1/AML1* recupera l'estat basal. En tot aquest conjunt també hi ha la possibilitat que *ETV5/ERM* jugui un paper com a cofactor per modular l'expressió de PTEN. Aquesta és una línia d'investigació oberta en què actualment estem treballant.

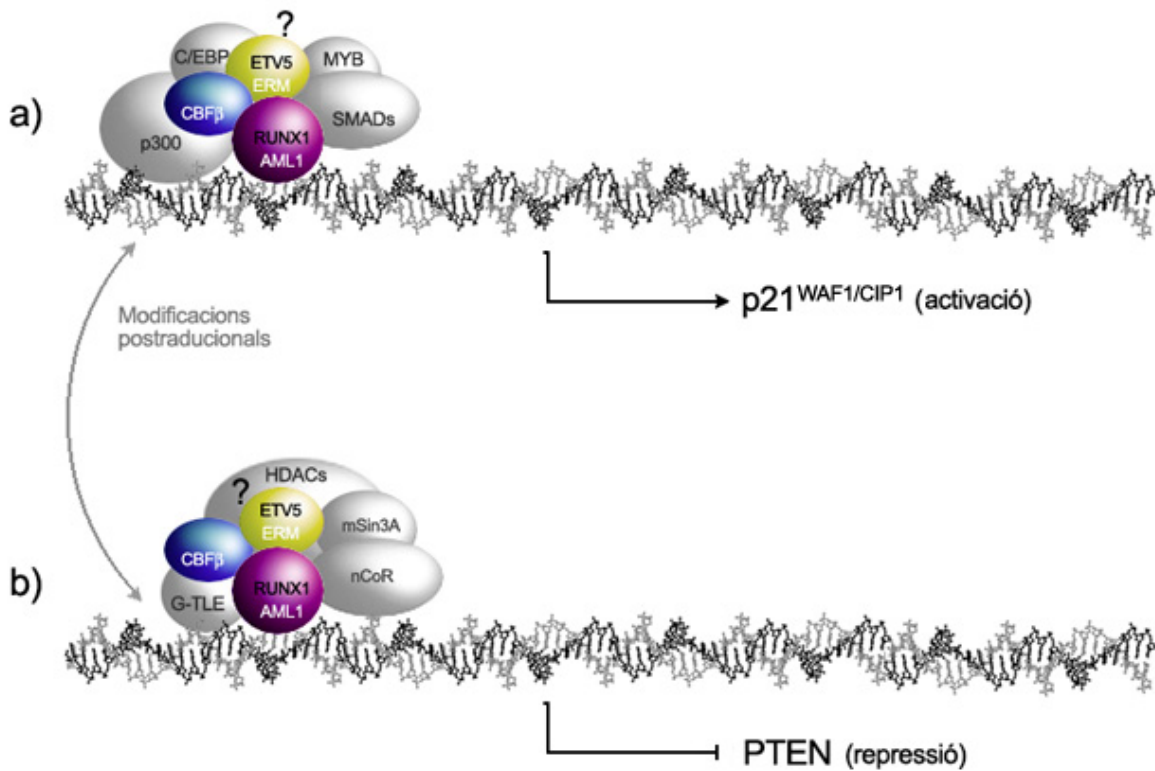


Figura 70a, proposta de mecanisme de regulació de *RUNX1/AML1* i *p21^{WAF1/CIP1}* en l'EEC: *RUNX1/AML1* s'ha descrit com a factor de transcripció amb un mecanisme dual d'activació i/o repressió genètica degut a possibles modificacions postraducionals. L'esquema mostra el complex que forma *RUNX1/AML1* per activar la transcripció de *p21^{WAF1/CIP1}* amb la incorporació d'*ETV5/ERM*. La sobreexpressió de *p21^{WAF1/CIP1}* degut a la sobreexpressió de *RUNX1/AML1* potenciarà una alteració de la transició G1-S en el cicle cel·lular.

Figura 70b, proposta de mecanisme de regulació de *RUNX1/AML1* i *PTEN* en l'EEC: l'esquema també mostra el paper de *RUNX1/AML1* com a repressor. El complex format per *RUNX1/AML1* amb la incorporació d'*ETV5/ERM* reprimirà l'expressió del supressor tumoral *PTEN*. La sobreexpressió de *RUNX1/AML1* produirà una alta repressió de *PTEN*, que conduirà a l'alteració del control apoptòtic.

26.2.3. MMP2: diana de regulació d'ETV5/ERM (estudis preliminars)

Aprofundint en les especulacions anteriors, s'han iniciat diversos treballs enfocats en poder demostrar la cooperació entre els dos factors de transcripció RUNX1/AML1 i ERM/ETV5 en el procés on el carcinoma esdevé més invasiu, estadi IC, però des de la perspectiva del gen ERM/ETV5, és a dir a partir de l'estudi de dianes regulades per aquest gen. Partim de diferents observacions: d'una banda hi ha elements PEA3 conservats als quals s'uneixen membres de la família de factors de transcripció ETS en tots els promotors de metal·loproteïnases de matriu (MMPs) ⁽³¹⁴⁾. D'altra banda el protooncogen *c-ets1*, marcador valuós en la carcinogènesi endometrial, controla l'expressió de les metal·loproteïnases MMP-3 ⁽³³¹⁾, de la col·lagenasa-1 ⁽³⁴⁶⁾ i de l'uPA ⁽³³²⁾. Per últim ETS-1 regula la transcripció de MMP-1, MMP-9, uPA, així com VEGF i el seu receptor ⁽³⁴⁶⁾. A freqüència d'aquestes observacions hem estudiat l'expressió proteica d'MMP-2 en els mateixos *arrays* de teixit on es van valorar tant RUNX1/AML1 com ERM/ETV5, amb l'objectiu d'investigar la possibilitat que els dos factors de transcripció poguessin actuar cooperativament a un nivell inicial de la infiltració miometrial, mitjançant la inducció de l'expressió de gens implicats en remodelar la matriu extracel·lular. Hem seleccionat la metal·loproteasa MMP-2, per trobar-se altament expressada en el carcinoma endometrial i presentar un rol important en la invasió miometrial i la metastasi ^(347, 348). La valoració i quantificació dels resultats dels nivells d'expressió proteica d'MMP-2 per immunohistoquímica ens mostren uns nivells d'expressió elevats d'MMP-2 en totes les mostres de carcinoma endometrial, amb una localització clarament citoplasmàtica. Realitzant l'estudi estadístic entre els tres marcadors amb el test *Rho* d'Sperman per a variables no paramètriques, trobem una alta correlació en l'expressió d'MMP-2, tant quan es compara amb l'expressió de RUNX/AML1 ($p=0,0001$) com quan es compara amb l'expressió d'ETV5/ERM ($p=0,0001$). Cal destacar que a partir dels *arrays* de teixit tumoral s'ha observat una localització subcel·lular característica per ETV5/ERM en la qual el major marcatge es dona en les cèl·lules de la part basal de la glàndula endometrial, que és precisament per on té lloc el front d'invasió tumoral (Fig. 71b). Això està acompanyat pel fet que el major pic d'expressió observat per PCR a temps real tant de *RUNX1/AML1* com d'*ERM/ETV5* es dona en estadis IC, estadis en què pròpiament hi ha una important extensió de l'invasió al miometri. Tot aquest conjunt de proves fa pensar que, en un altre nivell de regulació, RUNX1/AML1 i ERM/ETV5 podrien estar cooperant, ja sigui de manera directa o a través d'algun mediador, per activar l'expressió d'un conjunt d'elements com la metal·loproteasa MMP-2, la qual

promou la degradació del teixit i per tant afavoreix la invasió del carcinoma a altres teixits.

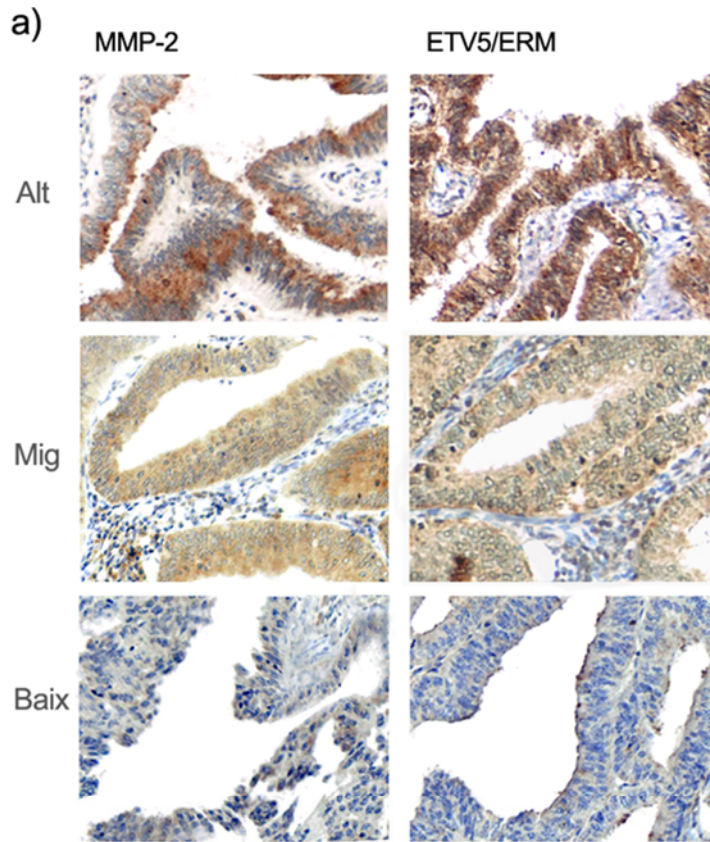


Figura 71a, imatge de la correlació del marcatge d'MMP-2 i ETV5/ERM: la imatge mostra la comparació de tres punts provinents de dos talls seriats de l'array tumoral d'EEC a 200×. Es pot observar la correlació en el nivell de marcatge immunohistoquímic d'MMP-2 i ETV5/ERM.

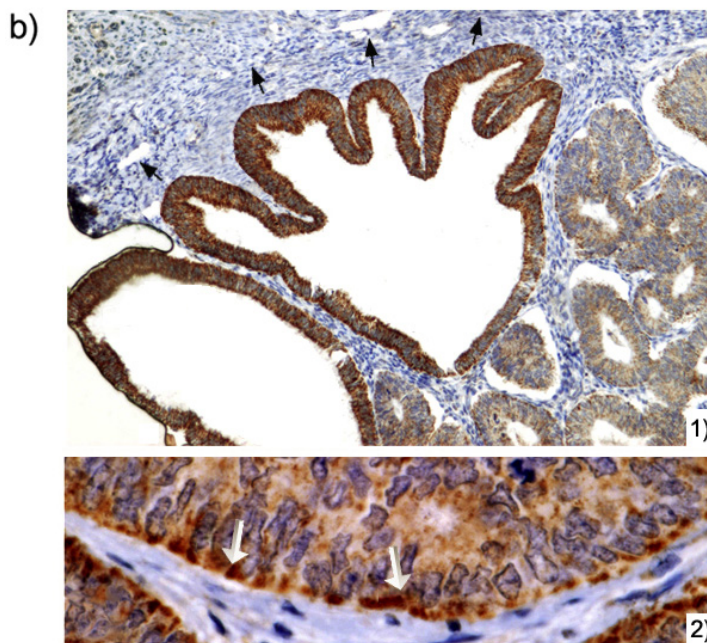


Figura 71b, imatge del marcatge d'ETV5/ERM en el front invasió de l'EEC: 1) detall d'un punt de l'array de teixit tumoral a 200× en que s'observa un marcatge molt intens d'ETV5/ERM en el front d'invasió del carcinoma cap al miometri; 2) detall del punt a 400×. Les fletxes blanques mostren un major marcatge d'ETV5/ERM al part basal de la glàndula tumoral, zona per on es produeix la invasió del miometri per part del carcinoma.

Aquest treball actualment s'està complimentant amb l'estudi d'expressió gènica i proteica d'MMP-2 in vitro en la línia de carcinoma endometrial HEC-IA, transfectada amb diferents construccions de *RUNX1/AML1* i d'*ERM/ETV5* a més de la proteïna de fusió GFP, així com amb assaigs d'invasió en matrigel i assaigs de proliferació de *wound healing*.

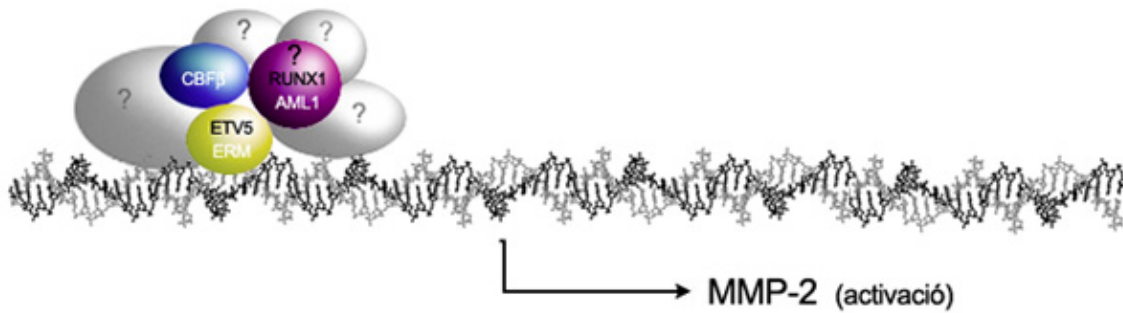


Figura 72, proposta de mecanisme de regulació d'ETV5/ERM i MMP-2 en l'EEC: és conegut que ETV5/ERM activa la traducció de MMPs. L'MMP-2 es troba alterada en el carcinoma endometrial. El mecanisme proposa ETV5/ERM com a responsable de l'activació de l'MMP-2. Per tant la sobreexpressió d'ETV5/ERM conduiria a la sobreexpressió de l'MMP-2, que al seu torn potenciarà la degradació de l'estroma per tal de que el tumor pogués envair el miometri. A més aquesta hipòtesi concorda a més amb la sobreexpressió d'ETV5/ERM, més accentuada en l'estadi IC de màxima invasió miometrial. En aquest cas RUNX1/AML1 podria jugar un paper de cofactor de l'expressió d'MMP-2, ja que es coneix que té la capacitat de reconèixer dominis ETS.

27. Significació patològica i aplicació clínica de la sobreexpressió de *RUNX1/AML1* i d'*ETV5/ERM*

Actualment el tractament primari del carcinoma endometrial es basa en la cirurgia, l'anomenada cirurgia d'estadificació. Aquest tipus de cirurgia permet l'obtenció de l'estadi F.I.G.O. definitiu, que consisteix en una estadificació quirúrgicopatològica. L'estadificació es basa en anàlisis morfològiques i histopatològiques, com la invasió miometrial tumoral, el tipus histològic, el grau histològic, la citologia peritoneal i l'afectació de ganglis retroperitoneal ⁽¹⁸⁴⁾. Cal recordar que dins l'estadi I de la F.I.G.O. es diferencien 3 subtipus que determinen l'afectació endometrial (estadi IA) i la invasió miometrial (estadi IB; afectació miometrial <50%) i (Estadi IC; afectació miometrial ≥50%). El grup de pacients de l'estadi IC, amb invasió miometrial profunda, normalment es correlaciona amb tumors més indiferenciats i representa un grup de pacients amb alt risc de recurrència, fins a un 20%. Per tant són

pacients que hauran de ser tractades amb teràpies posteriors a la cirurgia, normalment basades en la radioteràpia. La possibilitat de conèixer factors pronòstic a nivell molecular dins d'aquests tumors pot ajudar a conèixer millor el pronòstic global i determinar aquelles pacients amb majors possibilitats de patir una recidiva. D'aquesta manera es podrien elaborar noves estratègies terapèutiques dirigides a augmentar la supervivència i el temps lliure de malaltia. La sobreexpressió tant del gen *RUNX1/AML1* com del gen *ETV5/ERM*, a més a més d'explicar l'evolució en la progressió tumoral, podria constituir un factor molecular de mal pronòstic que permetés acotar les teràpies adjuvants, no exemptes de toxicitat i efectes secundaris, alhora que discriminés l'aplicació de teràpies més efectives, per augmentar la supervivència global, a les pacients que realment necessitessin l'aplicació de tractaments complementaris. Les investigacions del nostre grup es troben dirigides en aquest sentit.

28. Perspectives de futur del projecte d'investigació

La finalitat actual del grup és la caracterització detallada dels mecanismes moleculars i cel·lulars associats a la sobreexpressió de *RUNX1/AML1* i d'*ERM/ETV5* en el procés d'infiltració miometrial per tal d'aportar explicacions als mecanismes inicials d'invasió i disseminació del càncer d'endometri. L'actual projecte d'investigació ha estat enfocat en el sentit de caracteritzar a nivell funcional la sobreexpressió d'ambdós gens en models cel·lulars i animals, l'anàlisi de la interacció entre ells en la infiltració i promoció de metàstasi, així com l'estudi de diferents gens diana tant de *RUNX1/AML1* com d'*ERM/ETV5* amb possible implicació en la progressió i invasió com és el cas de *p21^{WAF1/CIP1}*, *PTEN* o *MMP-2*. Partint de les conclusions aportades en la present tesi, en què es destaca la possible implicació de la sobreexpressió de *RUNX1/AML1* i d'*ERM/ETV5* de manera cooperativa en el procés inicial d'infiltració miometrial i posterior disseminació de les metàstasis, s'ha proposat de desenvolupar coneixements necessaris per poder ser traslladats a la pràctica clínica. L'estudi pretén poder definir ambdós gens com a factors pronòstic, per tal de poder obtenir una estadificació més acurada del carcinoma i per tant garantir un tractament òptim a la pacient. L'estudi també es vol centrar en si hom pot definir *RUNX1/AML1* i/o *ERM/ETV5* com a dianes terapèutiques la interferència de les quals, amb el disseny acurat de fàrmacs, pogués frenar i/o revertir l'efecte de l'evolució del carcinoma endometrial.



CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- 1) Mitjançant estudis d'expressió en *microarrays de cDNA* s'han identificat dos gens que presenten una sobreexpressió en el carcinoma endometrial de tipus endometriode. D'una banda *RUNX1/AML1*, que és un gen que juga un paper important en el desenvolupament i del qual s'han descrit nombroses alteracions en la leucèmia, i *ETV5/ERM*, que és un gen poc conegut que actua com a factor de transcripció.
- 2) La sobreexpressió tant del gen *RUNX1/AML1* com del gen *ETV5/ERM* constitueix una nova alteració, prèviament no descrita, en la carcinogènesi endometrial. En concret l'alteració del gen *RUNX1/AML1*, clàssicament associada amb la leucèmia, s'ha relacionat per primera vegada amb el carcinoma endometrial en aquest estudi.
- 3) La PCR a temps real, el *western blot* i la immunohistoquímica han permès demostrar clarament les diferències d'expressió, concretament la sobreexpressió tant de *RUNX1/AML1* com d'*ETV5/ERM* entre les mostres tumorals i les mostres sanes d'endometri.
- 4) L'anàlisi dels perfils d'expressió al llarg de la tumorigènesi endometrial obtinguts per PCR a temps real ha permès determinar els màxims d'expressió d'ambdós gens en l'estadi IC, estadi en el qual es dona la major invasió miometrial. Aquests resultats, conjuntament amb una correlació estadística significativa entre ambdós gens, suggereixen un rol cooperatiu de *RUNX1/AML1* i d'*ETV5/ERM* en els estadis inicials de la infiltració miometrial.
- 5) L'anàlisi de l'expressió de les proteïnes *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM* amb els diferents *arrays* de teixit mostra un augment de l'expressió d'ambdues proteïnes al llarg del procés tumorigènic, partint del teixit sa, passant per la hiperplàsia simple i complexa i finalment el carcinoma. Aquests resultats no només confirmen la sobreexpressió de cadascun dels gens en el

carcinoma endometrial, sinó que, a més, mostren un altre nivell de gradació, a banda del que s'ha trobat entre estadis tumorals.

6) Mitjançant l'anàlisi estadística s'ha obtingut una alta correlació entre els nivells d'expressió proteica de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM en el mateix sentit que l'obtingut en l'anàlisi d'expressió gènica. Aquests resultats suggereixen que la cooperació entre aquests factors de transcripció, ja sigui de manera directa o indirecta, podria regular el repertori gènic implicat en el desenvolupament del carcinoma endometrial, prenent un rol més destacat en fenòmens d'invasió miometrial.

7) A partir dels estudis d'expressió de les dianes de regulació de RUNX1/AML1 s'ha trobat que la sobreexpressió de p21^{WAF1/CIP1} correlaciona tant a nivell gènic com proteic amb la sobreexpressió de RUNX1/AML1, cosa que suggereix un possible rol de la sobreexpressió de p21^{WAF1/CIP1} en els estadis inicials de carcinogènesi endometrial, on succeeix la infiltració miometrial.

8) A partir dels experiments preliminars amb la diana de regulació de RUNX1/AML1 s'ha obtingut que la infraexpressió de la diana PTEN correlaciona inversament amb la sobreexpressió RUNX1/AML1, resultat que indica una possible repressió de PTEN per part de RUNX1/AML1 que afavoriria la proliferació cel·lular i per tant la carcinogènesi endometrial.

9) Els experiments preliminars de correlació de l'expressió de la metal·loproteasa MMP-2 amb ETV5/ERM i RUNX1/AML1 mostren que aquesta correlació és elevada, especialment al front d'invasió. Aquests resultats, conjuntament amb el fet que ETV5/ERM regula l'expressió de diverses MMPs, suggereixen una cooperació per activar l'expressió de l'MMP-2 que promou la degradació del teixit i per tant afavoreix la invasió del carcinoma al miometri.

10) Finalment cal destacar la significació patològica de la sobreexpressió tant de *RUNX1/AML1* com d'*ETV5/ERM*. Els resultats obtinguts, en primer lloc, poden ser útils per millorar i concretar el diagnòstic del càncer endometrial i per tant poder aplicar el tractament més adient. En segon lloc suggereixen un possible nou rol com a factors pronòstic així com a noves dianes terapèutiques per millorar el tractament del carcinoma endometrial.



PAVLI AEGINETAE

MEDICI PRAESTANTISSIMI, DE ARTE
MEDENDI LIBER PRIMVS,
ALBANO TORINO
VITODVRENSI INTERPRETE.

De his quæ in foetura prægnantibus accidunt, quoq; nutritiu
alendæ sint grauidæ. CAP. PRIMVM.



20

QVVM fœminas utero gerentes eiusmodi magna
ex parte casus affligent, corporis ferè totius redun
dantiarum moles, iugis uomitus, sputatio, erosio
nes stomachi, & horror deniq; cibi: opere omni
no precium me facturũ arbitror, si suppetias, qui
bus eis subueniatur, scribere aggrediar. Utantur
itaq; præsentis cõmoditate: inambulationibus, ali
mentisq; haud magnam in partem suauibus, rufi
coloris falerno, quod pariter & ab odore commendetur, in primis autem
lustrico: cæterũ potationi perpetuò non nisi mediocri indulgeant: Quip
pe hæc omnia tum superfluitatum saburram, tum crebram quocumq; uomitus

um mala

Ratio uictus.

BIBLIOGRAFIA

1. **Kurman RJ**, Zaino RJ, Norris HJ. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. 5th ed. 2002, Nueva York: Springer-Verlag.
2. **Cabero L**, Cabrillo E. *Tratado de ginecología, obstetricia y medicina de la reproducción*. 2003, Madrid: Editorial medica panamericana.
3. **van de Graaff KM**. *Human anatomy*. 6th ed. Vol. 1. 2002, New York: Mc Hill. 29-39.
4. **Nussey SS**, Whitehead SA. *Endocrinology (An Integrated Approach)*. 2nd ed. Vol. 1. 2001, Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited.
5. **Salamonsen LA**, Kovacs GT, Findlay JK. Current concepts of the mechanisms of menstruation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 1999. 13(2): p. 161-79.
6. **Parkin DM**, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer*, 1999. 80(6): p. 827-41.
7. **Jemal A**, Tiwari RC, Murray T, *et al*. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin*, 2004. 54(1): p. 8-29.
8. **Lambert ME**, Blake PR. *Gynaecological oncology*. 1992, New York: Oxford.
9. **Rose PG**. Endometrial carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 1996(335): p. 649-9.
10. **Caduff RF**, Svoboda-Neumann SM, Johnston CM, *et al*. Molecular analysis in endometrial cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 1997. 81: p. 219-27.
11. **Lax SF**, Kurman RJ. A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analyses. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 1997. 81: p. 228-32.
12. **Abu-Abid S**, Szold A, Klausner J. Obesity and cancer. *J Med*, 2002. 33(1-4): p. 73-86.
13. **Parazzini F**, La Vecchia C, Negri E, *et al*. Diabetes and endometrial cancer: an Italian case-control study. *Int J Cancer*, 1999. 81(4): p. 539-42.
14. **Weiderpass E**, Persson I, Adami HO, *et al*. Body size in different periods of life, diabetes mellitus, hypertension, and risk of postmenopausal endometrial cancer (Sweden). *Cancer Causes Control*, 2000. 11(2): p. 185-92.
15. **Salazar-Martinez E**, Lazcano-Ponce EC, Gonzalez Lira-Lira G, *et al*. Reproductive factors of ovarian and endometrial cancer risk in a high fertility population in Mexico. *Cancer Res*, 1999. 59(15): p. 3658-62.

16. **Grady D**, Gebretsadik T, Kerlikowske K, *et al.* Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*, 1995. 85(2): p. 304-13.
17. **Silverman MB**, Roche PC, Kho RM, *et al.* Molecular and cytokinetic pretreatment risk assessment in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2000. 77(1): p. 1-7.
18. **Sandles LG**, Shulman LP, Elias S, *et al.* Endometrial adenocarcinoma: genetic analysis suggesting heritable site-specific uterine cancer. *Gynecol Oncol*, 1992. 47(2): p. 167-71.
19. **Watson P**, Lynch HT. Cancer risk in mismatch repair gene mutation carriers. *Fam Cancer*, 2001. 1(1): p. 57-60.
20. **Cederquist K**, Emanuelsson M, Goransson I, *et al.* Mutation analysis of the MLH1, MSH2 and MSH6 genes in patients with double primary cancers of the colorectum and the endometrium: a population-based study in northern Sweden. *Int J Cancer*, 2004. 109(3): p. 370-6.
21. **Bandera CA**, Boyd J. The molecular genetics of endometrial carcinoma. *Prog Clin Biol Res*, 1997. 396: p. 185-203.
22. **Lax SF**. [Dualistic model of molecular pathogenesis in endometrial carcinoma]. *Zentralbl Gynakol*, 2002. 124(1): p. 10-6.
23. **Lax SF**. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch*, 2004. 444(3): p. 213-23.
24. **Bokhman JV**. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 1983. 15(1): p. 10-7.
25. **Matias-Guiu X**, Catusus L, Bussaglia E, *et al.* Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol*, 2001. 32(6): p. 569-77.
26. **Montgomery BE**, Daum GS, Dunton CJ. Endometrial hyperplasia: a review. *Obstet Gynecol Surv*, 2004. 59(5): p. 368-78.
27. **Kurman RJ**, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients. *Cancer*, 1985. 56(2): p. 403-12.
28. **Karlsson B**, Granberg S, Wikland M, *et al.* Endovaginal scanning of the endometrium compared to cytology and histology in women with postmenopausal bleeding. *Gynecol Oncol*, 1993. 50(2): p. 173-8.
29. **Bergeron C**, Nogales FF, Masseroli M, *et al.* A multicentric European study testing the reproducibility of the WHO classification of endometrial hyperplasia with a proposal of a simplified working classification for biopsy and curettage specimens. *Am J Surg Pathol*, 1999. 23(9): p. 1102-8.
30. **Orbo A**, Baak JP, Kleivan I, *et al.* Computerised morphometrical analysis in endometrial hyperplasia for the prediction of cancer development. A long-term retrospective study from northern Norway. *J Clin Pathol*, 2000. 53(9): p. 697-703.
31. **Scully RE**, Young RH. Endometrioid neoplasia retrogressive terminology. *Am J Surg Pathol*, 2000. 24(5): p. 753-4; author reply 754-5.
32. **Kimura T**, Kamiura S, Yamamoto T, *et al.* Abnormal uterine bleeding and prognosis of endometrial cancer. *Int J Gynaecol Obstet*, 2004. 85(2): p. 145-50.
33. **Di Spiezio Sardo A**, Radhakrishnan S. Endometrial carcinoma on continuous

- combined HRT: case report and literature review. *Maturitas*, 2004. 48(2): p. 171-5.
34. **Krissi H**, Chetrit A, Menczer J. Presenting symptoms of patients with endometrial carcinoma. Effect on prognosis. *Eur J Gynaecol Oncol*, 1996. 17(1): p. 25-8.
35. **Demirkiran F**, Arvas M, Erkun E, *et al.* The prognostic significance of cervico-vaginal cytology in endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*, 1995. 16(5): p. 403-9.
36. **Blumenfeld ML**, Turner LP. Role of transvaginal sonography in the evaluation of endometrial hyperplasia and cancer. *Clin Obstet Gynecol*, 1996. 39(3): p. 641-55.
37. **Hata K**, Hata T, Kitao M. Intratumoral blood flow analysis in endometrial cancer: does it differ among individual tumor characteristics? *Gynecol Oncol*, 1996. 61(3): p. 341-4.
38. **Ferry J**, Farnsworth A, Webster M, *et al.* The efficacy of the pipelle endometrial biopsy in detecting endometrial carcinoma. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 1993. 33(1): p. 76-8.
39. **Clark TJ**, Bakour SH, Gupta JK, *et al.* Evaluation of outpatient hysteroscopy and ultrasonography in the diagnosis of endometrial disease. *Obstet Gynecol*, 2002. 99(6): p. 1001-7.
40. **Marchetti M**, Litta P, Lanza P, *et al.* The role of hysteroscopy in early diagnosis of endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2002. 23(2): p. 151-3.
41. **Kim SH**, Kim HD, Song YS, *et al.* Detection of deep myometrial invasion in endometrial carcinoma: comparison of transvaginal ultrasound, CT, and MRI. *J Comput Assist Tomogr*, 1995. 19(5): p. 766-72.
42. **Scully RE**, Bonfiglio TA, Kurman RJ, *et al.* *International histological classification and histologic typing of female genital tract tumors*. 1994, Berlin: Springer-Verlag.
43. **Zaino R**, Whitney C, Brady MF, *et al.* Simultaneously detected endometrial and ovarian carcinomas--a prospective clinicopathologic study of 74 cases: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol*, 2001. 83(2): p. 355-62.
44. **Smith M**, McCartney AJ. Occult, high-risk endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 1985. 22(2): p. 154-61.
45. **Rosenberg P**, Boeryd B, Simonsen E. A new aggressive treatment approach to high-grade endometrial cancer of possible benefit to patients with stage I uterine papillary cancer. *Gynecol Oncol*, 1993. 48(1): p. 32-7.
46. **Fuller AJ**, Seiden MV, Young RH. *Uterine Cancer (ACS series)*. 1st ed. American Cancer Society Atlas of Clinical Oncology. Vol. 1. 2004, Hamilton: BC Decker Inc.
47. **Abeler VM**, Kjorstad KE. Clear cell carcinoma of the endometrium: a histopathological and clinical study of 97 cases. *Gynecol Oncol*, 1991. 40(3): p. 207-17.
48. **Nucci MR**, Prasad CJ, Crum CP, *et al.* Mucinous endometrial epithelial proliferations: a morphologic spectrum of changes with diverse clinical significance. *Mod Pathol*, 1999. 12(12): p. 1137-42.
49. **Zaloudek C**, Hayashi GM, Ryan IP, *et al.* Microglandular adenocarcinoma of the endometrium: a form of mucinous adenocarcinoma that may be confused with microglandular hyperplasia of the cervix. *Int J Gynecol Pathol*, 1997. 16(1): p. 52-9.
50. **Goodman A**, Zukerberg LR, Rice LW, *et al.* Squamous cell carcinoma of the

- endometrium: a report of eight cases and a review of the literature. *Gynecol Oncol*, 1996. 61(1): p. 54-60.
51. **Spiegel GW**, Austin RM, Gelven PL. Transitional cell carcinoma of the endometrium. *Gynecol Oncol*, 1996. 60(2): p. 325-30.
 52. **Abeler VM**, Kjorstad KE, Nesland JM. Undifferentiated carcinoma of the endometrium. A histopathologic and clinical study of 31 cases. *Cancer*, 1991. 68(1): p. 98-105.
 53. **Parker SL**, Tong T, Bolden S, *et al.* Cancer statistics, 1997. *CA Cancer J Clin*, 1997. 47(1): p. 5-27.
 54. **Duska LR**, Garrett A, Rueda BR, *et al.* Endometrial cancer in women 40 years old or younger. *Gynecol Oncol*, 2001. 83(2): p. 388-93.
 55. **Baloglu H**, Cannizzaro LA, Jones J, *et al.* Atypical endometrial hyperplasia shares genomic abnormalities with endometrioid carcinoma by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol*, 2001. 32(6): p. 615-22.
 56. **Abeler VM**, Kjorstad KE. Endometrial adenocarcinoma with squamous cell differentiation. *Cancer*, 1992. 69(2): p. 488-95.
 57. **Clement PB**, Young RH. Endometrioid carcinoma of the uterine corpus: a review of its pathology with emphasis on recent advances and problematic aspects. *Adv Anat Pathol*, 2002. 9(3): p. 145-84.
 58. **Zaino RJ**, Kurman RJ, Brunetto VL, *et al.* Villoglandular adenocarcinoma of the endometrium: a clinicopathologic study of 61 cases: a gynecologic oncology group study. *Am J Surg Pathol*, 1998. 22(11): p. 1379-85.
 59. **Murray SK**, Young RH, Scully RE. Uterine Endometrioid Carcinoma with Small Nonvillous Papillae: An Analysis of 26 Cases of a Favorable-Prognosis Tumor To Be Distinguished from Serous Carcinoma. *Int J Surg Pathol*, 2000. 8(4): p. 279-289.
 60. **Fearon ER**, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990. 61(5): p. 759-67.
 61. **Vogelstein B**, Fearon ER, Hamilton SR, *et al.* Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 1988. 319(9): p. 525-32.
 62. **Kinzler KW**, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 1996. 87(2): p. 159-70.
 63. **Lengauer C**, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, 1997. 386(6625): p. 623-7.
 64. **Perucho M**. Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med*, 1996. 2(6): p. 630-1.
 65. **Albertson DG**, Collins C, McCormick F, *et al.* Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet*, 2003. 34(4): p. 369-76.
 66. **Risinger JI**, Berchuck A, Kohler MF, *et al.* Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Res*, 1993. 53(21): p. 5100-3.
 67. **Goodfellow PJ**, Buttin BM, Herzog TJ, *et al.* Prevalence of defective DNA mismatch repair and MSH6 mutation in an unselected series of endometrial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(10): p. 5908-13.
 68. **Gurin CC**, Federici MG, Kang L, *et al.* Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer Res*, 1999. 59(2): p. 462-6.
 69. **Salvesen HB**, Akslen LA. Molecular pathogenesis and prognostic factors in endometrial carcinoma. *Apmis*, 2002. 110(10): p. 673-89.

70. **Ionov Y**, Peinado MA, Malkhosyan S, *et al.* Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 1993. 363(6429): p. 558-61.
71. **Catasus L**, Matias-Guiu X, Machin P, *et al.* BAX somatic frameshift mutations in endometrioid adenocarcinomas of the endometrium: evidence for a tumor progression role in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *Lab Invest*, 1998. 78(11): p. 1439-44.
72. **Ouyang H**, Furukawa T, Abe T, *et al.* The BAX gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach, and endometrium. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(4): p. 1071-4.
73. **Ouyang H**, Shiwaku HO, Hagiwara H, *et al.* The insulin-like growth factor II receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium, stomach, and colorectum. *Cancer Res*, 1997. 57(10): p. 1851-4.
74. **Kolodner RD**. Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem Sci*, 1995. 20(10): p. 397-401.
75. **Acharya S**, Wilson T, Gradia S, *et al.* hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(24): p. 13629-34.
76. **Wijnen J**, de Leeuw W, Vasen H, *et al.* Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet*, 1999. 23(2): p. 142-4.
77. **Ichikawa Y**, Lemon SJ, Wang S, *et al.* Microsatellite instability and expression of MLH1 and MSH2 in normal and malignant endometrial and ovarian epithelium in hereditary nonpolyposis colorectal cancer family members. *Cancer Genet Cytogenet*, 1999. 112(1): p. 2-8.
78. **Ichikawa Y**, Tsunoda H, Takano K, *et al.* Microsatellite instability and immunohistochemical analysis of MLH1 and MSH2 in normal endometrium, endometrial hyperplasia and endometrial cancer from a hereditary nonpolyposis colorectal cancer patient. *Jpn J Clin Oncol*, 2002. 32(3): p. 110-2.
79. **Aaltonen LA**, Peltomaki P, Leach FS, *et al.* Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, 1993. 260(5109): p. 812-6.
80. **Thibodeau SN**, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, 1993. 260(5109): p. 816-9.
81. **Catasus 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(10): p. 1160-4.
82. **Schwartz S, Jr.**, Yamamoto H, Navarro M, *et al.* Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res*, 1999. 59(12): p. 2995-3002.
83. **Catasus L**, Matias-Guiu X, Machin P, *et al.* Frameshift mutations at coding mononucleotide repeat microsatellites in endometrial carcinoma with microsatellite instability. *Cancer*, 2000. 88(10): p. 2290-7.
84. **Katabuchi H**, van Rees B, Lambers AR, *et al.* Mutations in DNA mismatch repair genes are not responsible for microsatellite instability in most sporadic endometrial carcinomas. *Cancer Res*, 1995. 55(23): p. 5556-60.
85. **Kowalski LD**, Mutch DG, Herzog TJ, *et al.* Mutational analysis of MLH1 and MSH2 in 25 prospectively-acquired RER+ endometrial cancers. *Genes*

- Chromosomes Cancer*, 1997. 18(3): p. 219-27.
86. **Baylin SB**, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*, 2000. 16(4): p. 168-74.
87. **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): p. 2413-7.
88. **Esteller M**, Catusus L, Matias-Guiu X, *et al.* hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol*, 1999. 155(5): p. 1767-72.
89. **Inoue M**. Current molecular aspects of the carcinogenesis of the uterine endometrium. *Int J Gynecol Cancer*, 2001. 11(5): p. 339-48.
90. **Oehler MK**, Brand A, Wain GV. Molecular genetics and endometrial cancer. *J Br Menopause Soc*, 2003. 9(1): p. 27-31.
91. **Mutter GL**, Lin MC, Fitzgerald JT, *et al.* Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst*, 2000. 92(11): p. 924-30.
92. **Kurose K**, Zhou XP, Araki T, *et al.* Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas. *Am J Pathol*, 2001. 158(6): p. 2097-106.
93. **Zhu X**, Kwon CH, Schlosshauer PW, *et al.* PTEN induces G(1) cell cycle arrest and decreases cyclin D3 levels in endometrial carcinoma cells. *Cancer Res*, 2001. 61(11): p. 4569-75.
94. **Mutter GL**. PTEN, a protean tumor suppressor. *Am J Pathol*, 2001. 158(6): p. 1895-8.
95. **Salvesen HB**, MacDonald N, Ryan A, *et al.* PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Int J Cancer*, 2001. 91(1): p. 22-6.
96. **Liaw D**, Marsh DJ, Li J, *et al.* Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet*, 1997. 16(1): p. 64-7.
97. **Cairns P**, Okami K, Halachmi S, *et al.* Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res*, 1997. 57(22): p. 4997-5000.
98. **Li J**, Yen C, Liaw D, *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 1997. 275(5308): p. 1943-7.
99. **Steck PA**, Pershouse MA, Jasser SA, *et al.* Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*, 1997. 15(4): p. 356-62.
100. **Peiffer SL**, Herzog TJ, Tribune DJ, *et al.* Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res*, 1995. 55(9): p. 1922-6.
101. **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): p. 3935-40.
102. **Kong D**, Suzuki A, Zou TT, *et al.* PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet*, 1997. 17(2): p. 143-4.

103. **Risinger JI**, Hayes K, Maxwell GL, *et al.* PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(12): p. 3005-10.
104. **Koul A**, Willen R, Bendahl PO, *et al.* Distinct sets of gene alterations in endometrial carcinoma implicate alternate modes of tumorigenesis. *Cancer*, 2002. 94(9): p. 2369-79.
105. **Levine RL**, Cargile CB, Blazes MS, *et al.* PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. *Cancer Res*, 1998. 58(15): p. 3254-8.
106. **Latta E**, Chapman WB. PTEN mutations and evolving concepts in endometrial neoplasia. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2002. 14(1): p. 59-65.
107. **Stambolic V**, Tsao MS, Macpherson D, *et al.* High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten^{+/-} mice. *Cancer Res*, 2000. 60(13): p. 3605-11.
108. **Simpkins SB**, Peiffer-Schneider S, Mutch DG, *et al.* PTEN mutations in endometrial cancers with 10q LOH: additional evidence for the involvement of multiple tumor suppressors. *Gynecol Oncol*, 1998. 71(3): p. 391-5.
109. **Noonan FC**, Mutch DG, Ann Mallon M, *et al.* Characterization of the homeodomain gene EMX2: sequence conservation, expression analysis, and a search for mutations in endometrial cancers. *Genomics*, 2001. 76(1-3): p. 37-44.
110. **Boguski MS**, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, 1993. 366(6456): p. 643-54.
111. **Lagarda H**, Catusus L, Arguelles R, *et al.* K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol*, 2001. 193(2): p. 193-9.
112. **Semczuk A**, Schneider-Stock R, Berbec H, *et al.* K-ras exon 2 point mutations in human endometrial cancer. *Cancer Lett*, 2001. 164(2): p. 207-12.
113. **Esteller M**, Garcia A, Martinez-Palones JM, *et al.* The clinicopathological significance of K-RAS point mutation and gene amplification in endometrial cancer. *Eur J Cancer*, 1997. 33(10): p. 1572-7.
114. **Esteller M**, Xercavins J, Reventos J. Advances in the molecular genetics of endometrial cancer (Review). *Oncol Rep*, 1999. 6(6): p. 1377-82.
115. **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): p. 1906-10.
116. **Duggan BD**, Felix JC, Muderspach LI, *et al.* Early mutational activation of the c-Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma. *Cancer Res*, 1994. 54(6): p. 1604-7.
117. **Al-Jehani RM**, Jeyarajah AR, Hagen B, *et al.* Model for the molecular genetic diagnosis of endometrial cancer using K-ras mutation analysis. *J Natl Cancer Inst*, 1998. 90(7): p. 540-2.
118. **Duggan BD**, Felix JC, Muderspach LI, *et al.* Microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1994. 86(16): p. 1216-21.
119. **Morin PJ**, Sparks AB, Korinek V, *et al.* Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*, 1997. 275(5307): p. 1787-90.
120. **Palacios J**, Gamallo C. Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res*, 1998. 58(7): p. 1344-7.

121. **Shtutman M**, Zhurinsky J, Simcha I, *et al.* The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(10): p. 5522-7.
122. **Brabletz T**, Jung A, Dag S, *et al.* beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol*, 1999. 155(4): p. 1033-8.
123. **Fukuchi T**, Sakamoto M, Tsuda H, *et al.* Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res*, 1998. 58(16): p. 3526-8.
124. **Mirabelli-Primdahl L**, Gryfe R, Kim H, *et al.* Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res*, 1999. 59(14): p. 3346-51.
125. **Saegusa M**, Hashimura M, Yoshida T, *et al.* beta- Catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. *Br J Cancer*, 2001. 84(2): p. 209-17.
126. **Oehler MK**, Rees MC, Bicknell R. Steroids and the endometrium. *Curr Med Chem*, 2000. 7(5): p. 543-60.
127. **Couse JF**, Curtis Hewitt S, Korach KS. Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000. 74(5): p. 287-96.
128. **Horvath G**, Leser G, Hahlin M, *et al.* Exon deletions and variants of human estrogen receptor mRNA in endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, 2000. 10(2): p. 128-136.
129. **Lemieux P**, Fuqua S. The role of the estrogen receptor in tumor progression. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1996. 56(1-6 Spec No): p. 87-91.
130. **Daffada AA**, Johnston SR, Smith IE, *et al.* Exon 5 deletion variant estrogen receptor messenger RNA expression in relation to tamoxifen resistance and progesterone receptor/pS2 status in human breast cancer. *Cancer Res*, 1995. 55(2): p. 288-93.
131. **Saegusa M**, Okayasu I. Changes in expression of estrogen receptors alpha and beta in relation to progesterone receptor and pS2 status in normal and malignant endometrium. *Jpn J Cancer Res*, 2000. 91(5): p. 510-8.
132. **Brandenberger AW**, Tee MK, Jaffe RB. Estrogen receptor alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNAs in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER-beta in neoplastic tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. 83(3): p. 1025-8.
133. **Leygue E**, Dotzlaw H, Watson PH, *et al.* Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res*, 1998. 58(15): p. 3197-201.
134. **De Vivo I**, Huggins GS, Hankinson SE, *et al.* A functional polymorphism in the promoter of the progesterone receptor gene associated with endometrial cancer risk. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(19): p. 12263-8.
135. **Mutter GL**, Boynton KA, Faquin WC, *et al.* Allelotype mapping of unstable microsatellites establishes direct lineage continuity between endometrial precancers and cancer. *Cancer Res*, 1996. 56(19): p. 4483-6.
136. **Mutter GL**. Diagnosis of premalignant endometrial disease. *J Clin Pathol*, 2002. 55(5): p. 326-31.
137. **Planagumà J**, Abal M, Gil-Moreno A, *et al.* Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial

- infiltration in endometrioid endometrial carcinoma. *J Pathol*, 2005. 207(4): p. 422-9.
138. **Planagumà J**, Diaz-Fuertes M, Gil-Moreno A, *et al.* A differential gene expression profile reveals overexpression of RUNX1/AML1 in invasive endometrioid carcinoma. *Cancer Res*, 2004. 64(24): p. 8846-53.
139. **Soussi T**, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 2001. 1(3): p. 233-40.
140. **Geisler JP**, Geisler HE, Wiemann MC, *et al.* p53 expression as a prognostic indicator of 5-year survival in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 1999. 74(3): p. 468-71.
141. **Kounelis S**, Kapranos N, Kouri E, *et al.* Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature. *Mod Pathol*, 2000. 13(4): p. 379-88.
142. **Vousden KH**, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(8): p. 594-604.
143. **Baergen RN**, Warren CD, Isacson C, *et al.* Early uterine serous carcinoma: clonal origin of extrauterine disease. *Int J Gynecol Pathol*, 2001. 20(3): p. 214-9.
144. **Lax SF**, Kendall B, Tashiro H, *et al.* The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer*, 2000. 88(4): p. 814-24.
145. **Battifora H**. p53 immunohistochemistry: a word of caution. *Hum Pathol*, 1994. 25(5): p. 435-7.
146. **Kamb A**, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, *et al.* A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 1994. 264(5157): p. 436-40.
147. **Peiffer SL**, Bartsch D, Whelan AJ, *et al.* Low frequency of CDKN2 mutation in endometrial carcinomas. *Mol Carcinog*, 1995. 13(4): p. 210-2.
148. **Milde-Langosch K**, Riethdorf L, Bamberger AM, *et al.* P16/MTS1 and pRB expression in endometrial carcinomas. *Virchows Arch*, 1999. 434(1): p. 23-8.
149. **Nakashima R**, Fujita M, Enomoto T, *et al.* Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours. *Br J Cancer*, 1999. 80(3-4): p. 458-67.
150. **Toyota M**, Ahuja N, Suzuki H, *et al.* Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res*, 1999. 59(21): p. 5438-42.
151. **Toyota M**, Ohe-Toyota M, Ahuja N, *et al.* Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(2): p. 710-5.
152. **Salvesen HB**, Das S, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(1): p. 153-9.
153. **Rowlands TM**, Symonds JM, Farookhi R, *et al.* Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. *Rev Reprod*, 2000. 5(1): p. 53-61.
154. **Richmond PJ**, Karayiannakis AJ, Nagafuchi A, *et al.* Aberrant E-cadherin and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. *Cancer Res*, 1997. 57(15): p. 3189-93.
155. **Holcomb K**, Delatorre R, Pedemonte B, *et al.* E-cadherin expression in endometrioid, papillary serous, and clear

- cell carcinoma of the endometrium. *Obstet Gynecol*, 2002. 100(6): p. 1290-5.
156. **Sakuragi N**, Nishiya M, Ikeda K, *et al.* Decreased E-cadherin expression in endometrial carcinoma is associated with tumor dedifferentiation and deep myometrial invasion. *Gynecol Oncol*, 1994. 53(2): p. 183-9.
157. **Graus-Porta D**, Beerli RR, Daly JM, *et al.* ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J*, 1997. 16(7): p. 1647-55.
158. **Spandidos DA**, Dokianakis DN, Kallergi G, *et al.* Molecular basis of gynecological cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. 900: p. 56-64.
159. **Santin AD**, Bellone S, Gokden M, *et al.* Overexpression of HER-2/neu in uterine serous papillary cancer. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(5): p. 1271-9.
160. **Berchuck A**, Rodriguez G, Kinney RB, *et al.* Overexpression of HER-2/neu in endometrial cancer is associated with advanced stage disease. *Am J Obstet Gynecol*, 1991. 164(1 Pt 1): p. 15-21.
161. **Lukes AS**, Kohler MF, Pieper CF, *et al.* Multivariable analysis of DNA ploidy, p53, and HER-2/neu as prognostic factors in endometrial cancer. *Cancer*, 1994. 73(9): p. 2380-5.
162. **Rolitsky CD**, Theil KS, McGaughy VR, *et al.* HER-2/neu amplification and overexpression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*, 1999. 18(2): p. 138-43.
163. **Riben MW**, Malfetano JH, Nazeer T, *et al.* Identification of HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in stage I endometrial carcinoma. *Mod Pathol*, 1997. 10(8): p. 823-31.
164. **Rasty G**, Murray R, Lu L, *et al.* Expression of HER-2/neu oncogene in normal, hyperplastic, and malignant endometrium. *Ann Clin Lab Sci*, 1998. 28(3): p. 138-43.
165. **Tashiro H**, Lax SF, Gaudin PB, *et al.* Microsatellite instability is uncommon in uterine serous carcinoma. *Am J Pathol*, 1997. 150(1): p. 75-9.
166. **Lim PC**, Tester D, Cliby W, *et al.* Absence of mutations in DNA mismatch repair genes in sporadic endometrial tumors with microsatellite instability. *Clin Cancer Res*, 1996. 2(11): p. 1907-11.
167. **Tritz D**, Pieretti M, Turner S, *et al.* Loss of heterozygosity in usual and special variant carcinomas of the endometrium. *Hum Pathol*, 1997. 28(5): p. 607-12.
168. **Peiro G**, Diebold J, Lohse P, *et al.* Microsatellite instability, loss of heterozygosity, and loss of hMLH1 and hMSH2 protein expression in endometrial carcinoma. *Hum Pathol*, 2002. 33(3): p. 347-54.
169. **Okamoto A**, Sameshima Y, Yamada Y, *et al.* Allelic loss on chromosome 17p and p53 mutations in human endometrial carcinoma of the uterus. *Cancer Res*, 1991. 51(20): p. 5632-5.
170. **Fujino T**, Risinger JI, Collins NK, *et al.* Allelotype of endometrial carcinoma. *Cancer Res*, 1994. 54(16): p. 4294-8.
171. **Gima T**, Kato H, Honda T, *et al.* DCC gene alteration in human endometrial carcinomas. *Int J Cancer*, 1994. 57(4): p. 480-5.
172. **Hedrick L.** *Endometrial cancer.* The Genetic bases of Human Cancer, ed. BK vogestein, KW. 1998, New York: McGraw-Hill. 621-9.
173. **Semczuk A**, Marzec B, Roessner A, *et al.* Loss of heterozygosity of the retinoblastoma gene is correlated with the

- altered pRb expression in human endometrial cancer. *Virchows Arch*, 2002. 441(6): p. 577-83.
174. **Bamberger AM**, Riethdorf L, Milde-Langosch K, *et al.* Strongly reduced expression of the cell cycle inhibitor p27 in endometrial neoplasia. *Virchows Arch*, 1999. 434(5): p. 423-8.
175. **Oshita T**, Shigemasa K, Nagai N, *et al.* p27, cyclin E, and CDK2 expression in normal and cancerous endometrium. *Int J Oncol*, 2002. 21(4): p. 737-43.
176. **Masciullo V**, Susini T, Zamparelli A, *et al.* Frequent loss of expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in estrogen-related Endometrial adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(14): p. 5332-8.
177. **Ozkara SK**, Corakci A. Significantly decreased P27 expression in endometrial carcinoma compared to complex hyperplasia with atypia (correlation with p53 expression). *Pathol Oncol Res*, 2004. 10(2): p. 89-97.
178. **Kinzler KW**, Vogelstein B. Life (and death) in a malignant tumour. *Nature*, 1996. 379(6560): p. 19-20.
179. **El-Deiry WS**, Tokino T, Velculescu VE, *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 1993. 75(4): p. 817-25.
180. **Bukholm IK**, Nesland JM, Karesen R, *et al.* Relationship between abnormal p53 protein and failure to express p21 protein in human breast carcinomas. *J Pathol*, 1997. 181(2): p. 140-5.
181. **Palazzo JP**, Mercer WE, Kovatich AJ, *et al.* Immunohistochemical localization of p21(WAF1/CIP1) in normal, hyperplastic, and neoplastic uterine tissues. *Hum Pathol*, 1997. 28(1): p. 60-6.
182. **Valsecchi L**, Mangili G, Frigerio L, *et al.* Reliability of preoperative evaluation of prognostic factors in endometrial carcinoma. *Int J Gynaecol Obstet*, 1997. 59(1): p. 35-9.
183. **Prat J**. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum Pathol*, 2004. 35(6): p. 649-62.
184. **F.I.G.O.** International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO): Announcements. FIGO stages: 1988 revision. *Gynecol Oncol*, 1989(35): p. 125-127.
185. **Maneschi M**, Maneschi F, Geraci P, *et al.* Surgical pathological staging of endometrial carcinoma and results of treatment. *Eur J Gynaecol Oncol*, 1992. 13(1 Suppl): p. 30-5.
186. **Wolfson AH**, Sightler SE, Markoe AM, *et al.* The prognostic significance of surgical staging for carcinoma of the endometrium. *Gynecol Oncol*, 1992. 45(2): p. 142-6.
187. **Zaino RJ**, Kurman RJ, Diana KL, *et al.* Pathologic models to predict outcome for women with endometrial adenocarcinoma: the importance of the distinction between surgical stage and clinical stage--a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*, 1996. 77(6): p. 1115-21.
188. **Zaino RJ**, Kurman RJ, Diana KL, *et al.* The utility of the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics histologic grading of endometrial adenocarcinoma using a defined nuclear grading system. A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*, 1995. 75(1): p. 81-6.
189. **Nordstrom B**, Strang P, Lindgren A, *et al.* Carcinoma of the endometrium: do the nuclear grade and DNA ploidy provide more prognostic information than do the FIGO and WHO classifications? *Int J Gynecol Pathol*, 1996. 15(3): p. 191-201.

- ^{190.} **Lax SF**, Kurman RJ, Pizer ES, *et al.* A binary architectural grading system for uterine endometrial endometrioid carcinoma has superior reproducibility compared with FIGO grading and identifies subsets of advance-stage tumors with favorable and unfavorable prognosis. *Am J Surg Pathol*, 2000. 24(9): p. 1201-8.
- ^{191.} **Ayhan A**, Taskiran C, Yuce K, *et al.* The prognostic value of nuclear grading and the revised FIGO grading of endometrial adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol*, 2003. 22(1): p. 71-4.
- ^{192.} **Lee KR**, Vacek PM, Belinson JL. Traditional and nontraditional histopathologic predictors of recurrence in uterine endometrioid adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*, 1994. 54(1): p. 10-8.
- ^{193.} **Mariani A**, Webb MJ, Keeney GL, *et al.* Hematogenous dissemination in corpus cancer. *Gynecol Oncol*, 2001. 80(2): p. 233-8.
- ^{194.} **Morrow CP**, Bundy BN, Kurman RJ, *et al.* Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*, 1991. 40(1): p. 55-65.
- ^{195.} **Zaino RJ**, Kurman R, Herbold D, *et al.* The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*, 1991. 68(10): p. 2293-302.
- ^{196.} **Abeler VM**, Kjorstad KE, Berle E. Carcinoma of the endometrium in Norway: a histopathological and prognostic survey of a total population. *Int J Gynecol Cancer*, 1992. 2(1): p. 9-22.
- ^{197.} **Carcangiu ML**, Chambers JT. Uterine papillary serous carcinoma: a study on 108 cases with emphasis on the prognostic significance of associated endometrioid carcinoma, absence of invasion, and concomitant ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 1992. 47(3): p. 298-305.
- ^{198.} **Ambros RA**, Kurman RJ. Identification of patients with stage I uterine endometrioid adenocarcinoma at high risk of recurrence by DNA ploidy, myometrial invasion, and vascular invasion. *Gynecol Oncol*, 1992. 45(3): p. 235-9.
- ^{199.} **Sasano H**, Watanabe K, Ito K, *et al.* New concepts in the diagnosis and prognosis of endometrial carcinoma. *Pathol Annu*, 1994. 29 (Pt 2): p. 31-49.
- ^{200.} **Creasman WT**. Prognostic significance of hormone receptors in endometrial cancer. *Cancer*, 1993. 71(4 Suppl): p. 1467-70.
- ^{201.} **Kadar N**, Malfetano JH, Homesley HD. Steroid receptor concentrations in endometrial carcinoma: effect on survival in surgically staged patients. *Gynecol Oncol*, 1993. 50(3): p. 281-6.
- ^{202.} **Moore TD**, Phillips PH, Nerenstone SR, *et al.* Systemic treatment of advanced and recurrent endometrial carcinoma: current status and future directions. *J Clin Oncol*, 1991. 9(6): p. 1071-88.
- ^{203.} **Jacobsen M**, Jakobsen A, Nedergaard L, *et al.* Endometrial carcinomas--flow cytometric DNA content and S-phase values. *Pathol Res Pract*, 1997. 193(4): p. 283-90.
- ^{204.} **Larson DM**, Berg R, Shaw G, *et al.* Prognostic significance of DNA ploidy in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 1999. 74(3): p. 356-60.
- ^{205.} **Zaino RJ**, Davis AT, Ohlsson-Wilhelm BM, *et al.* DNA content is an independent prognostic indicator in endometrial adenocarcinoma. A Gynecologic Oncology Group study. *Int J Gynecol Pathol*, 1998. 17(4): p. 312-9.

206. **Bowen ID**, Bowen SM, Jones AH. *Mitosis and Apoptosis - Matters of Life and Death*. 1st ed. 1998, London: Chapman & Hall.
207. **van Diest PJ**, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol*, 1998. 51(10): p. 716-24.
208. **Nordstrom B**, Strang P, Bergstrom R, *et al*. A comparison of proliferation markers and their prognostic value for women with endometrial carcinoma. Ki-67, proliferating cell nuclear antigen, and flow cytometric S-phase fraction. *Cancer*, 1996. 78(9): p. 1942-51.
209. **Kaleli S**, Kosebay D, Bese T, *et al*. A strong prognostic variable in endometrial carcinoma: flow cytometric S-phase fraction. *Cancer*, 1997. 79(5): p. 944-51.
210. **Salvesen HB**, Iversen OE, Akslen LA. Identification of high-risk patients by assessment of nuclear Ki-67 expression in a prospective study of endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(11): p. 2779-85.
211. **Lax SF**, Pizer ES, Ronnett BM, *et al*. Clear cell carcinoma of the endometrium is characterized by a distinctive profile of p53, Ki-67, estrogen, and progesterone receptor expression. *Hum Pathol*, 1998. 29(6): p. 551-8.
212. **Nordstrom B**, Bergstrom R, Strang P. Prognostic index models in stage I and II endometrial carcinoma. *Anticancer Res*, 1998. 18(5B): p. 3717-24.
213. **Salvesen HB**, Iversen OE, Akslen LA. Prognostic significance of angiogenesis and Ki-67, p53, and p21 expression: a population-based endometrial carcinoma study. *J Clin Oncol*, 1999. 17(5): p. 1382-90.
214. **Kallakury BV**, Ambros RA, Hayner-Buchan AM, *et al*. Cell proliferation-associated proteins in endometrial carcinomas, including papillary serous and endometrioid subtypes. *Int J Gynecol Pathol*, 1998. 17(4): p. 320-6.
215. **Gassel AM**, Backe J, Krebs S, *et al*. Endometrial carcinoma: immunohistochemically detected proliferation index is a prognosticator of long-term outcome. *J Clin Pathol*, 1998. 51(1): p. 25-9.
216. **Cianciulli AM**, Guadagni F, Marzano R, *et al*. HER-2/neu oncogene amplification and chromosome 17 aneusomy in endometrial carcinoma: correlation with oncoprotein expression and conventional pathological parameters. *J Exp Clin Cancer Res*, 2003. 22(2): p. 265-71.
217. **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): p. 3126-32.
218. **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): p. 135-43.
219. **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): p. 238-46.
220. **Niederacher D**, An HX, Cho YJ, *et al*. Mutations and amplification of oncogenes in endometrial cancer. *Oncology*, 1999. 56(1): p. 59-65.
221. **Sakuragi N**, Ohkouchi T, Hareyama H, *et al*. Bcl-2 expression and prognosis of patients with endometrial carcinoma. *Int J Cancer*, 1998. 79(2): p. 153-8.
222. **Erdem O**, Erdem M, Dursun A, *et al*. Angiogenesis, p53, and bcl-2 expression as prognostic indicators in endometrial

- cancer: comparison with traditional clinicopathologic variables. *Int J Gynecol Pathol*, 2003. 22(3): p. 254-60.
223. **Minaguchi T**, Yoshikawa H, Oda K, *et al.* 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(9): p. 2636-42.
224. **Risinger JI**, Hayes AK, Berchuck A, *et al.* PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res*, 1997. 57(21): p. 4736-8.
225. **Salvesen HB**, Stefansson I, Kalvenes MB, *et al.* Loss of PTEN expression is associated with metastatic disease in patients with endometrial carcinoma. *Cancer*, 2002. 94(8): p. 2185-91.
226. **Kanamori Y**, Kigawa J, Itamochi H, *et al.* PTEN expression is associated with prognosis for patients with advanced endometrial carcinoma undergoing postoperative chemotherapy. *Int J Cancer*, 2002. 100(6): p. 686-9.
227. **Lax SF**, Pizer ES, Ronnett BM, *et al.* Comparison of estrogen and progesterone receptor, Ki-67, and p53 immunoreactivity in uterine endometrioid carcinoma and endometrioid carcinoma with squamous, mucinous, secretory, and ciliated cell differentiation. *Hum Pathol*, 1998. 29(9): p. 924-31.
228. **Pisani AL**, Barbuto DA, Chen D, *et al.* HER-2/neu, p53, and DNA analyses as prognosticators for survival in endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol*, 1995. 85(5 Pt 1): p. 729-34.
229. **Shih HC**, Shiozawa T, Kato K, *et al.* Immunohistochemical expression of cyclins, cyclin-dependent kinases, tumor-suppressor gene products, Ki-67, and sex steroid receptors in endometrial carcinoma: positive staining for cyclin A as a poor prognostic indicator. *Hum Pathol*, 2003. 34(5): p. 471-8.
230. **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): p. 354-60.
231. **Lynch HT**, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer*, 1996. 78(6): p. 1149-67.
232. **Caduff RF**, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, *et al.* Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am J Pathol*, 1996. 148(5): p. 1671-8.
233. **Maxwell GL**, Risinger JI, Alvarez AA, *et al.* Favorable survival associated with microsatellite instability in endometrioid endometrial cancers. *Obstet Gynecol*, 2001. 97(3): p. 417-22.
234. **Fiumicino S**, Ercoli A, Ferrandina G, *et al.* Microsatellite instability is an independent indicator of recurrence in sporadic stage I-II endometrial adenocarcinoma. *J Clin Oncol*, 2001. 19(4): p. 1008-14.
235. **Wong YF**, Ip TY, Chung TK, *et al.* Clinical and pathologic significance of microsatellite instability in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 1999. 9(5): p. 406-410.
236. **MacDonald ND**, Salvesen HB, Ryan A, *et al.* Frequency and prognostic impact of microsatellite instability in a large population-based study of endometrial carcinomas. *Cancer Res*, 2000. 60(6): p. 1750-2.
237. **Baldinu P**, Cossu A, Manca A, *et al.* Microsatellite instability and mutation analysis of candidate genes in unselected

- sardinian patients with endometrial carcinoma. *Cancer*, 2002. 94(12): p. 3157-68.
238. **Moreno-Bueno G**, Hardisson D, Sanchez C, *et al.* Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene*, 2002. 21(52): p. 7981-90.
239. **Palacios J**, Catusus L, Moreno-Bueno G, *et al.* Beta- and gamma-catenin expression in endometrial carcinoma. Relationship with clinicopathological features and microsatellite instability. *Virchows Arch*, 2001. 438(5): p. 464-9.
240. **Abulafia O**, Triest WE, Sherer DM, *et al.* Angiogenesis in endometrial hyperplasia and stage I endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol*, 1995. 86(4 Pt 1): p. 479-85.
241. **Kirschner CV**, Alanis-Amezcuca JM, Martin VG, *et al.* Angiogenesis factor in endometrial carcinoma: a new prognostic indicator? *Am J Obstet Gynecol*, 1996. 174(6): p. 1879-82; discussion 1882-4.
242. **Abulafia O**, Sherer DM. Angiogenesis of the endometrium. *Obstet Gynecol*, 1999. 94(1): p. 148-53.
243. **Salvesen HB**, Akslen LA. Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Int J Cancer*, 1999. 84(5): p. 538-43.
244. **Baillie CT**, Winslet MC, Bradley NJ. Tumour vasculature--a potential therapeutic target. *Br J Cancer*, 1995. 72(2): p. 257-67.
245. **Hanahan D**, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996. 86(3): p. 353-64.
246. **O'Reilly MS**, Pirie-Shepherd S, Lane WS, *et al.* Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science*, 1999. 285(5435): p. 1926-8.
247. **Ramaswamy S**, Golub TR. DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol*, 2002. 20(7): p. 1932-41.
248. **Baak JP**, Path FR, Hermsen MA, *et al.* Genomics and proteomics in cancer. *Eur J Cancer*, 2003. 39(9): p. 1199-215.
249. **Moreno-Bueno G**, Sanchez-Estevéz C, Cassia R, *et al.* Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res*, 2003. 63(18): p. 5697-702.
250. **Risinger JI**, Maxwell GL, Chandramouli GV, *et al.* Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer. *Cancer Res*, 2003. 63(1): p. 6-11.
251. **Ramaswamy S**, Tamayo P, Rifkin R, *et al.* Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(26): p. 15149-54.
252. **Singh AK**, Li H, Sherman LA. Microarray analysis and redox control of gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Physiol Plant*, 2004. 120(1): p. 27-35.
253. **Naef F**, Hacker CR, Patil N, *et al.* Empirical characterization of the expression ratio noise structure in high-density oligonucleotide arrays. *Genome Biol*, 2002. 3(4): p. RESEARCH0018.
254. **Naef F**, Hacker CR, Patil N, *et al.* Characterization of the expression ratio noise structure in high-density oligonucleotide arrays. *Genome Biol*, 2002. 3(1): p. PREPRINT0001.

255. **Singh R**, Maganti RJ, Jabba SV, *et al.* Microarray based comparison of three amplification methods for nanogram amounts of total RNA. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004.
256. **Michaud J**, Scott HS, Escher R. AML1 interconnected pathways of leukemogenesis. *Cancer Invest*, 2003. 21(1): p. 105-36.
257. **IHGSC**. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 2004. 431(7011): p. 931-45.
258. **van Wijnen AJ**, Stein GS, Gergen JP, *et al.* Nomenclature for Runt-related (RUNX) proteins. *Oncogene*, 2004. 23(24): p. 4209-10.
259. **Ogawa E**, Maruyama M, Kagoshima H, *et al.* PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(14): p. 6859-63.
260. **Meyers S**, Downing JR, Hiebert SW. Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions. *Mol Cell Biol*, 1993. 13(10): p. 6336-45.
261. **Ito Y**. Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. *Oncogene*, 2004. 23(24): p. 4198-208.
262. **Cameron ER**, Neil JC. The Runx genes: lineage-specific oncogenes and tumor suppressors. *Oncogene*, 2004. 23(24): p. 4308-14.
263. **Nam S**, Jin YH, Li QL, *et al.* Expression pattern, regulation, and biological role of runt domain transcription factor, run, in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(2): p. 547-54.
264. **Bangsow C**, Rubins N, Glusman G, *et al.* The RUNX3 gene--sequence, structure and regulated expression. *Gene*, 2001. 279(2): p. 221-32.
265. **Levanon D**, Glusman G, Bettoun D, *et al.* Phylogenesis and regulated expression of the RUNT domain transcription factors RUNX1 and RUNX3. *Blood Cells Mol Dis*, 2003. 30(2): p. 161-3.
266. **Rennert J**, Coffman JA, Mushegian AR, *et al.* The evolution of Runx genes I. A comparative study of sequences from phylogenetically diverse model organisms. *BMC Evol Biol*, 2003. 3(1): p. 4.
267. **Levanon D**, Glusman G, Bangsow T, *et al.* Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1. *Gene*, 2001. 262(1-2): p. 23-33.
268. **Miyoshi H**, Ohira M, Shimizu K, *et al.* Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res*, 1995. 23(14): p. 2762-9.
269. **Miyoshi H**, Shimizu K, Kozu T, *et al.* t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(23): p. 10431-4.
270. **Perry C**, Eldor A, Soreq H. Runx1/AML1 in leukemia: disrupted association with diverse protein partners. *Leuk Res*, 2002. 26(3): p. 221-8.
271. **Kitabayashi I**, Yokoyama A, Shimizu K, *et al.* Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *Embo J*, 1998. 17(11): p. 2994-3004.
272. **Lutterbach B**, Westendorf JJ, Linggi B, *et al.* A mechanism of repression by acute

- myeloid leukemia-1, the target of multiple chromosomal translocations in acute leukemia. *J Biol Chem*, 2000. 275(1): p. 651-6.
273. **Yokomizo T**, Ogawa M, Osato M, *et al.* Requirement of Runx1/AML1/PEBP2alphaB for the generation of haematopoietic cells from endothelial cells. *Genes Cells*, 2001. 6(1): p. 13-23.
274. **Speck NA**, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(7): p. 502-13.
275. **Gilliland DG**, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 2004: p. 80-97.
276. **Tanaka K**, Tanaka T, Kurokawa M, *et al.* The AML1/ETO(MTG8) and AML1/Evi-1 leukemia-associated chimeric oncoproteins accumulate PEBP2beta(CBFbeta) in the nucleus more efficiently than wild-type AML1. *Blood*, 1998. 91(5): p. 1688-99.
277. **Kurokawa M**, Hirai H. Role of AML1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies. *Cancer Sci*, 2003. 94(10): p. 841-6.
278. **Osato M**, Asou N, Abdalla E, *et al.* Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. *Blood*, 1999. 93(6): p. 1817-24.
279. **Imai O**, Kurokawa M, Izutsu K, *et al.* Mutational analyses of the AML1 gene in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*, 2002. 43(3): p. 617-21.
280. **Harewood L**, Robinson H, Harris R, *et al.* Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. *Leukemia*, 2003. 17(3): p. 547-53.
281. **Alvarez Y**, Coll MD, Bastida P, *et al.* AML1 amplification in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 2003. 140(1): p. 58-61.
282. **Penther D**, Preudhomme C, Talmant P, *et al.* Amplification of AML1 gene is present in childhood acute lymphoblastic leukemia but not in adult, and is not associated with AML1 gene mutation. *Leukemia*, 2002. 16(6): p. 1131-4.
283. **Mikhail FM**, Serry KA, Hatem N, *et al.* AML1 gene over-expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2002. 16(4): p. 658-68.
284. **Niini T**, Kanerva J, Vettenranta K, *et al.* AML1 gene amplification: a novel finding in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 2000. 85(4): p. 362-6.
285. **Lange B**. The management of neoplastic disorders of haematopoiesis in children with Down's syndrome. *Br J Haematol*, 2000. 110(3): p. 512-24.
286. **Hasle H**. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *Lancet Oncol*, 2001. 2(7): p. 429-36.
287. **Elagib KE**, Racke FK, Mogass M, *et al.* RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood*, 2003. 101(11): p. 4333-41.
288. **Kurokawa M**, Tanaka T, Tanaka K, *et al.* A conserved cysteine residue in the runt homology domain of AML1 is required for the DNA binding ability and the transforming activity on fibroblasts. *J Biol Chem*, 1996. 271(28): p. 16870-6.
289. **Kurokawa M**, Tanaka T, Tanaka K, *et al.* Overexpression of the AML1 proto-oncoprotein in NIH3T3 cells leads to neoplastic transformation depending on the DNA-binding and transactivational

- potencies. *Oncogene*, 1996. 12(4): p. 883-92.
290. **Frank RC**, Sun X, Berguido FJ, *et al.* The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, transforms NIH3T3 cells and activates AP-1. *Oncogene*, 1999. 18(9): p. 1701-10.
291. **Strom DK**, Nip J, Westendorf JJ, *et al.* Expression of the AML-1 oncogene shortens the G(1) phase of the cell cycle. *J Biol Chem*, 2000. 275(5): p. 3438-45.
292. **Bernardin F**, Friedman AD. AML1 stimulates G1 to S progression via its transactivation domain. *Oncogene*, 2002. 21(20): p. 3247-52.
293. **Lou J**, Cao W, Bernardin F, *et al.* Exogenous cdk4 overcomes reduced cdk4 RNA and inhibition of G1 progression in hematopoietic cells expressing a dominant-negative CBF - a model for overcoming inhibition of proliferation by CBF oncoproteins. *Oncogene*, 2000. 19(22): p. 2695-703.
294. **Friedman AD**. Runx1, c-Myb, and C/EBPalpha couple differentiation to proliferation or growth arrest during hematopoiesis. *J Cell Biochem*, 2002. 86(4): p. 624-9.
295. **Coffman JA**. Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation. *Cell Biol Int*, 2003. 27(4): p. 315-24.
296. **Bernardin-Fried F**, Kummalue T, Leijen S, *et al.* AML1/RUNX1 increases during G1 to S cell cycle progression independent of cytokine-dependent phosphorylation and induces cyclin D3 gene expression. *J Biol Chem*, 2004. 279(15): p. 15678-87.
297. **Ramaswamy S**, Ross KN, Lander ES, *et al.* A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*, 2003. 33(1): p. 49-54.
298. **Wang CY**, Petryniak B, Ho IC, *et al.* Evolutionarily conserved Ets family members display distinct DNA binding specificities. *J Exp Med*, 1992. 175(5): p. 1391-9.
299. **Higashino F**, Yoshida K, Fujinaga Y, *et al.* Isolation of a cDNA encoding the adenovirus E1A enhancer binding protein: a new human member of the ets oncogene family. *Nucleic Acids Res*, 1993. 21(3): p. 547-53.
300. **Xin JH**, Cowie A, Lachance P, *et al.* Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the Ets oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Genes Dev*, 1992. 6(3): p. 481-96.
301. **Monte D**, Baert JL, Defossez PA, *et al.* Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors. *Oncogene*, 1994. 9(5): p. 1397-406.
302. **Monte D**, Coutte L, Baert JL, *et al.* Molecular characterization of the ets-related human transcription factor ER81. *Oncogene*, 1995. 11(4): p. 771-9.
303. **Jeon IS**, Davis JN, Braun BS, *et al.* A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene*, 1995. 10(6): p. 1229-34.
304. **Brown TA**, McKnight SL. Specificities of protein-protein and protein-DNA interaction of GABP alpha and two newly defined ets-related proteins. *Genes Dev*, 1992. 6(12B): p. 2502-12.
305. **Baert JL**, Monte D, Musgrove EA, *et al.* Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells. *Int J Cancer*, 1997. 70(5): p. 590-7.

306. **Liu Y**, Jiang H, Crawford HC, *et al.* Role for ETS domain transcription factors Pea3/Erm in mouse lung development. *Dev Biol*, 2003. 261(1): p. 10-24.
307. **Protopopova MV**, Vorobieva NV, Protopopov AI, *et al.* Assignment of the ERM gene (ETV5) coding for the ets-related protein to human chromosome band 3q28 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1996. 74(3): p. 220.
308. **Crepieux P**, Coll J, Stehelin D. The Ets family of proteins: weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Crit Rev Oncog*, 1994. 5(6): p. 615-38.
309. **Paratore C**, Brugnoli G, Lee HY, *et al.* The role of the Ets domain transcription factor Erm in modulating differentiation of neural crest stem cells. *Dev Biol*, 2002. 250(1): p. 168-80.
310. **Shepherd T**, Hassell JA. Role of Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2001. 6(1): p. 129-40.
311. **Shepherd TG**, Kockeritz L, Szrajber MR, *et al.* The pea3 subfamily ets genes are required for HER2/Neu-mediated mammary oncogenesis. *Curr Biol*, 2001. 11(22): p. 1739-48.
312. **Nakae K**, Nakajima K, Inazawa J, *et al.* ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun. *J Biol Chem*, 1995. 270(40): p. 23795-800.
313. **Scott GK**, Daniel JC, Xiong X, *et al.* Binding of an ETS-related protein within the DNase I hypersensitive site of the HER2/neu promoter in human breast cancer cells. *J Biol Chem*, 1994. 269(31): p. 19848-58.
314. **Westermarck J**, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*, 1999. 13(8): p. 781-92.
315. **Dittmer J**. The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer*, 2003. 2(1): p. 29.
316. **Horiuchi S**, Yamamoto H, Min Y, *et al.* Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol*, 2003. 200(5): p. 568-76.
317. **Takai N**, Miyazaki T, Nishida M, *et al.* Clinical relevance of Elf-1 overexpression in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2003. 89(3): p. 408-13.
318. **Takai N**, Miyazaki T, Fujisawa K, *et al.* Expression of c-Ets1 is associated with malignant potential in endometrial carcinoma. *Cancer*, 2000. 89(10): p. 2059-67.
319. **Zhang L**, Lukasik SM, Speck NA, *et al.* Structural and functional characterization of Runx1, CBF beta, and CBF beta-SMMHC. *Blood Cells Mol Dis*, 2003. 30(2): p. 147-56.
320. **Tang L**, Guo B, Javed A, *et al.* Crystal structure of the nuclear matrix targeting signal of the transcription factor acute myelogenous leukemia-1/polyoma enhancer-binding protein 2alphaB/core binding factor alpha2. *J Biol Chem*, 1999. 274(47): p. 33580-6.
321. **Backstrom S**, Wolf-Watz M, Grundstrom C, *et al.* The RUNX1 Runt domain at 1.25A resolution: a structural switch and specifically bound chloride ions modulate DNA binding. *J Mol Biol*, 2002. 322(2): p. 259-72.
322. **Harrington KS**, Javed A, Drissi H, *et al.* Transcription factors RUNX1/AML1 and RUNX2/Cbfa1 dynamically associate with stationary subnuclear domains. *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 21): p. 4167-76.

323. **Mao S**, Frank RC, Zhang J, *et al.* Functional and physical interactions between AML1 proteins and an ETS protein, MEF: implications for the pathogenesis of t(8;21)-positive leukemias. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(5): p. 3635-44.
324. **Linggi B**, Muller-Tidow C, van de Locht L, *et al.* The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat Med*, 2002. 8(7): p. 743-50.
325. **Otto F**, Lubbert M, Stock M. Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem*, 2003. 89(1): p. 9-18.
326. **Garvie CW**, Hagman J, Wolberger C. Structural studies of Ets-1/Pax5 complex formation on DNA. *Mol Cell*, 2001. 8(6): p. 1267-76.
327. **Arora S**, Kaur J, Sharma C, *et al.* Stromelysin 3, Ets-1, and vascular endothelial growth factor expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with microvessel density, progression, and prognosis. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(6): p. 2272-84.
328. **Yamamoto H**, Horiuchi S, Adachi Y, *et al.* Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and overexpression of matrilysin in human gastric cancer. *Carcinogenesis*, 2004. 25(3): p. 325-32.
329. **Lincoln DW, 2nd**, Bove K. The transcription factor Ets-1 in breast cancer. *Front Biosci*, 2005. 10: p. 506-11.
330. **Alipov G**, Nakayama T, Ito M, *et al.* Overexpression of Ets-1 proto-oncogene in latent and clinical prostatic carcinomas. *Histopathology*, 2005. 46(2): p. 202-8.
331. **Wasylyk C**, Gutman A, Nicholson R, *et al.* The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *Embo J*, 1991. 10(5): p. 1127-34.
332. **Nerlov C**, Rorth P, Blasi F, *et al.* Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene*, 1991. 6(9): p. 1583-92.
333. **Davidson B**, Goldberg I, Tell L, *et al.* The clinical role of the PEA3 transcription factor in ovarian and breast carcinoma in effusions. *Clin Exp Metastasis*, 2004. 21(3): p. 191-9.
334. **Davidson B**, Goldberg I, Gotlieb WH, *et al.* PEA3 is the second Ets family transcription factor involved in tumor progression in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(4): p. 1412-9.
335. **Cho JY**, Akbarali Y, Zerbini LF, *et al.* Isoforms of the Ets transcription factor NERF/ELF-2 physically interact with AML1 and mediate opposing effects on AML1-mediated transcription of the B cell-specific blk gene. *J Biol Chem*, 2004. 279(19): p. 19512-22.
336. **Garvie CW**, Pufall MA, Graves BJ, *et al.* Structural analysis of the autoinhibition of Ets-1 and its role in protein partnerships. *J Biol Chem*, 2002. 277(47): p. 45529-36.
337. **Blyth K**, Cameron ER, Neil JC. The runx genes: gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(5): p. 376-87.
338. **Taniuchi I**, Littman DR. Epigenetic gene silencing by Runx proteins. *Oncogene*, 2004. 23(24): p. 4341-5.
339. **Durst KL**, Hiebert SW. Role of RUNX family members in transcriptional

- repression and gene silencing. *Oncogene*, 2004. 23(24): p. 4220-4.
- ^{340.} **Xu XL**, Yu J, Zhang HY, *et al.* Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, 2004. 10(23): p. 3441-54.
- ^{341.} **Cao QJ**, Einstein MH, Anderson PS, *et al.* Expression of COX-2, Ki-67, cyclin D1, and P21 in endometrial endometrioid carcinomas. *Int J Gynecol Pathol*, 2002. 21(2): p. 147-54.
- ^{342.} **Joe AK**, Memeo L, McKoy J, *et al.* Cyclin D1 overexpression is associated with estrogen receptor expression in Caucasian but not African-American breast cancer. *Anticancer Res*, 2005. 25(1A): p. 273-81.
- ^{343.} **Milde-Langosch K**, Bamberger AM, Goemann C, *et al.* Expression of cell-cycle regulatory proteins in endometrial carcinomas: correlations with hormone receptor status and clinicopathologic parameters. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001. 127(9): p. 537-44.
- ^{344.} **Biankin AV**, Kench JG, Morey AL, *et al.* Overexpression of p21(WAF1/CIP1) is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res*, 2001. 61(24): p. 8830-7.
- ^{345.} **Piestrzeniewicz-Ulanska D**, Brys M, Semczuk A, *et al.* TGF-beta signaling is disrupted in endometrioid-type endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol*, 2004. 95(1): p. 173-80.
- ^{346.} **Gutman A**, Wasyluk B. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *Embo J*, 1990. 9(7): p. 2241-6.
- ^{347.} **Zheng K**, Nagai Y, Kishimoto T, *et al.* A quantitative evaluation of active gelatinolytic sites in uterine endometrioid adenocarcinoma using film in situ zymography: association of stronger gelatinolysis with myometrial invasion. *Jpn J Cancer Res*, 2002. 93(5): p. 516-22.
- ^{348.} **Aglund K**, Rauvala M, Puistola U, *et al.* Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer-MMP-9 correlates to the grade and the stage. *Gynecol Oncol*, 2004. 94(3): p. 699-704.



RELACIÓ DE FABRICANTS CITATS

RELACIÓ DE FABRICANTS CITATS

Abcam, Ltd. (Cambridge, Regne Unit) <http://www.abcam.com/>
Adobe Systems, Inc., (Sant Jose, CA) <http://www.adobe.com/>
Agilent (Palo Alto, CA) <http://www.agilent.com/>
Apple (Cupertino, CA) <http://www.apple.com/>
Applied Biosystems (Foster City, CA) <http://www.appliedbiosystems.com/>
American Type Culture Collection,(ATCC) (Manassas, VA) <http://www.atcc.org/>
BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA) <http://www.bdbiosciences.com/clontech.shtml>
Beecher Instruments (Silver Spring, MD) <http://www.beecherinstruments.com/>
Better Light, Inc. (San Carlos, CA) <http://www.betterlight.com/>
Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA) <http://www.bio-rad.com/>
DAKO Cytomation (Glostrup, Dinamarca) <http://www.dakocytomation.com/>
Eppendorf AG (Hamburg, Alemanya) <http://www.eppendorf.com/>
ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA) <http://www.mpbio.com/>
Incyte Genomics, Inc. (Palo Alto, CA) <http://www.incyte.com/>
Invitrogen (Carlsbad, CA) <http://www.invitrogen.com/>
Invitrogen/Gibco (Carlsbad, CA) <http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9371>
Kodak Co. (Rochester, NY) <http://www.kodak.com>
Lab Vision-Neomarkers (Fremont, CA) <http://www.labvision.com/>
Leica (Wetzlar, Alemanya) <http://www.leica.com/>
Life Technologies, Inc. (Rockville, MD) <http://www.lifetech.com/>
Macromedia, Inc., (San Francisco, CA) <http://www.macromedia.com/>
MCLAB (San Francisco, CA) <http://www.mclab.com/>
Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ) <http://www.merck.com/>
Microsoft Corp. (Redmond, OR) <http://www.microsoft.com/>
Millipore Corp. (Bedford, MA) <http://www.millipore.com/>
Morph Viewer /Krebs & Gerstein (New Haven, CT) <http://www.molmovdb.org>
Nalge Nunc Intl. (Rochester, NY) <http://nalgenelab.nalgenunc.com/>
PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Inc (Bòston, MA) <http://www.perkinelmer.com/>
PerkinElmer/NEN (Boston, MA) <http://las.perkinelmer.com/About+Us/PKI+Heritage/NEN.htm>
Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) <http://www.piercenet.com/>
Promega Biosciences, Inc (Madison, WI) <http://www.promega.com/>
Protein Explorer/Eric Martz (Amhest, MA) <http://www.proteinexplorer.org/>
Protein Morpher/Eric Martz (Amhest, MA) <http://www.umass.edu/microbio/chime/morpher>
Olympus (Hanburg, Alemanya) <http://www.olympus.com/>

Qiagen (Hilden, Alemanya) <http://www1.qiagen.com/>

Roche Molecular Biochemicals, Inc. (Basel, Suïssa) <http://www.roche-applied-science.com/>

Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) <http://www.scbt.com/>

SC Johnson Co., (Racine, WI) <http://www.saranbrands.com/>

Savant Instruments Inc., (Holbrook, NY) <http://www.savec.com/>

Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO) <http://www.sigma-aldrich.com/>

Statistical Package for Social Science, Inc. (Chicago, IL) <http://www.spss.com/>

Stratagene, Inc. (La Jolla, CA) <http://www.stratagene.com/>

SWISS-MODEL/Schwede, Peitsch & Guex (Basel, Switzerland) <http://swissmodel.expasy.org>

Wallac (Turku, Finlàndia) <http://www.ump.com/Wallac/wallac.html/>



Article publicat a la revista científica americana Cancer Research:

Planagumà J, Díaz-Fuertes M, Gil-Moreno A, Abal M, Monge M, García A, Baró T, Thomson TM, Xercavins J, Alameda F, Reventós J. **A differential gene expression profile reveals overexpression of RUNX1/AML1 in invasive endometrioid carcinoma.**

Cancer Res. 2004 Dec 15;64(24):8846-53.

A Differential Gene Expression Profile Reveals Overexpression of *RUNX1/AML1* in Invasive Endometrioid Carcinoma

Jesús Planagumà,¹ María Díaz-Fuertes,¹ Antonio Gil-Moreno,^{2,6} Miguel Abal,¹ Marta Monge,¹ Angel García,³ Teresa Baró,⁴ Timothy M. Thomson,^{1,5} Jordi Xercavins,^{2,6} Francesc Alameda,^{4,6} and Jaume Reventós^{1,6}

¹Unitat de Recerca Biomèdica, Institut de Recerca del Hospital Universitari Vall d'Hebron; ²Unitat de Ginecologia Oncològica, Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron; ³Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Vall d'Hebron; ⁴Servei d'Anatomia Patològica, Hospital del Mar; ⁵Instituto de Biología Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas; and ⁶Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Endometrial carcinoma is the most common gynecological malignant disease in industrialized countries. Two clinicopathological types of endometrial carcinoma have been described, based on estrogen relation and grade: endometrioid carcinoma (EEC) and non-EEC (NEEC). Some of the molecular events that occur during the development of endometrial carcinoma have been characterized, showing a dualistic genetic model for EEC and NEEC. However, the molecular bases for endometrial tumorigenesis are not clearly elucidated. In the present work, we attempted to identify new genes that could trigger cell transformation in EEC. We analyzed the differential gene expression profile between tumoral and nontumoral endometrial specimens with cDNA array hybridization. Among the 53 genes for which expression was found to be altered in EEC, the acute myeloid leukemia proto-oncogene, *RUNX1/AML1*, was one of the most highly up-regulated. The gene expression levels of *RUNX1/AML1* were quantified by real-time quantitative PCR, and protein levels were characterized by tissue array immunohistochemistry. Real-time quantitative PCR validated *RUNX1/AML1* up-regulation in EEC and demonstrated a specific and significantly stronger up-regulation in those tumor stages associated with myometrial invasion. Furthermore, tissue array immunohistochemistry showed that *RUNX1/AML1* up-regulation correlates to the process of tumorigenesis, from normal atrophic endometrium to simple and complex hyperplasia and then, on to carcinoma. These results demonstrate for the first time the up-regulation of *RUNX1/AML1* in EEC correlating with the initial steps of myometrial infiltration.

INTRODUCTION

Endometrial carcinoma is among the most common gynecological malignancies in industrialized countries (1). Two clinicopathological types of endometrial carcinoma have been described: type I, endometrioid carcinoma of the endometrium (EEC) and type II, non-endometrioid carcinoma (NEEC). EEC tumors are low-grade and estrogen-related, and they usually develop in peri- and early postmenopausal women. They coexist with or are preceded by complex and atypical endometrial hyperplasia. They usually have a favorable prognosis when treated with appropriate therapy. In contrast, NEECs are high-grade tumors, unrelated to estrogen exposure, which usually develop in older, postmenopausal women and which are not preceded by complex and atypical endometrial hyperplasia (2). NEECs usually present metastasis at the time of diagnosis and often recur, despite aggressive treatment. Among histologic types, the most common

endometrial carcinoma corresponds to endometrioid carcinoma of the uterine corpus (EEC) with an incidence of 80% (3).

Some of the molecular events that occur during the development of endometrial carcinoma have been characterized in part, but its molecular pathogenesis is still poorly understood. Among the few genetic alterations that have been recently identified in EEC (3–5), we should consider (a) microsatellite instability (MSI), frequently associated with mismatch repair deficiency, mutations, and hypermethylation on the *MLH1*, *MSH2*, and *MSH6* mismatch repair genes (6–8); (b) mutations in the tumoral suppressor gene, *PTEN*, reported to be involved in the regulation of focal adhesion, cellular migration, and tumor cell proliferation (9, 10); (c) mutations in the *k-RAS* oncogene, involved in cellular proliferation and closely associated with MSI and hypermethylation (11, 12); and (d) mutations in the *β-catenin* gene, which have been related to tumor progression (13, 14). On the other hand, NEEC tumors often present mutations in the *p53* gene (14, 15), as well as *HER-2/neu* amplification (16), and the loss of heterozygosity, reported for a large number of chromosomes, including 3p, 10q, 17p and 18p (17, 18). Nevertheless, these molecular alterations are not present in most cases.

In view of the above inconclusive findings and the poor correlation between genotype and phenotype in EEC, we attempted, in the present work, to identify new genes, which could trigger cell transformation in EEC. For this purpose, we analyzed the differential gene expression profile between tumoral and nontumoral endometrial specimens by using cDNA array hybridization. Among the 53 genes, for which expression was found altered in EEC, the acute myeloid leukemia proto-oncogene *RUNX1/AML1* was the most highly up-regulated. The gene expression levels of *RUNX1/AML1* were quantified by real-time quantitative PCR and were characterized by tissue array immunohistochemistry. Our results suggest that *RUNX1/AML1* plays a role in the process of myometrial infiltration.

MATERIALS AND METHODS

Patient Population and Tissue Specimens

Tumor Samples. In this study, we included a group of patients who underwent surgery for endometrial carcinoma at the Departments of Gynecological Oncology at both the Hospital Vall d'Hebron and the Hospital del Mar in Barcelona, Spain (Tables 1 and 2). Patients ranged from 50 to 80 years of age. None of the patients had received radiation and/or hormonal therapy or chemotherapy treatment before surgery. The protocol was previously approved by the Institutional Review Boards, and informed consent was obtained from all of the patients involved in the study. Each tissue sample was stored at –80°C and was paraffin-embedded until analysis.

Control Samples. We collected nonaffected endometrial epithelium (atrophic endometrium) from the same patients. We also collected endometrial curettage samples from healthy premenopausal women (normal proliferative endometrium). Briefly, healthy endometrial curettages of late proliferative endometrium were cultured in DMEM-10% fetal bovine serum (Life Technologies, Inc., Paisley, United Kingdom) at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Primary cultures allowed epithelial cells to proliferate and reduce the stromal fraction to the minimum. Cell cultures were then tested by fluorescent immu-

Received 6/11/04; revised 9/1/04; accepted 10/15/04.

Grant support: Supported in part by the Institut Català de la Salut and the Fondo de Investigaciones Sanitarias (grants FIS 98/0897 and FIS 02/0733). J. Planagumà is a recipient of a fellowship from the Ministerio de Sanidad y Consumo (BEFI 02/9366), and M. Abal, is a recipient of a postdoctoral fellowship from the Institut de Recerca del Hospital Universitari Vall d'Hebron.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Note: F. Alameda and J. Reventós have contributed equally to this work.

Requests for reprints: Jaume Reventós, Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, 14th floor, Pg. de la Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Fax: 34-93-4894064; E-mail: jreventos@vhebron.net.

©2004 American Association for Cancer Research.

nocytochemistry assays for CK19 epithelial antigen (Abcam, Cambridge, United Kingdom), at 1:100 dilutions, as a control for epithelial cells.

RNA Extraction and Integrity Analysis

Total RNA was extracted with the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the instructions provided by the manufacturer. For the cDNA array hybridization, mRNA from the total RNA was purified with the Oligotex Kit (Qiagen). The RNA Nano Lab Chip kit (Agilent, Palo Alto, CA) was used to determine the purity of the isolated total RNA. To determine the integrity of the mRNA, Northern blot analysis was performed, according to standard procedures (19), with a 4-kb *KIAA0675* probe.

cDNA Array Hybridization

Hybridizing Samples. RNAs for hybridization were prepared under the following conditions: (a) atrophic endometrium: a pool of 16 mRNA samples from atrophic endometrium, taken from postmenopausal women and collected at the time of surgery, was generated to obtain gene expression levels in an atrophic context; (b) proliferative endometrium: a normal endometrial pool was generated from four primary cultures taken from proliferate, healthy endometrium, to assess expression levels in a proliferative context; and (c) four dilutions of mRNA, obtained from EECs, as previously described (see details of samples in Tables 1 and 2) were selected.

Probe Synthesis and Hybridization on cDNA Arrays. The 10 × 21 cm nylon membrane cDNA array chip LifeGrid (Incyte Genomics, Inc., Palo Alto, CA) contains 8,345 clones that have been printed in duplicate to assess reproducibility. Messenger RNA (0.5 μg) from the sample collection and 0.5 μg of mRNA from the Universal Human Reference RNA (LifeGrid 1.0.Kit, Incyte Genomics, Inc.), used as a hybridization control, were used to amplify double-strand cDNA. Synthesis was accomplished by oligo(dT) primer, with M-MLVRT retrotranscriptase (200 units/mL; Incyte Genomics, Inc.) at 42°C for 2 hours. The cDNA from endometrial samples were radioactively labeled, including P33 dCTP (2,000–4,000 Ci/mmol) in the reaction mix (New England Nuclear, Boston, MA). Two microliters of each sample were analyzed in a liquid scintillation counter 1410 (Wallac, Turku, Finland) to assess the radioactive incorporation within the probe (up to 25%). Probes were then denatured for 3 minutes at 95°C. Hybridization was performed in 4× SSC, 1× bovine serum albumin, 2 μg/mL DNAs, and 0.1% SDS at 42°C for 16 hours. Slides were washed twice for 30 minutes at 68°C with 2× SSC, 1% SDS and 2× SSC, 0.6% SDS (Sigma, Steinheim, Germany) and were dried and then scanned in a PhosphorImager (Personal Molecular Imager FX, Bio-Rad, Hercules, CA) to obtain high resolution images, which were then quantified with the Molecular Dynamics Storm & Array Vision Software (Incyte Genomics, Inc.).

Data Analysis. Radioactive intensity measurements from each array element were compared with the median of local background, and the elements with values less than this median were excluded. Furthermore, for statistical analysis, we excluded elements with a correlation rate outside of 0.4 to 2.5. After these filters were applied, a total of 1,064 spots were evaluated. The expression ratios for the duplicated spots on the array were averaged. Furthermore, the ratios between atrophic endometrium and the other samples were calculated. We selected genes with expression levels that differed by a factor of at least 0.75- to 1.25-fold with respect to the reference sample (the atrophic pool). The significance for expression differences was computed by the *F* test of the two-tail test ($P < 0.05$), and after this analysis, we obtained a total of 53 genes. This group of selected genes showed a significant variation in expression levels across the patient samples and ensured that the genes considered showed relevant differences with respect to the pool. Therefore, the genes considered can be regarded as effectively repressed or overexpressed.

Hierarchical Clustering. The set of differentially expressed genes was clustered by the similarity of their expression profiles. The Gene-cluster program was used for hierarchical clustering analysis (<http://microarray.nhgri.nih.gov/genecluster>).⁷ Using the Pearson's correlation rate, we hierarchically arranged genes in function of their expression levels. The cluster was color coded, with red for up-regulation from atrophic endometrium and green for down-regulation.

Quantitative Real-time PCR

Quantitative real-time PCR (TaqMan, Applied Biosystems, Foster City, CA) technology was used, to validate the differential expression of selected genes. Analysis was performed with the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System Instrument and software (Applied Biosystems), with the manufacturer's conditions [52°, 2 minutes; 95°, 10 minutes (95°, 15 seconds; 60°, 1 minute, for 50 cycles)]. The sequence of oligonucleotides and the TaqMan probe used for the analysis of *RUNX1/AML1* were obtained with the Assays-on-Demand Applied Biosystems database (ref. Hs00231079 m1). The endogenous control, eukaryotic 18S rRNA (ref. C6 4308329; Applied Biosystems), was used to normalize variations in cDNA quantities from different samples. Each reaction was performed in triplicate with cDNA dilution from the atrophic pool (16 samples), cDNA dilution from the proliferative, healthy pool as calibration samples, and also, 30 cDNA dilutions of EEC. SDs, in triplicate, up to 0.380 were not accepted. All of the reactions were repeated at least twice. The quantity of target and endogenous reference was determined from a standard curve for each experimental sample. The standard curve was constructed, in each of the experimental repetitions, by 5-fold serial dilutions of cDNA 1, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, and 1:1,000. Standard curves not adjusted to 3.32 (± 0.1) were not accepted. The comparative standard curve and threshold cycle (*C_t*) method was used to calculate the amplification factor.

Western Blot

Nonaffected endometrial epithelium (atrophic endometrium) and tumor samples (EEC) from the same patients coded 13, 14, 15 in Table 2, were lysed and the supernatant boiled in Laemmli buffer. Samples were resolved on 12% SDS-PAGE gels, transferred onto a Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA), and incubated overnight at 4°C with primary antibodies (1:1000 pAb α-*RUNX1/AML1*, ab11903, Abcam Ltd., Cambridge, United Kingdom; 1:400 mAb α-actin, Lab Vision-Neomarkers, Fremont, CA). Proteins were revealed with horseradish peroxidase-conjugated antibodies (DAKO, Glostrup, Denmark) and the SuperSignal West Dura substrate (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

Tissue Microarray

Tissue microarray immunohistochemistry was used to confirm the differential protein expression of *RUNX1/AML1*. We constructed three different tissue microarrays, namely atrophic, simple and complex hyperplasia, and EEC. Paraffin-embedded tissue samples were obtained from the Departments of Pathology from two institutions, Hospital Vall d'Hebron and Hospital del Mar. Representative areas from 74 endometrioid cancers (including 3 samples of stage IA, 29 of stage IB, 20 of stage IC, 7 of stage IIA, 6 of stage IIB, 6 of stage IIIA, and 1 of stage IIIB), 30 complex hyperplasias, 30 simple hyperplasias, and 15 atrophic endometria were carefully selected. Samples were hematoxylin-and-eosin-stained in sections and were marked on individual paraffin blocks. Two tissue cores of 1 mm in diameter were obtained from each paraffin block. The tissue cores were precisely arrayed in a new paraffin block, with a tissue microarray workstation MTA-1 (Beecher Instruments, Silver Spring, MD). Sections of 5 μm were obtained from all tissue microarray paraffin blocks.

RUNX1/AML1 was detected by indirect immunoperoxidase assay in the 5-μm paraffin-embedded sections, treated with heat in citrate buffer for antigen retrieval. Endogenous peroxidase activity was quenched with 3% H₂O₂; sections were incubated with the primary antibody against the NH₂-terminal *RUNX1/AML1* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 1 hour at a 1:50 dilution and were washed and were thereafter incubated with peroxidase-conjugated rabbit anti-goat immunoglobulin (EnVision, DAKO). Subsequently, sections were washed, and reactions were developed with diaminobenzidine, followed by counterstaining with hematoxylin. Quantitative and qualitative evaluation for *RUNX1/AML1*-positive immunostaining was performed by three independent investigators (J.P., M.D., and F.A.) by counting the number of positive cells and the number of total cells per a 1-mm core diameter (×400). Whenever a difference between the three assessments occurred, the slides were reviewed jointly, and a consensus was reached. The quantity of positive immunostaining was evaluated as follows: 0 = negative, 1 = low, 2 = medium, and 3 = high.

⁷ Internet address: <http://microarray.nhgri.nih.gov/genecluster>.

Statistical Analysis

Statistical comparisons were performed with the Statistical Package for Social Science 11.5 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

cDNA Array Hybridization Statistical Data Analysis. The significance of the different expression values was computed by the *F* test of the two-tail test ($P < 0.05$).

Quantitative Real-time PCR Statistical Data Analysis. The expression level values in the pathological samples were distant from a normal distribution; therefore, different comparisons were analyzed with the nonparametric statistics *U* from Mann–Whitney. The significant value level was adjusted for multiple comparisons analysis with Bonferroni's Method to reach the type I error, ≤ 0.05 .

Tissue Microarray Statistical Data Analysis. Comparisons between different groups of samples were analyzed with the nonparametric statistics *U* from Mann–Whitney. The significant value level was adjusted for multiple comparisons analysis with Bonferroni's Method to reach the type I error, ≤ 0.05 .

RESULTS AND DISCUSSION

During fertile life, the endometrium is a permanently changing tissue, because of hormone level variations that occur in female physiology. It is known that the levels of ovarian steroids, as well as the levels of their receptors, can influence gene expression in the endometrium. Nevertheless, endometrial carcinoma presents mainly after menopause has occurred. It is the result of the transformation of normal epithelial cells following an evolutionary pathway, which includes, first, simple hyperplasia and, then, complex hyperplasia, before the cells finally reach the definitive characteristics of cancer. Previous analyses with microarray technology have focused on characterizing gene expression into different EEC histiotypes (20), but they have never studied expression profiles in simple and complex hyperplasias and in atrophic endometrium. As mentioned earlier, the molecular events that occur during the development of endometrial carcinoma, including microsatellite instability, DNA-altered methylation, as well as PTEN, K-Ras, and β -catenin status, are numerous, but none of them fully explains the cell transformation that takes place (6). To identify new molecular markers that may be responsible for the cell transformation of normal endometrial tissue into simple and complex hyperplasias and carcinoma, we have used microarray technology to study gene expression profiles in the above-mentioned specimens.

Analysis of the Differential Gene Expression Profiles for Tumoral and Normal Endometrium by cDNA Array. We used cDNA arrays containing 8,345 probes, most of which corresponded to known genes. Comparison of gene expression levels was made by hybridizing cDNA from four EECs and two pools of normal atrophic endometrium and normal proliferative endometrium (see Materials and Methods and Table 1). These two pools were designed to obtain a mean for gene expression levels, in both nontumoral postmenopausal and nontumoral premenopausal conditions, respectively. To avoid differential gene expression due to hormonal status, samples of normal, late-proliferative endometrium were selected from the same day of the menstrual cycle. To eliminate false positives, genes having

expression levels as high as 1.25 or as low as 0.75, when normal proliferative endometrium was compared with atrophic endometrium, were discarded, because they were considered to be involved in the normal menstrual proliferative process. Differential gene expression values, ranging up to 1.25 or down to 0.75, were selected from the ratio between each analyzed EEC with respect to atrophic endometrium, and these were assumed as basal levels. After array processing and scanning, 53 cDNA sequences were found to be significantly altered ($P < 0.05$), corresponding to 0.635% of the total array (Fig. 1).

The hierarchical sample cluster reflected differences between histiotypes, showing three major branches. One represented normal proliferative endometrium (*B/A*; Fig. 1, orange in the upper hierarchical tree). Stage I EEC (*C/A*, *D/A*, *E/A*; Fig. 1, blue in the upper hierarchical tree) comprised a second branch, and a third one corresponded to stage II EEC (*F/A*; Fig. 1, black in the upper hierarchical tree). This analysis indicates that the gene expression patterns between EEC samples were somewhat variable, as expected, although differences were statistically significant enough to allow them to cluster into their respective histiotypes. This suggests that the different gene expression profile of each histiotype may reflect the evolution of the tumoral staging and the process of tumorigenesis in endometrial cancer.

On the other hand, the hierarchical gene cluster also showed two main branches, reflecting both the down- (*green branch in the left hierarchical tree* in Fig. 1) and the up-regulated (*red branch in the left hierarchical tree* in Fig. 1) genes in the EECs compared with atrophic endometrium. A third branch was also observable, including the genes having variable expression levels among the EEC samples. Furthermore, the two main groups of clustered genes showed two subgroups, depending on the expression levels among the high- and low-stage histiotypes. These subgroups included the down- or up-regulated genes in all of the analyzed histiotypes (genes 1–7 and 51–53 in Fig. 1), and also the down- or up-regulated genes in stage I EECs with respect to stage II EECs, in addition to atrophic endometrium (genes 8–29 and 37–50 in Fig. 1). The gene cluster analysis allowed us to identify a subset of 53 genes, significantly altered in EEC. Among these, 47 cDNA sequences were identified as known genes, and were classified into seven functional categories: 9% were involved in cell cycle regulation and cellular proliferation (*i.e.*, *DNAJA2*, *RPS4X*), 17% were involved in transcriptional regulation (*i.e.*, *SNAPC1*, *TCEB3*). 21% were involved in signaling (*i.e.*, *ADD3*, *NPTX1*), 6% were involved in traffic (*i.e.*, *NCALD*), 8% in the immune response (*i.e.*, *SIATI*), 9% corresponded to membrane proteins (*i.e.*, *MS4A6*), and finally, 19% of the genes were involved in the cellular metabolism (*i.e.*, *BTN2A1*).

Among the most up-regulated of the genes, *RUNX1/AML1* was of special interest, because it is an oncogene, largely described to be related to acute myeloid leukemia. The *RUNX1/AML1* gene (runt-related transcription factor 1/acute myeloid leukemia 1), a chromosome 21q22.3 hematopoietic regulator, is frequently translocated in leukemia (21). Its main translocations include *AML1-ETO* in t[8;21], *CBF β -SMMHC* in inv[16], *AML1-Evi-1* in t[3;21], and *TEL-AML1* in t[12;21] (22). *RUNX1/AML1* plays an important role in regulating the expression of many genes involved in hematopoietic cell development, and the impairment of *RUNX1/AML1* function deregulates the pathways leading to cellular proliferation and differentiation (23). A stimulatory role of *RUNX1/AML1* in G_1 -S phase transition has already been demonstrated by Bernardin and Friedman (24). In their study, the stimulation of G_1 also induced apoptosis in 5 to 10% of the cells examined, an effect consistent with excessive G_1 stimulation (24). These authors also indicated that *RUNX1/AML1* activates the transcription of one or more genes, critical to the G_1 -S phase transition via its COOH-terminal transactivational domain. Inactivation of

Table 1 cDNA array analysis

Code	Sample	Type	Characteristics	mRNA hybridization
A	Normal	AE	Postmenopausal	Pool of 16 samples
B	Normal	NPE	Premenopausal	Pool of 4 samples
C	Tumoral	EEC	Stage IA, G2	Single sample
D	Tumoral	EEC	Stage IA, G1	Single sample
E	Tumoral	EEC	Stage IA, G2	Single sample
F	Tumoral	EEC	Stage IIB,G3	Single sample

Abbreviations: AE, atrophic endometrium; NPE, normal proliferative endometrium.

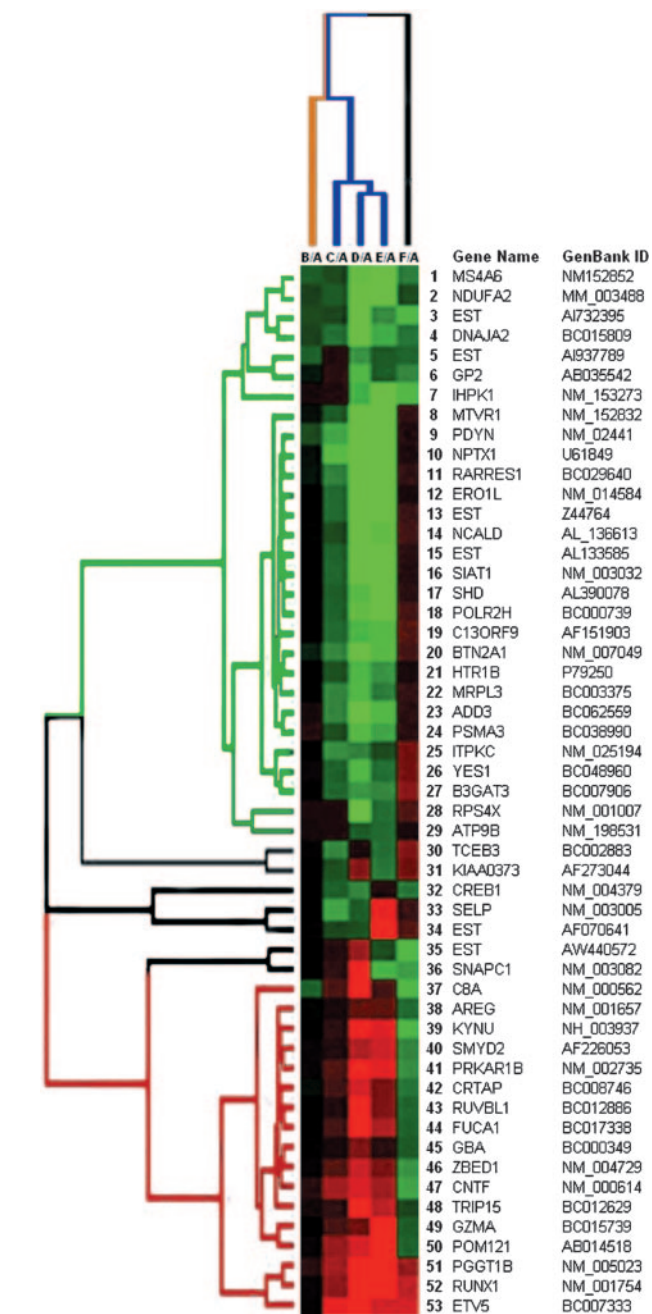


Fig. 1. Gene cluster analysis. Gene expression values for the indicated genes are represented against the ratio between EEC or normal proliferative endometrium versus the calibration pool (atrophic endometrium). Rows, 53 sequences, corresponding to 4 described genes; columns, the different samples analyzed and coded: code A, atrophic endometrium; code B, normal proliferative endometrium; code C, endometrioid endometrial carcinoma (EEC) stages IA/G2; D, EEC stages IA/G1; code E, EEC stages IA/G2; code F, EEC stages IIB/G3 (ratios: B/A, C/A, D/A, E/A, F/A). Red, a high relative level of expression; green, a low relative level of expression in the analyzed samples compared with atrophic endometrium. Dark levels, ratios close to 1; this is especially significant between B and A, to discriminate genes involved in the normal menstrual proliferative process. Across the top of the gene expression diagram, a hierarchical sample cluster diagram; clustering on the left side, a hierarchical gene cluster.

RUNX1/AML1 in acute leukemia is expected to slow proliferation, unless additional genetic alterations coexist, which accelerate G_1 (24). Point mutations of the *RUNX1/AML1* gene present in the region, encoding the Runt domain, cause the loss of DNA-binding ability (25). Moreover, overexpression of the *RUNX1/AML1* proto-oncoprotein in NIH3T3 cells has been shown to induce neoplastic transformation, depending on the DNA-binding and transactivational po-

tencies (26). From the *RUNX1/AML1* gene, two representative forms of proteins, *a* and *b*, are generated by alternative splicing. Both forms have the runt homology domain, possessing the DNA-binding ability, but only the *b* form causes neoplastic transformation (26). It is not known whether this occurs in endometrial carcinogenesis. Additional experiments are required to assess such a hypothesis. Finally, Ramaswamy *et al.* (27), characterized *RUNX1/AML1* as one of the 17 genes associated with a molecular signature for metastasis in adenocarcinomas of different origins, including cancer of the uterus, the breast, and the ovaries. Even though endometrial cancer is easily detectable and late stages are becoming more and more rare, it is still unknown whether *RUNX1/AML1* expression participates in endometrial metastatic dissemination.

Real-time Quantitative PCR Characterization of *RUNX1/AML1*. To validate the cDNA microarray data, we examined the expression levels of the *RUNX1/AML1* gene in a panel of 30 EECs, with TaqMan real-time quantitative PCR. Moreover, this panel was composed of tumors, ranging from low infiltrating stage IA to highly invasive stage IIIA (see Materials and Methods and Table 2). This allowed us not only to validate the up-regulation of *RUNX1/AML1* in EEC, but also to characterize the distribution of gene expression levels, depending on tumor stage. *RUNX1/AML1* expression was normalized against atrophic endometrium and normal proliferative endometrium calibration samples (see Materials and Methods).

As shown in Fig. 2, *RUNX1/AML1* was clearly up-regulated in the EECs analyzed, both when normalized against atrophic endometrium (Fig. 2A) and when normalized against normal proliferative endometrium (Fig. 2B). Furthermore, when one assumes that the mean and the SD values obtained from the calibration samples define these populations better and that they should have fit into a normal distribution, with those values distant from the mean ± 1.96 SD considered atypical, *RUNX1/AML1* was also found to be significantly up-regulated (Fig. 2C).

Interestingly, among all of the up-regulated samples, the higher

Table 2. Quantitative real-time PCR analysis

Code	Sample	Type	Characteristics	cDNA amplification
A	Normal	AE	Postmenopausal	Pool of 16 samples
B	Normal	NPE	Premenopausal	Pool of 4 samples
1	Tumoral	EEC	Stage IA	Single sample
2	Tumoral	EEC	Stage IA	Single sample
3	Tumoral	EEC	Stage IA	Single sample
4	Tumoral	EEC	Stage IA	Single sample
5	Tumoral	EEC	Stage IB	Single sample
6	Tumoral	EEC	Stage IB	Single sample
7	Tumoral	EEC	Stage IB	Single sample
8	Tumoral	EEC	Stage IB	Single sample
9	Tumoral	EEC	Stage IB	Single sample
10	Tumoral	EEC	Stage IC	Single sample
11	Tumoral	EEC	Stage IC	Single sample
12	Tumoral	EEC	Stage IC	Single sample
13	Tumoral	EEC	Stage IC	Single sample
14	Tumoral	EEC	Stage IC	Single sample
15	Tumoral	EEC	Stage IC	Single sample
16	Tumoral	EEC	Stage IC	Single sample
17	Tumoral	EEC	Stage IIA	Single sample
18	Tumoral	EEC	Stage IIA	Single sample
19	Tumoral	EEC	Stage IIB	Single sample
20	Tumoral	EEC	Stage IIB	Single sample
21	Tumoral	EEC	Stage IIB	Single sample
22	Tumoral	EEC	Stage IIB	Single sample
23	Tumoral	EEC	Stage IIB	Single sample
24	Tumoral	EEC	Stage IIB	Single sample
25	Tumoral	EEC	Stage IIB	Single sample
26	Tumoral	EEC	Stage IIB	Single sample
27	Tumoral	EEC	Stage IIB	Single sample
28	Tumoral	EEC	Stage IIB	Single sample
29	Tumoral	EEC	Stage IIB	Single sample
30	Tumoral	EEC	Stage IIIA	Single sample

Abbreviations: AE, atrophic endothelium; NPE, normal proliferative endometrium.

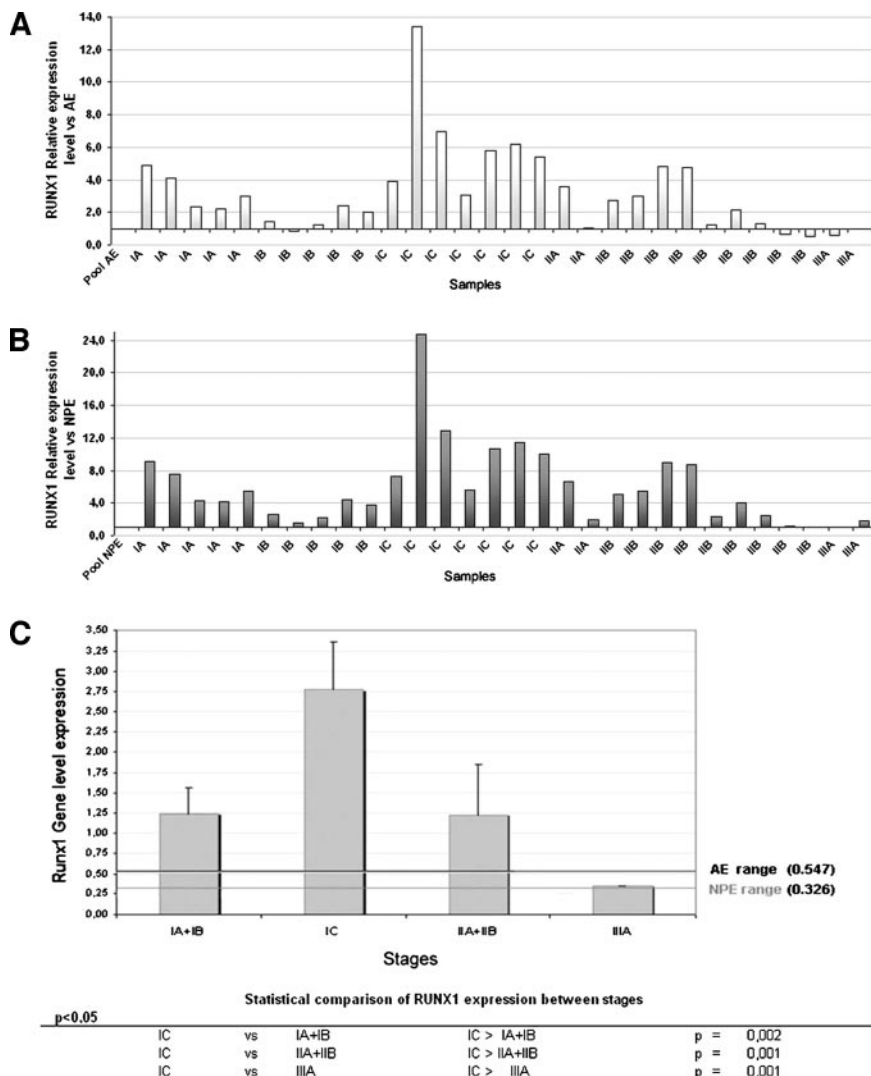


Fig. 2. Real-time quantitative PCR analysis of RUNX1/AML1 in EEC. **A**, RUNX1/AML1 expression levels in a panel of 30 ECCs analyzed and normalized against atrophic endometrium. **B**, RUNX1/AML1 levels in the same samples used in **A**, but normalized against normal proliferative endometrium (NPE). **C**, RUNX1/AML1 levels analyzed in the same samples used in **A**, represented as a mean of the samples, corresponding to the same histiotype: a threshold for altered RUNX1/AML1 expression was established from calibration samples (± 1.96 SD). **D**, Western blot analysis of RUNX1/AML1 protein levels in normal atrophic epithelia (AE) and its corresponding tumoral area (EEC) from three representative IC stage EEC samples analyzed in **A**. Actin protein levels are shown as loading control.

expression levels corresponded to the IC stage, which incorporates tumors with >50% of myometrial infiltration. Values from this tumor stage were found to be significantly elevated, when compared with noninfiltrating IA or to <50% infiltrating IB stages ($P < 0.002$). Moreover, RUNX1/AML1 up-regulation was also detected to a lesser degree in samples with stages II and III ($P < 0.001$), corresponding to tumors affecting the cervix, but not necessarily being infiltrating myometrium. Finally, the fact that the real-time quantitative PCR expression profile was similar, both when normalized against atrophic endometrium and when normalized against normal proliferative endometrium, reflects that the up-regulation found in RUNX1/AML1 was not dependent on the proliferative status of the endometrium. This validates the conditions imposed in the cDNA microarray analysis to

specifically select for genes up-regulated in EEC and confirms the up-regulation of this gene.

RNA levels, demonstrating the up-regulation of RUNX1/AML1 in EEC, correlated with protein levels as shown by Western blotting performed with representative samples from the panel of EECs used for the real-time quantitative PCR characterization (Fig. 2D). Tumor area from the selected samples corresponding to stage IC EEC (samples coded 13, 14, 15; see Table 2) was compared with its respective atrophic atrophic endometrial area obtained from the same patient (see Materials and Methods). Increased RUNX1/AML1 protein levels were reproducibly found in the different tumor samples analyzed when compared with their corresponding normal atrophic endometrium epithelia (Fig. 2D).

Analysis of RUNX1/AML1 Protein Expression Level by Tissue Array Technology. To further characterize RUNX1/AML1 expression at the protein level, we prepared tissue microarrays, including atrophic endometrium, simple and complex hyperplasias, as well as endometrioid endometrial carcinoma (EEC) specimens. The tissue arrays allowed us to characterize RUNX1/AML1 protein levels in a wide variety of samples, representative of the most relevant tissue contexts found in postmenopausal patients with endometrial pathologies.

In normal atrophic endometrium, the nuclei of epithelial endometrial cells were found negative for RUNX1/AML1 labeling. Staining of the cytoplasm in the epithelium of atrophic-cystic glands was also negative but was focally and faintly positive in some multilayered glands, mainly in the perinuclear and apical areas. Surface epithelium showed a similar pattern (see further ahead on Fig. 4). Concerning EEC, an example of 35 samples, spotted in a tissue array and labeled for hematoxylin and eosin, is illustrated in Fig. 3. A 4× and 10× magnification of one of these spots, immunostained for RUNX1/AML1 and corresponding to a representative EEC, showed RUNX1/AML1 labeling in the epithelial glands and completely negative staining in the stromal compartment. The negative staining of RUNX1/AML1 in the stromal compartment increases the significance of the RUNX1/AML1 results obtained, because they are specific to the epithelial cells and obviate a possible stromal contribution within the different samples analyzed in the original cDNA micro-array screenings. A 60× magnification showed a major cytoplasmic staining of RUNX1/AML1, with additional punctuate, nuclear staining in some cells (Fig. 3). The striking cytoplasmic labeling found for this transcription factor might suggest the existence of a pool of the protein that eventually translocates to the nucleus, in which it is expected to exert its function. The specificity of this staining was verified by green fluorescence protein-RUNX1/AML1 transfection on an EEC cell line and immunocolocalization by confocal microscopy (data not shown). On the other hand, the nuclear labeling could

reinforce the possible role of the up-regulated RUNX1/AML1 as a transcription factor in endometrial carcinoma. RUNX1/AML1 belongs to the transcription factor protein family characterized by the Runt domain, and is responsible for both DNA binding and heterodimerization with its partner protein, PEBP2 β /CBF β (28, 29). The function of RUNX1 as a transcription factor differs, depending on its interaction with different types of cofactors. On one hand, RUNX1/AML1 functions as a transcriptional activator of hematopoiesis-related genes, by interacting with the histone acetyltransferase coactivator, p300/CBP (30). On the other hand, RUNX1/AML1 can also behave as a transcriptional repressor, through its interaction with a corepressor (31). Harrington *et al.* (32) conducted a study in which RUNX1/AML1 was localized within the nucleus and was found to punctuate foci that are involved in transcriptional control and which associate with the subnuclear scaffold, designated as the nuclear matrix. The dynamic shuttling of RUNX1/AML1 within living cells to these stabilized foci has been proposed as a component of the mechanism for gene regulation *in vivo* (32). Our results suggest that the shuttling of RUNX1/AML1 between nuclear and cytoplasmic localizations could represent an additional level of regulation in EEC.

In the tissue array, when we compared atrophic endometrium with simple hyperplasia, complex hyperplasia, and EEC cores, we observed a significant gradation in the intensity of RUNX1/AML1 staining. Atrophic endometrium was mainly associated with negative staining, whereas in simple hyperplasia, we could find cores with a RUNX1/AML1 staining, ranging from intensity level 0 to 2 (Fig. 4). No negative staining was found, either in complex hyperplasia or in EEC, and only positive values, ranging in intensity level from 1 to 3 (Fig. 4), were observed. Moreover, when we quantitatively analyzed the intensity of the labeling, we could find significant differences between EEC samples and complex hyperplasia, simple hyperplasia, and atrophic endometrium samples ($P < 0.001$). In EEC, 30% of the samples corresponded to high-level intensity (intensity level 3), whereas only 5% was found to correspond thus in complex hyperpla-

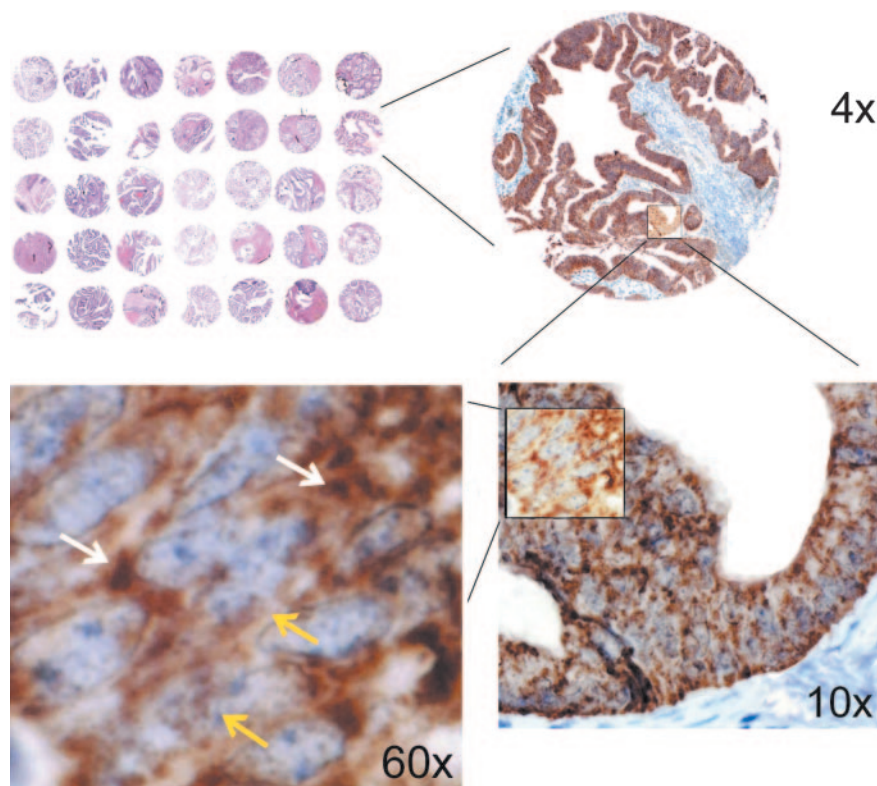


Fig. 3. Endometrial tissue-array for RUNX1/AML1 protein expression. A hematoxylin/eosin image of an EEC tissue-array section, showing 35 cores. $\times 4$ and $\times 10$ magnifications of a representative example of the RUNX1/AML1 immunohistochemistry of one of the cores from the tissue array. There is positive staining in the tumoral epithelium gland, whereas there is negative staining in the stroma. A $\times 60$ magnification of the indicated area shows the intracellular labeling of RUNX1/AML1, with strong cytoplasmic (white arrows) and punctuate, nuclear staining (yellow arrows).

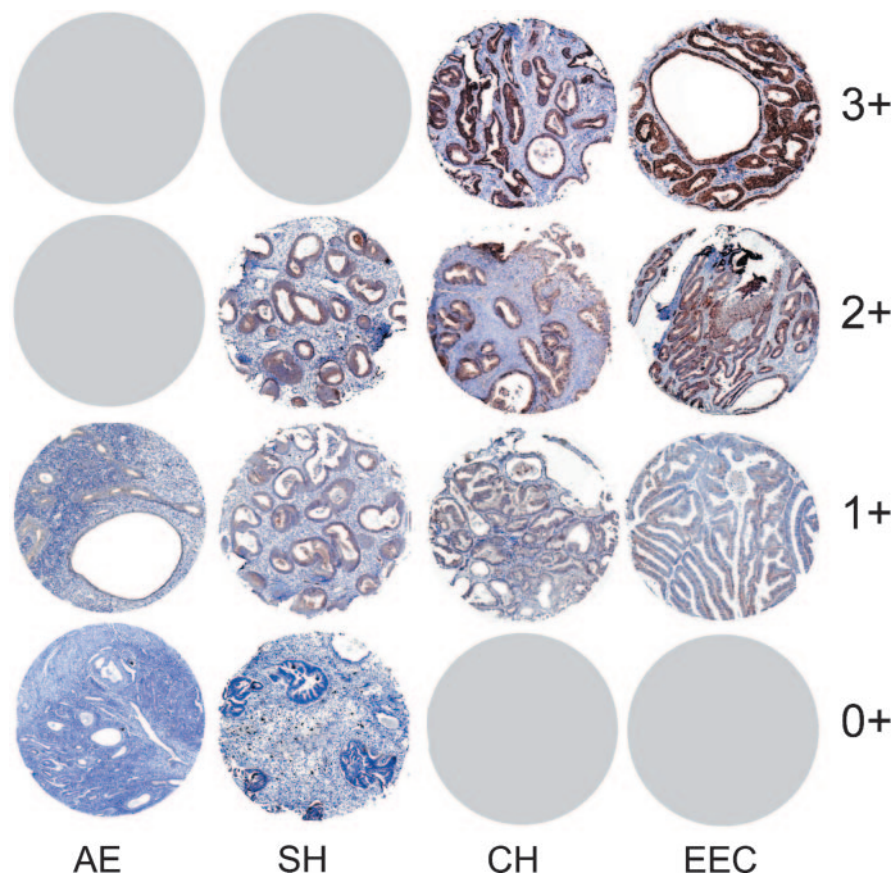


Fig. 4. Representative examples of *RUNX1/AML1* immunohistochemistry intensity gradation (intensity levels 0 to 3), among different types of samples. The intensity of staining correlates to tumorigenesis. *AE*, atrophic endometrium; *SH*, simple hyperplasia; *CH*, complex hyperplasia; *EEC*, endometrioid endometrial carcinoma. *Gray circles*, intensity grades not found in the corresponding types of samples.

sia samples, and 0% in simple hyperplasia and atrophic endometrium samples (Fig. 5). A medium intensity level (intensity level 2) was also found, mainly in the EEC samples (26%), and was found at a lower percentage in complex hyperplasia and simple hyperplasia samples (Fig. 5). A low intensity level (intensity level 1) was mainly associated with hyperplasias, with 85% found in complex hyperplasia samples and 90% in simple hyperplasia samples (Fig. 5). Finally, negative intensity levels (intensity level 0) were practically restricted to atrophic endometrium samples (93%; Fig. 5). Similar results were obtained with antibodies raised against both the NH_2 -terminal and the COOH-terminal part of the protein (data not shown).

These results not only confirm the overexpression of *RUNX1/AML1* in endometrial carcinoma but also describe another level of gradation, already found among tumor stages (see Fig. 2). This gradation corresponds to an increase in *RUNX1/AML1* up-regulation as the process of tumorigenesis progresses from normal atrophic endometrium to simple and complex hyperplasias and, then, on to carcinoma. As a DNA-binding transcription factor, *RUNX1/AML1* could be regulating the expression of genes involved in EEC. *RUNX* family members have been implicated in transcriptional activation by acting as organizing factors at the promoters and enhancers of target genes where they associate with cofactors and other DNA-binding transcription factors that are required for gene regulation (33). Alternatively, *RUNX* proteins are potent repressors of transcription in a cell type-specific manner, resulting in either temporal transcriptional repression or irreversible epigenetic silencing (34). In this context, *RUNX1* has been described to form stable complexes with corepressors as histone deacetylases and histone methyltransferases (35). Moreover, the kinetics of *RUNX1/AML1* expression described in the real-time quantitative PCR sample panel, showing a peak at early myometrial invasion stages, led us to speculate that up-regulation of *RUNX1/*

AML1 in EEC might be associated with promoter methylation as a mechanism of transcriptional silencing of genes involved in the first steps of tumor invasion of adjacent tissue. Finally, *RUNX1/AML1* gene translocations are not excluded from being involved in EEC.

In conclusion, the data presented in this work clearly demonstrate the overexpression of *RUNX1/AML1* and suggest that this gene, classically associated with acute myeloid leukemia, might play a particular function in the initial steps of myometrial infiltration in EEC. Transcriptional regulation of the human osteopontin promoter has been described by *C/EBP α* and *AML1* in metastatic melanoma cancer cells (36). Moreover, the involvement of *CBF/AML* factors in *CD11a/CD18* leukocyte integrin expression was proposed to have been deregulated in acute myeloid and B-lineage, acute lymphoblastic leukemias, thus contributing to their altered adhesion and metastatic potential (37). Concerning the down-regulation of *RUNX1/AML1* present in the molecular signature of metastasis in primary solid tumors (27), we observed that the overexpression of this gene in EEC was specifically associated with the initial steps of myometrial infiltration. The decline in *RUNX1/AML1* expression levels, found in samples corresponding to metastatic stages (Fig. 2), could hold information, regarding the principal role of *RUNX1/AML1* in the promotion of metastasis. We are currently analyzing the possible role of *RUNX1/AML1* in the initiation of tumoral cell invasion and in the promotion of metastasis in endometrial carcinoma.

The strategy presented here, in addition to its contribution to the understanding of the molecular events associated with endometrial tumorigenesis, provides more information on new target genes that could be useful in the diagnosis of this cancer. The fact that this gene could be specifically associated with the initial steps of myometrial infiltration, suggests that it may play a possible role as a new marker for prognosis and also as a new therapeutic target to improve EEC

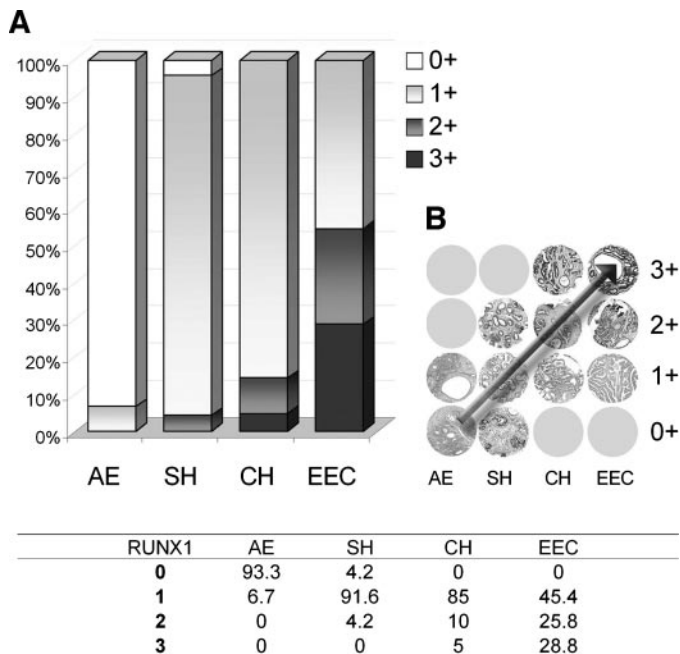


Fig. 5. Quantitative analysis of *RUNX1/AML1*. A. Intensity levels range from 0 (negative staining) to 3 (high intensity staining) for the protein labeling among the different types of samples included in the tissue arrays (see Materials and Methods). AE, atrophic endometrium; SH, simple hyperplasia; CH, complex hyperplasia; EEC, endometrioid endometrial carcinoma. The percentages for tissue array cores with a given intensity range are shown in the corresponding table. B, scheme of Fig. 4, showing the increase in levels of expression throughout the process of tumorigenesis.

outcome. Nevertheless, additional experiments must be conducted, to unravel the mechanism of action for *RUNX1/AML1* in endometrioid endometrial carcinoma.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would also like to thank Drs. J. Vila (Servei d'Estadística, Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques) and Ll. Armadans (Servei de Medicina Preventiva, Hospital Vall d'Hebron) for their help with the statistical analysis of the data. Also, additional thanks go to P. Gallego and M. Valeri (Unitat d'Alta Tecnologia, Institut de Recerca Vall d'Hebrón), and P. García (Servei d'Anatomia Patològica, Hospital del Mar) for their technical assistance, and to Lisa R. Piccione for her correction of the manuscript.

REFERENCES

- Rose PG. Endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 1996;335:640–9.
- Esteller M, Xercavins J, Reventos J. Advances in the molecular genetics of endometrial cancer [review]. *Oncol Rep* 1999;6:1377–82.
- Caduff RF, Svoboda-Neumann SM, Johnston CM, Bartos RE, Frank TS. Molecular analysis in endometrial cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1997;81:219–27.
- Clement PB, Young RH. Endometrioid carcinoma of the uterine corpus: a review of its pathology with emphasis on recent advances and problematic aspects. *Adv Anat Pathol* 2002;9:145–84.
- Salvesen HB, Akslen LA. Molecular pathogenesis and prognostic factors in endometrial carcinoma. *APMIS* 2002;110:673–89.
- Matias-Guiu X, Catusas L, Bussaglia E, et al. Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32:569–77.
- Catusas L, Machin P, Matias-Guiu X, Prat J. Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. *Hum Pathol* 1998;29:1160–4.

- Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, et al. Toward new strategies to select young endometrial cancer patients for mismatch repair gene mutation analysis. *J Clin Oncol* 2003;21:4364–70.
- Kong D, Suzuki A, Zou TT, et al. PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet* 1997;17:143–4.
- Matsushima-Nishiu M, Unoki M, Ono K, et al. Growth and gene expression profile analyses of endometrial cancer cells expressing exogenous PTEN. *Cancer Res* 2001;61:3741–9.
- Esteller M, Garcia A, Martinez-Palones JM, Xercavins J, Reventos J. The clinicopathological significance of K-RAS point mutation and gene amplification in endometrial cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:1572–7.
- Lagarda H, Catusas L, Arguelles R, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2001;193:193–9.
- Schlosshauer PW, Pirog EC, Levine RL, Ellenson LH. Mutational analysis of the CTNNB1 and APC genes in uterine endometrioid carcinoma. *Mod Pathol* 2000;13:1066–71.
- Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L. p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* 1997;150:177–85.
- Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer (Phila)* 2000;88:814–24.
- Oehler MK, Brand A, Wain GV. Molecular genetics and endometrial cancer. *J Br Menopause Soc* 2003;9:27–31.
- Tritz D, Pieretti M, Turner S, Powell D. Loss of heterozygosity in usual and special variant carcinomas of the endometrium. *Hum Pathol* 1997;28:607–12.
- Hedrick L. Endometrial cancer. New York: McGraw-Hill; 1998. p. 621–9.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol 2. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
- Moreno-Bueno G, Sanchez-Estevéz C, Cassia R, et al. Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res* 2003;63:5697–702.
- Perry C, Eldor A, Soreq H. Runx1/AML1 in leukemia: disrupted association with diverse protein partners. *Leuk Res* 2002;26:221–8.
- Kurokawa M, Hirai H. Role of AML1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies. *Cancer Sci* 2003;94:841–6.
- Michaud J, Scott HS, Escher R. AML1 interconnected pathways of leukemogenesis. *Cancer Invest* 2003;21:105–36.
- Bernardin F, Friedman AD. AML1 stimulates G1 to S progression via its transactivation domain. *Oncogene* 2002;21:3247–52.
- Imai O, Kurokawa M, Izutsu K, et al. Mutational analyses of the AML1 gene in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 2002;43:617–21.
- Kurokawa M, Tanaka T, Tanaka K, et al. Overexpression of the AML1 proto-oncoprotein in NIH3T3 cells leads to neoplastic transformation depending on the DNA-binding and transactivational potencies. *Oncogene* 1996;12:883–92.
- Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003;33:49–54.
- Kagoshima H, Shigesada K, Satake M, et al. The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators. *Trends Genet* 1993;9:338–41.
- Meyers S, Downing JR, Hiebert SW. Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* 1993;13:6336–45.
- Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K, Ohki M. Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J* 1998;17:2994–3004.
- Lutterbach B, Westendorf JJ, Linggi B, Isaac S, Seto E, Hiebert SW. A mechanism of repression by acute myeloid leukemia-1, the target of multiple chromosomal translocations in acute leukemia. *J Biol Chem* 2000;275:651–6.
- Harrington KS, Javed A, Drissi H, et al. Transcription factors RUNX1/AML1 and RUNX2/Cbfa1 dynamically associate with stationary subnuclear domains. *J Cell Sci* 2002;115:4167–76.
- Mao S, Frank RC, Zhang J, Miyazaki Y, Nimer SD. Functional and physical interactions between AML1 proteins and an ETS protein, MEF: implications for the pathogenesis of t(8;21)-positive leukemias. *Mol Cell Biol* 1999;19:3635–44.
- Taniuchi I, Littman DR. Epigenetic gene silencing by Runx proteins. *Oncogene* 2004;23:4341–5.
- Durst KL, Hiebert SW. Role of RUNX family members in transcriptional repression and gene silencing. *Oncogene* 2004;23:4220–4.
- Liu YN, Kang BB, Chen JH. Transcriptional regulation of human osteopontin promoter by C/EBPalpha and AML-1 in metastatic cancer cells. *Oncogene* 2004;23:278–88.
- Puig-Kroger A, Lopez-Rodriguez C, Rellosso M, et al. Polyomavirus enhancer-binding protein 2/core binding factor/acute myeloid leukemia factors contribute to the cell type-specific activity of the CD11a integrin gene promoter. *J Biol Chem* 2000;275:28507–12.

Article publicat a la revista científica britànica Journal of Pathology:

Planagumà J, Abal M, Gil-Moreno A, Díaz-Fuertes M, Monge M, García A, Baró T, Xercavins J, Reventós J, Alameda F. **Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma.**

J Pathol. 2005 Dec;207(4):422-9.

Original Paper

Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma

Jesús Planagumà,¹ Miguel Abal,¹ Antonio Gil-Moreno,^{2,5} María Díaz-Fuertes,¹ Marta Monge,¹ Ángel García,^{3,5} Teresa Baró,⁴ Jordi Xercavins,^{2,5} Jaume Reventós,^{1,5*,†} and Francesc Alameda^{4,5†}

¹Unitat de Recerca Biomèdica, Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

²Unitat de Ginecologia Oncològica, Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

³Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁴Servei d'Anatomia Patològica, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

⁵Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

*Correspondence to:

Jaume Reventós, Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, 14th Floor, Pg de la Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.
E-mail: jreventos@vhebron.net

†These authors have contributed equally to this work.

Abstract

To elucidate alterations in gene expression in endometrioid endometrial carcinoma (EEC), differential gene expression profiling was previously described in both tumour and non-tumour contexts, and the up-regulation of the *RUNX1/AML1* proto-oncogene in EEC was characterized. Among the set of genes found to be up-regulated significantly in EEC, the most relevant, *ERM/ETV5*, corresponds to the PEA3 subfamily and is a member of the Ets family of transcription factors that contain the Ets DNA-binding domain and are involved in matrix remodelling. In the present work, an attempt was made to characterize the expression of *ERM/ETV5* in EEC throughout the process of tumourigenesis. Gene expression levels of *ERM/ETV5* were quantified by real-time quantitative PCR (RT-Q-PCR) using a large panel of samples ranging from non-invasive IA to metastatic IIIA stages, and protein expression was characterized by tissue array immunohistochemistry (TMA). RT-Q-PCR validated *ERM/ETV5* up-regulation in EEC and demonstrated a specific and significant increase restricted to those tumour stages associated with myometrial invasion. TMA showed that *ERM/ETV5* up-regulation correlated mainly with the transition from atrophic endometrium to hyperplasia and carcinoma during tumour progression. Furthermore, *ERM/ETV5* gene and protein expression levels were associated with low tumour grade. Finally, *ERM/ETV5* up-regulation correlated with that of *RUNX1/AML1*. All of these results lead to the proposal of a co-operative role between *ERM/ETV5* and *RUNX1/AML1* during the early events of endometrial tumourigenesis, which may be associated with a switch to myometrial infiltration.

Copyright © 2005 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: endometrial endometrioid carcinoma; differential gene expression; endometrial tissue microarray; *ERM/ETV5*

Received: 31 May 2005
Revised: 12 July 2005
Accepted: 19 July 2005

Introduction

During the reproductive period, the endometrium is a permanently changing tissue, due to variation in hormone levels. It is known that the levels of ovarian steroids, as well as the levels of their receptors, can influence gene expression in the endometrium. Nevertheless, endometrial carcinoma presents mainly after the menopause. It is the result of the transformation of normal epithelial cells, which follow an evolutionary pathway that includes simple hyperplasia, complex hyperplasia, and carcinoma. Endometrial carcinoma is the most common malignant disease of the female reproductive tract in developed countries, affecting about 3% of all women [1]. Two types of endometrial cancer have been described: type I,

endometrioid endometrial carcinoma (EEC) and type II, non-endometrioid endometrial carcinoma (NEEC). EEC tumours are low-grade and oestrogen-related, and they usually develop in peri- and post-menopausal women. They co-exist with or are preceded by complex endometrial hyperplasia. In contrast, NEECs are high-grade tumours, unrelated to oestrogen exposure, which usually develop in older, post-menopausal women and which are not preceded by complex endometrial hyperplasia [2]. NEECs usually develop metastasis and often recur, despite aggressive treatment. Among histological types, the most common endometrial carcinoma corresponds to endometrioid carcinoma (EEC), with an incidence of 80% [3].

Molecular studies have characterized in part the genetic events that may be involved in the development

and progression of both types of endometrial carcinoma. Microsatellite instability and mutations in *PTEN*, *k-ras*, *β -catenin*, and DNA-mismatch repair genes have been associated with type I, while aneuploidy, *p53* mutations, and *her2/neu* amplification have been identified in type II endometrial carcinoma [4,5]. Nevertheless, the precise molecular events that occur during the development of endometrial carcinoma are still relatively poorly understood. Previous analyses, using microarray technology, have concluded that neoplastic transformation is accompanied by the predominant loss of activity of many genes that are constitutively expressed in normal tissues, and an absence of expression profiles, which characterize the anti-tumourigenic progestin response [6]. Other microarray analyses have focused on characterizing gene expression in relation to different histological types of endometrial carcinoma [7–9].

Recently, our laboratory attempted to study gene expression profiles in simple and complex endometrial hyperplasias, as well as in EECs and atrophic endometria. We were able to identify a set of 53 differentially expressed sequences in EEC, when comparing simple hyperplasia, complex hyperplasia, and atrophic endometria, and we described a set of significantly up-regulated genes in EEC, the most relevant corresponding to *ERM/ETV5* [10]. *ERM/ETV5* belongs to the PEA3 subfamily, included in the Ets family of transcription factors. This family is characterized by approximately 85 amino acids in an evolutionarily conserved DNA-binding domain that regulates the expression of a variety of genes by binding to a central A/GGAA/T core motif [11–13]. In the present study, using a large panel of EEC samples, real-time quantitative PCR (RT-Q-PCR), and tissue microarray immunohistochemistry (TMA), we characterized the expression of the *ERM/ETV5* gene, the most significantly altered gene found in the differential cDNA microarray analysis [10].

Materials and methods

Patients and sample collection

Tumour samples

We included a group of patients who underwent surgery for endometrial carcinoma in the Departments of Gynaecological Oncology at both the Hospital Vall d'Hebron and the Hospital del Mar in Barcelona. Patients ranged from 50 to 80 years of age. None of the patients had received radiation and/or hormonal or chemotherapy treatment prior to surgery. The protocol was approved by the Institutional Review Boards and informed consent was obtained from all of the patients involved in the study. Parts of each tissue sample were stored at -80°C and embedded in paraffin wax.

Control samples

We collected non-affected endometrial epithelia (AE; atrophic endometria) from the same patients. We also

collected endometrial curettage samples from healthy pre-menopausal women (NPE: normal proliferative endometria).

Real time quantitative PCR (RT-Q-PCR)

RT-Q-PCR (TaqMan[®], Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) technology was used in order to validate the differential expression of selected genes from the cDNA array gene expression analysis [10]. Total RNA, from the above samples, was extracted directly using the RNeasy Mini-Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The RNA NanoLabChip Kit (Agilent, Palo Alto, CA, USA) was used to determine the purity of isolated total RNA. The SuperScriptII[™] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) reverse transcription protocol was performed in order to obtain cDNA from all samples. The manufacturer's RT-Q-PCR conditions [52°C for 2 min; 95°C for 10 min; 50 \times (95°C for 15 s, 60°C for 1 min)] and the *ERM/ETV5* oligonucleotides/TaqMan probe obtained from the Assays-on-Demand database Hs00231079_m1 (Applied Biosystems) were used. 18S ribosomal RNA *C6.4308329* (Applied Biosystems) was used to normalize variations in cDNA quantities among the samples. Each reaction was performed in triplicate with cDNA dilutions from 30 endometrioid carcinomas of stages IA–IIIA, ranging from non-infiltrating IA to IC stages, the latter being defined as having more than 50% of myometrial infiltration, and with stage II corresponding to tumours affecting the cervix, with (IIB) or without (IIA) cervical stromal infiltration, and stage III corresponding to tumours affecting the uterine serosa, or vaginal wall or regional lymph nodes. cDNA dilution from a pool of atrophic endometria (AE; 16 samples) and cDNA dilution from a pool of proliferative healthy endometria (NPE; four samples) were used as calibration samples.

Tissue microarray (TMA)

Three different TMAs, namely atrophic endometria (AE), simple (SH) and complex (CH) hyperplasias, and endometrioid carcinomas (EECs) were constructed, in order to cover the spectrum from non-pathological tissue through pre-neoplastic lesions to EEC. Concerning CH, and considering that only focal atypia was observed, we could not diagnose the cases in the TMA as atypical CH. Representative areas of 74 EECs, 30 CHs, 30 SHs, and 15 AEs were carefully selected. The EEC TMA, including samples covering the spectrum of endometrioid endometrial tumourigenesis from stages IA–IIIA, comprised grade 1 (43 \times 2), grade 2 (21 \times 2), and grade 3 (10 \times 2) samples (see Table 1). Two tissue cores of 1 mm in diameter were obtained from each paraffin block. The tissue cores were arrayed precisely in a new paraffin block using a tissue microarray workstation MTA-1 (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA). Sections of 5 μm were obtained from all TMA paraffin blocks. *ERM/ETV5* was detected

by the indirect immunoperoxidase assay with citrate buffer for antigen retrieval. Sections were incubated with a primary antibody against ERM/ETV5 (SantaCruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) for 1 h at a dilution of 1:50, and thereafter incubated with peroxidase-conjugated rabbit anti-goat immunoglobulin (EnVision, DAKO, Glostrup, Denmark). Quantitative and qualitative ERM/ETV5 immunostaining evaluation was performed by three independent investigators. The intensity of positive immunostaining was evaluated as follows: 0 = negative; 1 = low; 2 = medium; and 3 = high.

Statistical data analysis

RT-Q-PCR statistical data analysis

The expression level values in the pathological samples were not normally distributed, so different comparisons were analysed using the non-parametric Mann–Whitney *U* statistic. The significance value level was adjusted to $p < 0.05$.

Table 1. Description of the samples used for the RT-Q-PCR analysis of ERM/ETV5

Sample	Type	RT-Q-PCR analysis		cDNA Amplification
		Characteristics/ Stage	Grade	
Normal	AE	Post-menopausal	—	Pool of 16 samples
Normal	NPE	Pre-menopausal	—	Pool of 4 samples
Tumour	EEC	IA	1	Single sample
Tumour	EEC	IA	1	Single sample
Tumour	EEC	IA	1	Single sample
Tumour	EEC	IA	2	Single sample
Tumour	EEC	IB	3	Single sample
Tumour	EEC	IB	2	Single sample
Tumour	EEC	IB	2	Single sample
Tumour	EEC	IB	2	Single sample
Tumour	EEC	IB	2	Single sample
Tumour	EEC	IC	3	Single sample
Tumour	EEC	IC	2	Single sample
Tumour	EEC	IC	2	Single sample
Tumour	EEC	IC	2	Single sample
Tumour	EEC	IC	2	Single sample
Tumour	EEC	IC	3	Single sample
Tumour	EEC	IIA	3	Single sample
Tumour	EEC	IIA	2	Single sample
Tumour	EEC	IIB	2	Single sample
Tumour	EEC	IIB	2	Single sample
Tumour	EEC	IIB	2	Single sample
Tumour	EEC	IIB	2	Single sample
Tumour	EEC	IIB	2	Single sample
Tumour	EEC	IIB	2	Single sample
Tumour	EEC	IIB	3	Single sample
Tumour	EEC	IIB	3	Single sample
Tumour	EEC	IIB	3	Single sample
Tumour	EEC	IIB	3	Single sample
Tumour	EEC	IIB	3	Single sample
Tumour	EEC	IIB	3	Single sample
Tumour	EEC	IIB	3	Single sample
Tumour	EEC	IIIA	2	Single sample
Tumour	EEC	IIIA	2	Single sample

AE = atrophic endometria; NPE = normal proliferative endometria; EEC = endometrioid endometrial carcinoma.

TMA statistical data analysis

Correlation studies were analysed using the Wilcoxon test for paired data and Spearman's rho test. The significance value level was adjusted to $p < 0.05$.

Results

Up-regulation of the ERM/ETV5 gene by RT-Q-PCR

RT-Q-PCR TaqMan[®] analysis confirmed the up-regulated levels of ERM/ETV5 in EEC found in the cDNA microarray study [10] (Figure 1). ERM/ETV5 expression was normalized against non-affected endometrial epithelia (AE: atrophic endometria) from the same patients, and against collected endometrial curettage samples from healthy pre-menopausal women (NPE: normal proliferative endometria), described elsewhere [10].

The distribution of gene expression levels depending on tumour stage, from stage IA, with no myometrial invasion, to highly invasive IIIA, revealed that ERM/ETV5 was predominantly up-regulated in those samples corresponding to early EEC stages, both when normalized against AE (Figure 1a, white bars) and when normalized against NPE (Figure 1a, dark bars). This includes stages IA–IC, with a maximum five-fold increase when normalized against AE and an eight-fold increase against NPE in stage IC EECs. Strikingly, ERM/ETV5 expression decreased to basal levels in samples corresponding to the more advanced EEC stages II and III, corresponding to tumours affecting the cervix, but not necessarily infiltrating myometrium (Figure 1a). Focusing on early stages restricted to the uterine corpus, statistical analysis showed that ERM/ETV5 expression was slightly up-regulated in stage IA, with no myometrial invasion, and stage IB, which corresponds to invasion of less than 50% of the uterine wall. In contrast, ERM/ETV5 up-regulation was statistically significant when comparing stage IC, in which there is invasion of more than 50% of the uterine wall, with stages IA, IB, and controls ($p < 0.032$, Figure 1b). Furthermore, the decrease in ERM/ETV5 expression level from stages IC to II and III was found to be statistically significant ($p < 0.001$). Moreover, assuming that the mean and standard deviation values obtained from the calibration samples define these populations better and that they should fit into a normal distribution with those values distant from the mean ± 1.96 SD being considered atypical, ERM/ETV5 was found to be up-regulated significantly in stage IC EECs (Figure 1b). Finally, the analysis of ERM/ETV5 gene expression levels according to tumour grade, defined by the percentage of solid tumour area as G1 <5%, G2 = 5–50%, and G3 > 50%, showed higher levels of expression in G1 and G2 tumours, compared with G3 ($p < 0.001$, Figure 1c).

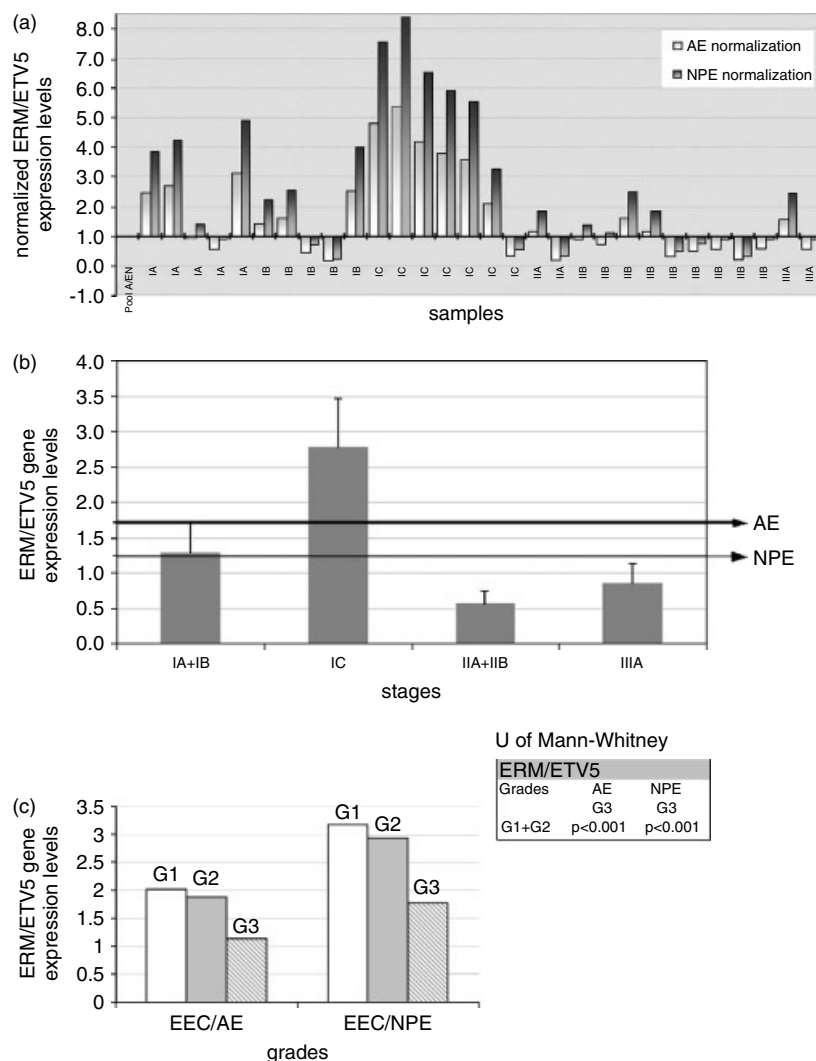


Figure 1. RT-Q-PCR analysis of *ERM/ETV5* in EEC. (a) *ERM/ETV5* expression levels from a panel of 30 EECs, normalized against AE (white bars) and NPE (dark bars). (b) *ERM/ETV5* expression levels according to pathological stage. (c) *ERM/ETV5* expression levels according to grade G1, G2, and G3 normalized against AE and against NPE

Up-regulation of the ERM/ETV5 protein by immunohistochemistry

ERM/ETV5 immunohistochemistry showed specific labelling in glandular epithelium and negative staining in the stromal compartment (Figure 2b). Representative atrophic samples showed low or negative levels of ERM/ETV5 staining (Figure 2a). Detailed analysis of ERM/ETV5 protein expression in EEC showed a spotted distribution in the cytoplasm of the epithelial tumour cells (Figures 2c and 2d), mainly in the basal zone of the gland adjacent to the stromal compartment (* in Figure 2c), and less frequently in the apical zone (# in Figure 2c). Occasionally, ERM/ETV5 immunostaining was found in the nucleus (yellow arrow in Figure 2d).

TMA analysis of ERM/ETV5 protein expression during the process of tumourigenesis

We further analysed the expression of ERM/ETV5 protein throughout the tumourigenesis process of EEC

by using tissue microarray (TMA) immunohistochemistry. As shown in Figure 3, a gradation in the intensity of ERM/ETV5 staining was found when we compared AE with SH, CH, and EEC cores. AE was found to be associated with both negative and low-level (1) staining, while in SH, we could find cores with ERM/ETV5 labelling ranging from 0 to 2 (Figure 3, upper panels). No negative staining was found in either CH or EEC; rather, only positive values ranging from 1 to 3 were identified (Figure 3, upper panels). Moreover, when we analysed the intensity of labelling quantitatively, we found significant differences between EECs, CH, and SH against AE samples ($p < 0.001$). In EEC, 10% of the samples corresponded to high-level intensity (3), while 7% was found in CH, and 0% in SH and AE (Figure 3, middle panel). Medium-level intensity (2) was also mainly found in EECs (25%) and in samples of CH (25%), but only to a minor extent in samples of SH (12%) (Figure 3, middle panel). Low-level intensity (1) ranged from 65% in EEC samples, the higher percentages corresponding to hyperplasias with 68% in CH and 71% in

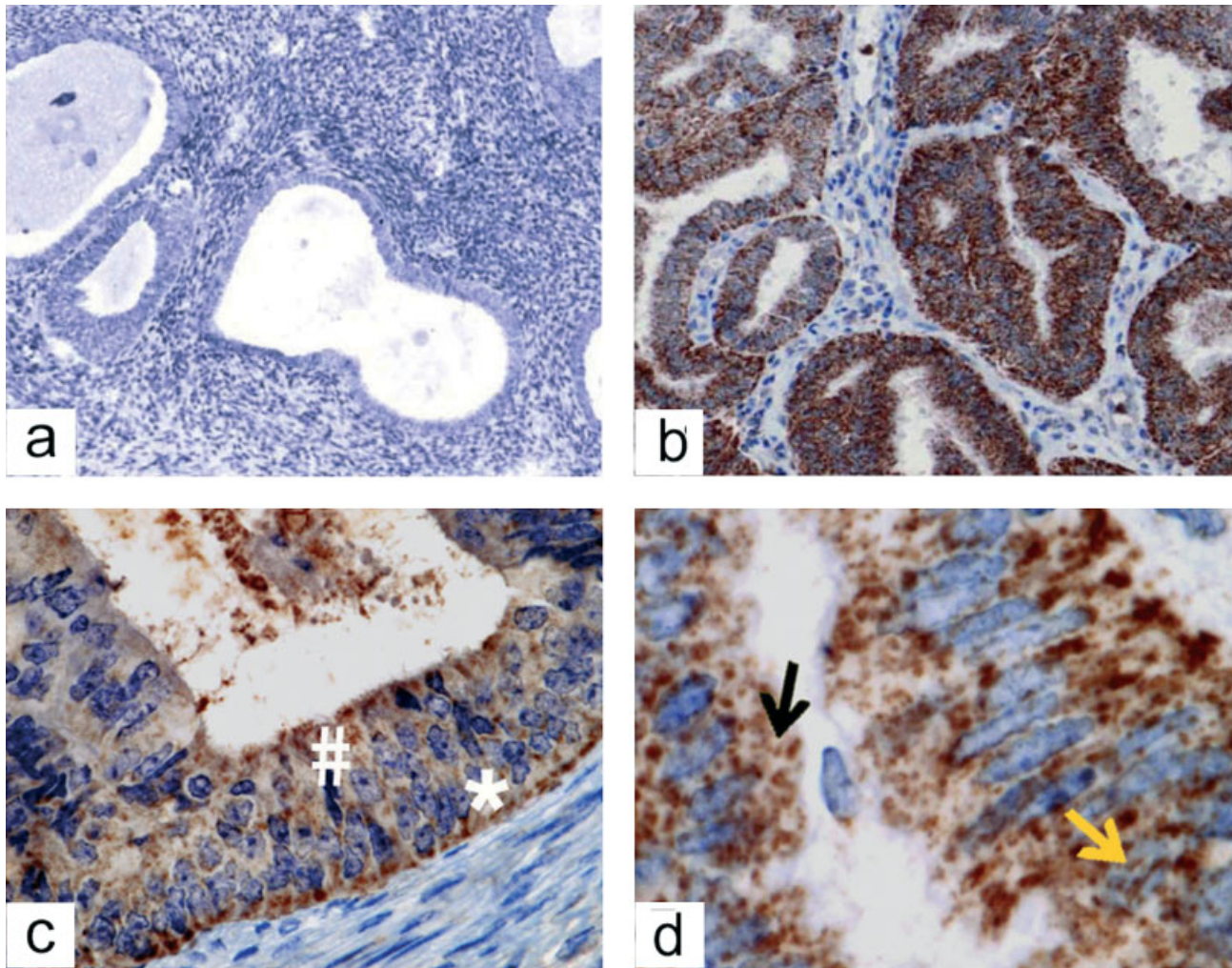


Figure 2. ERM/ETV5 protein expression in EEC. ERM/ETV5 immunohistochemistry in normal atrophic endometrium (a) and carcinoma (b) (original magnification: 10 \times). Details of ERM/ETV5 protein expression in the EEC samples are shown in panels c and d. The immunostaining of ERM/ETV5 has a spotted distribution in the cytoplasm (black arrow), mainly in the basal zone (*), and less frequently in the apical zone (#). Occasionally, ERM/ETV5 immunostaining was found in the nucleus (yellow arrow). Original magnification: (c)20 \times ; (d) 60 \times

SH, and 56% in AE (Figure 3, middle panel). Finally, negative intensity levels (0) were practically restricted to AE (44%) (Figure 3, middle panel). The analysis of ERM/ETV5 expression levels according to tumour grade showed a major increase in the expression of ERM/ETV5 in the most differentiated grade G1, followed by G2 and, finally, the least differentiated grade G3. The comparison between differentiated grades (G1 + G2) and undifferentiated grade (G3) was statistically significant ($p < 0.001$).

Discussion

The results of RT-Q-PCR analysis of *ERM/ETV5* gene expression levels suggest that, in endometrioid endometrial carcinoma, *ERM/ETV5* is up-regulated in the initial stages of tumour development, especially in tumours restricted to the uterine corpus, and is associated with stage IC, in which more than 50% of the uterine wall is infiltrated by tumour. Interestingly, *ERM/ETV5* expression dropped to basal levels

in the subsequent steps as the tumour progressed, corresponding to tumour stages II and III. The fact that the RT-Q-PCR expression profile was similar when normalized against both AE and NPE indicates that the up-regulation found in *ERM/ETV5* is not dependent on the proliferative status of the endometrium. Moreover, the negativity of ERM/ETV5 staining in the stromal compartment increases the significance of the ERM/ETV5 results concerning gene expression levels, as they are specific to the epithelial cells and obviate a possible stromal contribution in the different samples analysed. Furthermore, the characterization of ERM/ETV5 up-regulation in EEC at the protein level not only confirms the up-regulation of ERM/ETV5 in endometrial carcinoma, but also describes another level of gradation already found among tumour stages (Figure 1). This gradation corresponds to an increase in ERM/ETV5 up-regulation as the process of tumourigenesis progresses from normal atrophic endometria to simple and complex hyperplasias towards carcinoma (Figure 3, lower panel).

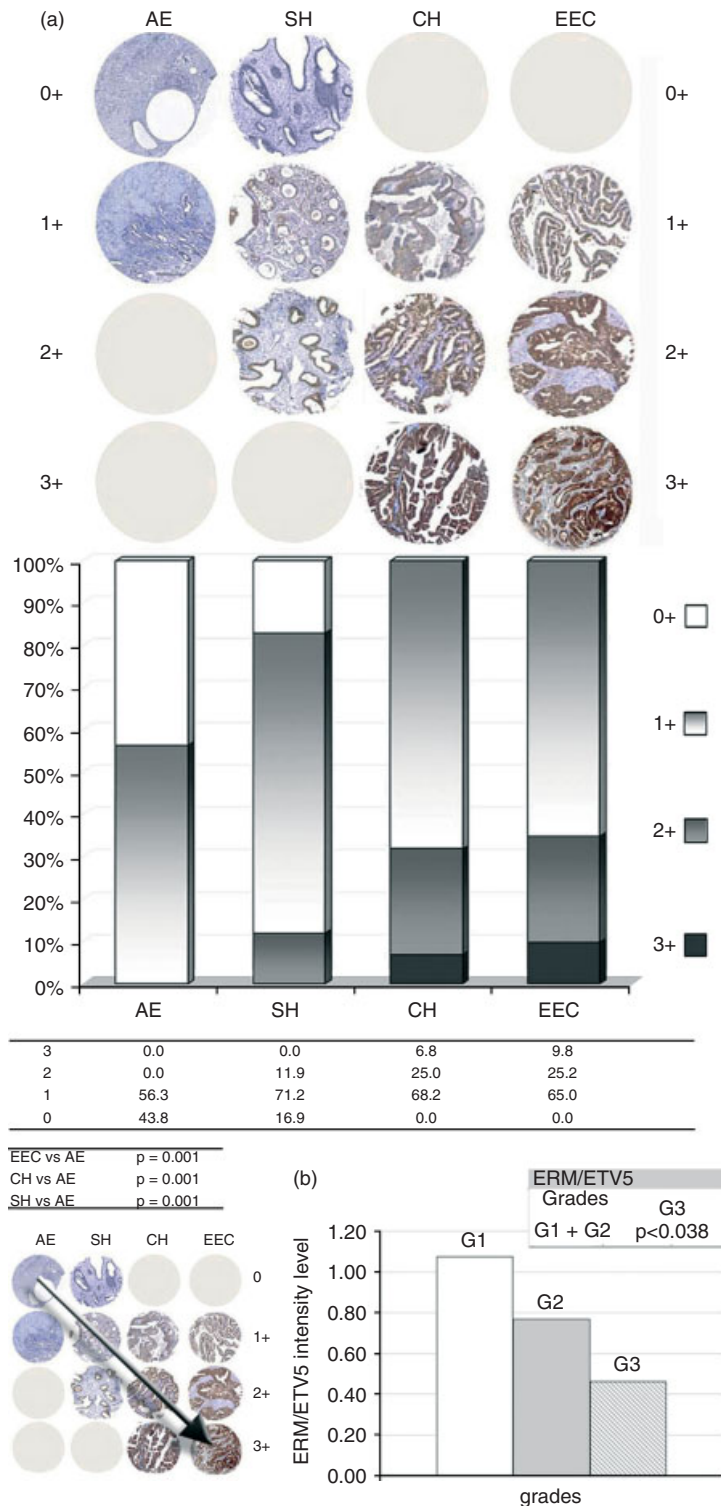


Figure 3. Endometrial TMA analysis of ERM/ETV5 protein expression by immunohistochemistry. (a) The gradation of ERM/ETV5 intensity (0–3) among TMA samples, namely atrophic endometria (AE), simple (SH) and complex (CH) hyperplasias, and endometrioid carcinomas (EECs). The percentages of tissue-array cores with a given intensity range are shown in the corresponding table. (b) ERM/ETV5 expression levels according to carcinoma grades G1, G2, and G3

TMA allowed the evaluation of ERM/ETV5 during tumourigenesis, comprising a wide variety of samples representative of the different tissue contexts found in post-menopausal endometrial tumours. This gradation reinforces the idea that ERM/ETV5 up-regulation could be playing a role in the early events associated with endometrioid endometrial carcinoma.

Furthermore, some studies have described a correlation between the expression of members of the ets-1 family and tumour progression [14–16].

Endometrial endometrioid carcinoma is defined by stages and grades. Evaluating ERM/ETV5 gene and protein expression according to tumour grades, higher expression was observed in the more differentiated

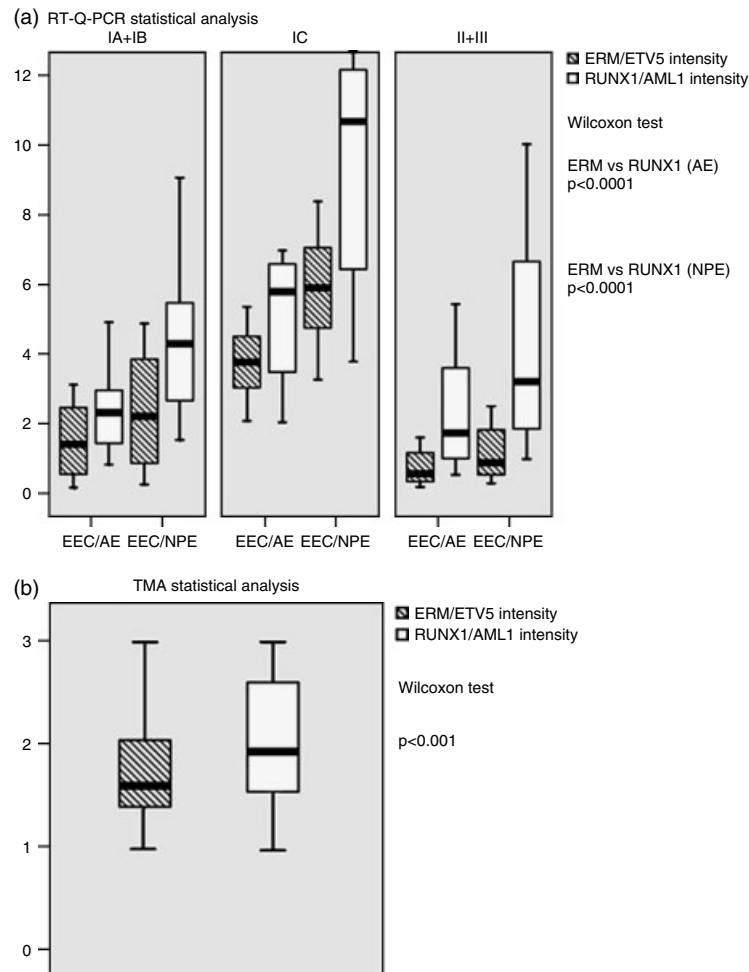


Figure 4. Wilcoxon analysis showing that both ERM/ETV5 gene expression and protein level profiles correlate statistically with those found for RUNX1/AML1. (a) Statistical analysis of the correlation between ERM/ETV5 and RUNX1/AML1 gene expression, grouped by tumour stage. (b) Correlation analysis between ERM/ETV5 and RUNX1/AML1 protein expression in EEC

grades G1 and G2 compared with G3 tumours. Globally, the expression profiles found both by RT-Q-PCR and by TMA define a peak of ERM/ETV5 expression in tumours of stage IC and grade G1 or G2, corresponding to tumours infiltrating more than 50% of the myometrium and with less than 50% of solid tumour area (Figures 1c and 3b). The possibility that ERM/ETV5 up-regulation might be involved in cell differentiation that could be promoting invasive rather than proliferative phenotypes deserves further studies on a larger number of samples before any conclusion can be reached.

Finally, the fact that both ERM/ETV5 gene expression and protein level profiles were similar to those found for RUNX1/AML1 in EEC [10] led us to analyse the magnitude and direction of the association between both genes statistically. We found that the up-regulation of RUNX1/AML1 correlated significantly with that of ERM/ETV5 by using the Spearman test and Wilcoxon analysis, both by RT-Q-PCR ($p < 0.001$) and by TMA ($p < 0.0001$) (Figure 4). This possible interaction is reinforced by the observation that NERF-2, a new Ets transcription factor family member, is bound to RUNX1/AML1 via an interaction

site located in a basic region upstream of the Ets domain [17]. Moreover, the DNA-binding activity of the transcription factor Ets-1 has been described as being modulated through flexible interaction with RUNX1/AML1 [18]. Interestingly, conserved PEA3 elements, which bind to members of the Ets transcription factor family, have been found in all inducible matrix metalloproteinase (MMP) promoters [19]. The protein expression of the main member of the Ets family, the proto-oncogene *c-Ets-1*, has been described as a valuable marker in endometrial carcinogenesis [20]. *c-Ets1* controls the expression of genes involved in extracellular matrix remodelling, namely the two metalloproteinase gene promoters stromelysin-1 (matrix metalloproteinase MMP-3 [12] and collagenase-1 [21], as well as the u-PA promoter [22]. In addition, Ets-1 has been described to regulate MMP-1, MMP-9, and uPa, as well as VEGF and VEGF-receptor gene expression, and it is proposed to be involved in angiogenesis, cell migration, and tumour invasion, correlating with the increase in proteolytic activity of invading tumour cells (for a review, see ref 23). We are currently investigating the possibility that RUNX1/AML1 and ERM/ETV5 may act cooperatively in an initial switch

to myometrial infiltration, by inducing the expression of genes involved in extracellular matrix remodelling.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Institut Català de la Salut and the Fondo de Investigaciones Sanitarias (grants FIS 98/0897 and FIS 02/0733 to JR). Jesús Planagumà is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Sanidad y Consumo (BEFI 02/9366) and Miguel Abal is the recipient of a post-doctoral fellowship from the Institut de Recerca del Hospital Universitari Vall d'Hebron. We would also like to thank Drs Joan Vila, Josep M^a Manresa (Servei d'Estadística, Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques), and Jordi Planagumà (Facultat de Matemàtiques UPC) for their help with the statistical analysis of the data and Paqui Gallego (UCTS), Marta Valeri (UCTS), and Pilar García for their technical assistance, as well as Ms Lisa Piccione for correction of the manuscript.

References

- Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin* 1996;**46**:5–27.
- Esteller M, Xercavins J, Reventos J. Advances in the molecular genetics of endometrial cancer (Review). *Oncol Rep* 1999;**6**:1377–1382.
- Caduff RF, Svoboda-Neumann SM, Johnston CM, Bartos RE, Frank TS. Molecular analysis in endometrial cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1997;**81**:219–227.
- Salvesen HB, Akslen LA. Molecular pathogenesis and prognostic factors in endometrial carcinoma. *Apmis* 2002;**110**:673–689.
- Oehler MK, Brand A, Wain GV. Molecular genetics and endometrial cancer. *J Br Menopause Soc* 2003;**9**:27–31.
- Mutter GL, Baak JP, Fitzgerald JT, Gray R, Neuberger D, Kust GA, *et al.* Global expression changes of constitutive and hormonally regulated genes during endometrial neoplastic transformation. *Gynecol Oncol* 2001;**83**:177–185.
- Cao QJ, Belbin T, Socci N, Balan R, Prystowsky MB, Childs G, *et al.* Distinctive gene expression profiles by cDNA microarrays in endometrioid and serous carcinomas of the endometrium. *Int J Gynecol Pathol* 2004;**23**:321–329.
- Moreno-Bueno G, Sanchez-Estevéz C, Cassia R, Rodríguez-Perales S, Diaz-Urriarte R, Dominguez O, *et al.* Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res* 2003;**63**:5697–5702.
- Risinger JJ, Maxwell GL, Chandramouli GV, Jazaeri A, Aprelikova O, Patterson T, *et al.* Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer. *Cancer Res* 2003;**63**:6–11.
- Planagumà J, Diaz-Fuertes M, Gil-Moreno A, Abal M, Monge M, García A, *et al.* A differential gene expression profile reveals overexpression of RUNX1/AML1 in invasive endometrioid carcinoma. *Cancer Res* 2004;**64**:8846–8853.
- Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;**64**:327–336.
- Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R, Wasylyk B. The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J* 1991;**10**:1127–1134.
- Wang CY, Petryniak B, Ho IC, Thompson CB, Leiden JM. Evolutionarily conserved Ets family members display distinct DNA binding specificities. *J Exp Med* 1992;**175**:1391–1399.
- Yamamoto H, Horiuchi S, Adachi Y, Taniguchi H, Nosho K, Min Y, *et al.* Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumour progression and overexpression of matrilysin in human gastric cancer. *Carcinogenesis* 2004;**25**:325–332.
- Horiuchi S, Yamamoto H, Min Y, Adachi Y, Itoh F, Imai K. Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol* 2003;**200**:568–576.
- Korz C, Pscherer A, Benner A, Mertens D, Schaffner C, Leupolt E, *et al.* Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood* 2002;**99**:4554–4561.
- Cho JY, Akbarali Y, Zerbini LF, Gu X, Boltax J, Wang Y, *et al.* Isoforms of the Ets transcription factor NERF/ELF-2 physically interact with AML1 and mediate opposing effects on AML1-mediated transcription of the B cell-specific blk gene. *J Biol Chem* 2004;**279**:19 512–19 522.
- Garvie CW, Pufall MA, Graves BJ, Wolberger C. Structural analysis of the autoinhibition of Ets-1 and its role in protein partnerships. *J Biol Chem* 2002;**277**:45 529–45 536.
- Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999;**13**:781–792.
- Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Miyakawa I. Expression of c-Ets1 is associated with malignant potential in endometrial carcinoma. *Cancer* 2000;**89**:2059–2067.
- Gutman A, Wasylyk B. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J* 1990;**9**:2241–2246.
- Nerlov C, Rorth P, Blasi F, Johnsen M. Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene* 1991;**6**:1583–1592.
- Dittmer J. The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer* 2003;**2**:29.



El teixit endometrial, per a desenvolupar la seva funció correctament, està sotmès a un procés molt complex de regulació. Aquest procés és el resultat de la coordinació dels diferents tipus cel·lulars que en formen part i de l'equilibri entre els factors reguladors d'estimulació i els factors reguladors d'inhibició, principalment hormones com els estrògens i la progesterona. Els elements que modulen el creixement i la proliferació cel·lular poden ser susceptibles de presentar alteracions, ja sigui d'origen genètic o ambiental, les quals poden comportar una alteració del procés normal de regulació del teixit endometrial i, per tant, conduir a l'aparició, establiment i/o desenvolupament de la patologia tumoral.

