

تشخیص جهش های ژن فسفاتیدیل اینوزیتول ۳- کیناز در سرطان رحم در ایران

معصومه الیاسی^۱، دکتر منوچهر توسلی^۲، دکتر مهتری فقیهی^۳، دکتر سیمین همتی^۴

خلاصه:

مقدمه: مسیر انتقال پیام فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز (PI3K) فرایند های مختلف سلولی شامل: تکثیر سلولی، تمایز، مهاجرت، متابولیسم انسولین و آپوپتوز را کنترل می نماید. PI3K فعال شده فسفاتیدیل اینوزیتول ۴ و ۵ بیس فسفات (PIP_2) را فسفریله و به فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ و ۴ و ۵ تری فسفات (PIP_3) تبدیل می کند. PIP_3 حاصله سپس Akt (پروتئین کیناز B) را فعال می نماید. فراوانی جهش های $PIK3CA$ در سرطان رحم بین ۳۹-۲۴ درصد می باشد. بیش از ۹۰ درصد جهش ها در دمین هلیکالی (اگزون ۹) و دمین کینازی (اگزون ۲۰) $PIK3CA$ قرار دارند.

روش ها: در این مطالعه وجود جهش در اگزون های ۹ و ۲۰ $PI3K$ در سرطان رحم به کمک روش SSCP و توالی یابی مستقیم در جمعیت اصفهان و نمونه های دریافتی از انستیتو کانسرایران بررسی شد. هم چنین ارتباط جهش با درگیری غدد لنفاوی، سن بیمار، مرحله پیشرفت بیماری و درجه تومور به وسیله آزمون مربع کای بررسی شد.

یافته ها: بر اساس نتایج این مطالعه ۴۷ درصد نمونه ها دارای جهش در ژن $PI3K$ می باشند و ۶۰ درصد جهش ها در اگزون ۲۰ قرار دارند. در اگزون ۹ علاوه بر جهش مشاهده شده در نقطه داغ (E542K, G1624A)، یک جهش جدید G1610A (R537Q) نیز مشاهده شد. همچنین یک جهش جدید در کدون ۳۰۵۹ اگزون ۲۰ مشاهده شد C3059T (A1020V) که تاکنون در مورد سرطان رحم گزارش نشده بود. در جمعیت مورد مطالعه ارتباط معنی داری بین جهش و درجه تومور مشاهده شد ($P = 0.03$ و $OR = 5.5$). اما ارتباطی بین جهش و متاستاز به غدد لنفاوی، سن بیمار و مرحله پیشرفت بیماری دیده نشد.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده نشان می دهند که طیف جهش های $PIK3CA$ در جمعیت ما متفاوت است و بررسی تعداد نمونه های بیشتر و سایر سرطان ها ضرورت دارد.

واژگان کلیدی: سرطان رحم، جهش، آپوپتوز، $PIK3CA$

مقدمه:

۱- دانشجوی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران. ۲- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

۳- دانشیار

۴- استادیار، گروه پرتو درمانی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

امروزه بیماری سرطان به یک مسئله اساسی در دنیا تبدیل شده است. در سال ۲۰۱۰ در آمریکا ۱,۵۲۹,۵۶۰ مورد جدید سرطان شناسایی شد که در ۵۶۹,۴۹۰ مورد منجر به مرگ شد. سرطان جسم رحم (Endometrial Cancer) یکی از فراوان ترین بدخیمی های زنان در جهان غرب است و ۶ درصد کل سرطان های لوله تناسلی زنان را به خود اختصاص می دهد. در سال ۲۰۱۰ حدود ۴۳,۴۷۰ مورد جدید از سرطان جسم رحم گزارش شد و در ۷۹۵۰ مورد منجر به مرگ بیمار شده است (۱). سرطان جسم رحم در ایران، ۲/۳۵ درصد کل سرطان ها را در بین زنان به خود اختصاص داده است. در اصفهان فراوانی این سرطان در بین زنان ۲/۵۱ درصد گزارش شده و طبق این آمار اصفهان سومین استان کشور از نظر فراوانی این سرطان است (۲).

تقسیم بندی سرطان رحم: بر اساس یک سیستم تقسیم بندی که توسط Bokhman در سال ۱۹۸۳ انجام شد سرطان رحم به دو گروه ۱ و ۲ تقسیم شد. این تقسیم بندی بر اساس اتیولوژی و رفتار های کلینیکی می باشد (۳). انواع سرطان رحم علاوه بر ویژگی های مورفولوژیکی و کلینیکی متفاوت تغییرات ژنتیکی متفاوتی نیز دارند. در نوع اول ژن های مثل *PTEN*, *K-ras*, *catenin* و β -*PI3KCA* دچار جهش می شوند (۴). جهش های *PI3KCA* در ۳۶ درصد سرطان های رحم نوع اول مشاهده شده است (۵). در نوع دوم سرطان های رحم معمولا آنوپلوئیدی و جهش های *P53* رخ می دهد (۴). فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز (*PI3K*) کیناز های لپیدی هستند که فرایند های مختلف سلولی شامل: تکثیر سلولی، تمایز، مهاجرت، متابولیسم انسولین و آپوپتوز را کنترل می نماید (۶-۷). *PI3K* از طریق رسپتورهای تیروزین کینازی، سیتوکین، اینتگرین و رسپتورهای جفت شونده با G پروتئین ها فعال می شود (۸-۹). *PI3K* فعال شده فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ و ۴ و بیس فسفات (PIP_2) را در موقعیت D_3 فسفریله و به فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ و ۴ و تری فسفات (PIP_3) تبدیل می کند. (PIP_3) حاصله سپس *Akt* (پروتئین کیناز B) را فعال نموده که با فسفوریلاسیون پروتئین های مختلف یک سری از رویداد های سلولی از جمله فرایند های که در رشد و توسعه توموری دخالت دارند را کنترل می نماید (۶ و ۸ و ۹).

خانواده (*PI3K*) در سه گروه اصلی کلاس I و II و III و چندین زیر گروه تقسیم بندی می شوند. حداقل ۱۲ عضو از این خانواده در ژنوم انسان وجود دارد (۹).

کلاس I تنها گروهی است که $PtdIn(4,5)p2$ را به $PtdIn(3,4,5)p3$ تبدیل می کند دو زیر گروه کلاس I شامل کلاس IA و IB می باشد که کلاس IA از طریق رسپتورهای تیروزین کینازی و کلاس IB از طریق رسپتورهای جفت شونده با G- پروتئین ها یا GPCRs (G protein Coupled Receptors) فعال می شوند. البته هر دو زیر گروه به Ras نیز می توانند متصل و فعال شوند (۶). کلاس IA هترودمیری متشکل از یک زیر واحد کاتالیتیکی ۱۱۰ کیلو دالتونی P^{110} و یک زیر واحد تنظیمی ۸۵-۵۰ کیلو دالتونی P^{85} است (۸ و ۹). جهش های زیر واحد کاتالیتیکی $P^{110\alpha}$ (*PIK3CA*) در چند نوع از سرطان های انسانی شامل: پستان (۱۰)، کولون، معده، مغز، ریه (۱۰)، تخمدان (۱۱)، کبد (۱۲) و رحم گزارش شده است. فراوانی موتاسیون های *PIK3CA* در سرطان رحم بین ۲۴-۳۹ درصد می باشد (۵ و ۱۳ و ۱۴). بیش از ۹۰ درصد جهش ها در دمین هلیکالی (اگزون ۹) و دمین کینازی (اگزون ۲۰) *PIK3CA* قرار دارند. این جهش ها عمدتاً سبب افزایش فعالیت *PI3K* شده و روند تومورزایی را آغاز می کنند به همین جهت جزء اهداف درمانی در مطالعات سرطان قرار گرفته اند (۱۵).

مواد و روش ها:

DNA ژنومی از ۵۰ نمونه ی تومور تازه جسم رحم که از اصفهان و انستیتو کانسر ایران در تهران جمع آوری شده بود و ۵ نمونه کنترل منفی شامل نمونه بافت و خون سالم و ۳ نمونه کنترل مثبت که جهش های آن ها ثابت شده بود با روش استاندارد فنل-کلروفورم استخراج شد. به منظور تشخیص جهش های *PIK3CA* واکنش زنجیر پلیمرز (PCR) (اگزون های ۹ و ۲۰ در حجم

نهایی ۲۵ میکرولیتر و ۳۰ سیکل انجام شد و اسرشت شدن اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ تا ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل PCR به ترتیب با دمای و اسرشت شدن ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و دمای اتصال متفاوت برای هر کدام از پرایمرها بین ۴۸ تا ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد و در انتها تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر توالی های ناقص در نظر گرفته شد. محصولات PCR توسط الکتروفورز با ژل ۱ درصد آگارز بررسی شدند. واکنش زنجیر پلی مرز حاوی ۲۰۰-۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲۰۰ نانومولار از پرایمر های پیشرو و پیرو، ۰/۲ ماکرومولار dNTP، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR 1X، ۱/۵ میلی مولار MgCl₂ و دو واحد آنزیم Smar Taq DNA Polymerase (شرکت سیناژن) در دستگاه ترموسایکلر شرکت Takara انجام شد. توالی پرایمر های استفاده شده در این PCR در جدول ۱ آورده شده اند.

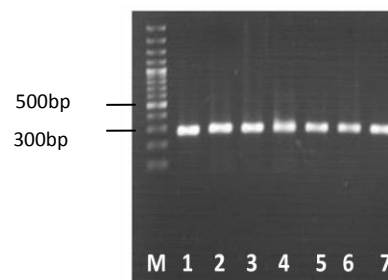
جدول ۱ توالی پرایمر های استفاده شده برای تکثیر اگزون ۲۰ و ۹ ژن *PIK3CA*

نام پرایمر	توالی پرایمر
Exon 9 psu	F 5'CTG AAA ATA AAG TCT TGC AAT GAA 3'
	R 5'TGT AAA TTC TGC TTT ATT TAT TCC 3'
Exon 9	F 5' TCC AGA GGG GAA AAA TAT GAC 3'
	R 5' TAT GGT AAA AAC ATG CTG AG 3'
Exon 20A	F 5' AGA CCT GAA GGT ATT AAC ATC 3'
	R 5' TCG AAT GTA TGC AAT GTC ATC 3'
Exon 20B	F 5' TGA TGC TTG GCT CTG GAA TG 3'
	R 5' ATG CTG TTT AAT TGT GTG GAA G 3'

پرایمر های مورد استفاده برای تکثیر اگزون ۹ یک ژن کاذب روی کروموزوم ۲۲q11.2 را نیز تکثیر می کردند (۱۶) برای از بین بردن امکان تکثیر این سودوزن یک جفت پرایمر دیگر (9Psu) طراحی شد و دمای اتصال تا حد ممکن بالا برده شد و شرایط تکثیر برای این پرایمر ها کاملاً بهینه شد سپس با استفاده از یک جفت پرایمر درونی این اگزون تکثیر شد. نمونه ای از الکتروفورز ژل آگارز اگزون شماره ۹ در شکل ۱ نشان داده شده است.

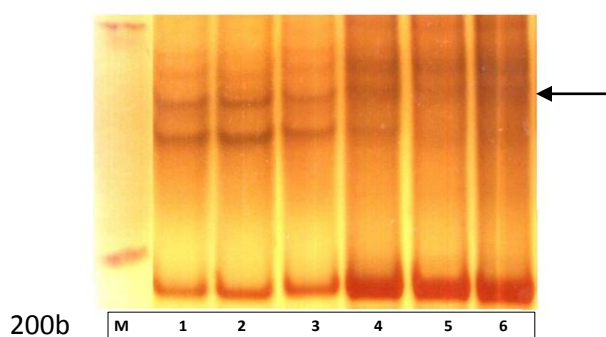
محصولات PCR به نسبت ۱:۱ با بافر بارگیری SSCP حاوی EDTA ۱۲ میلی مولار، برومو فنل بلو ۰.۰۵ درصد، زایلین سیانول FF ۰.۰۵ درصد، گلیسرول ۰.۰۶ درصد، فرمامید ۳۰ درصد و NaOH ۲۰ میلی مولار مخلوط شد سپس در دمای ۹۷ به مدت ۵

دقیقه دناتوراسیون انجام شد و سریعاً روی یخ قرار داده شد. ۵-۱۵ میکرو لیتر از این مخلوط روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد معمولی حاوی گلیسرول بارگیری شد و الکتروفورز در ولتاژ ۲۰۰ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ثابت ۴ در حضور بافر TBE 1X انجام شد سپس این ژل با روش رنگ آمیزی نترات نقره رنگ آمیزی شد. در شکل ۲ نمونه ای از ژل رنگ آمیزی شده پلی اکریل نشان داده شده است در این شکل نمونه های شماره ۴ کنترل مثبت و ۲ کنترل منفی نمونه های ۶ و ۵ نمونه های بیمار دارای جهش هستند. نمونه ۳ و ۱ نمونه های بیمار فاقد جهش می باشند.



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز اگزون شماره ۹ را نشان می دهد. M: DNA مارکر ۱۰۰ bp

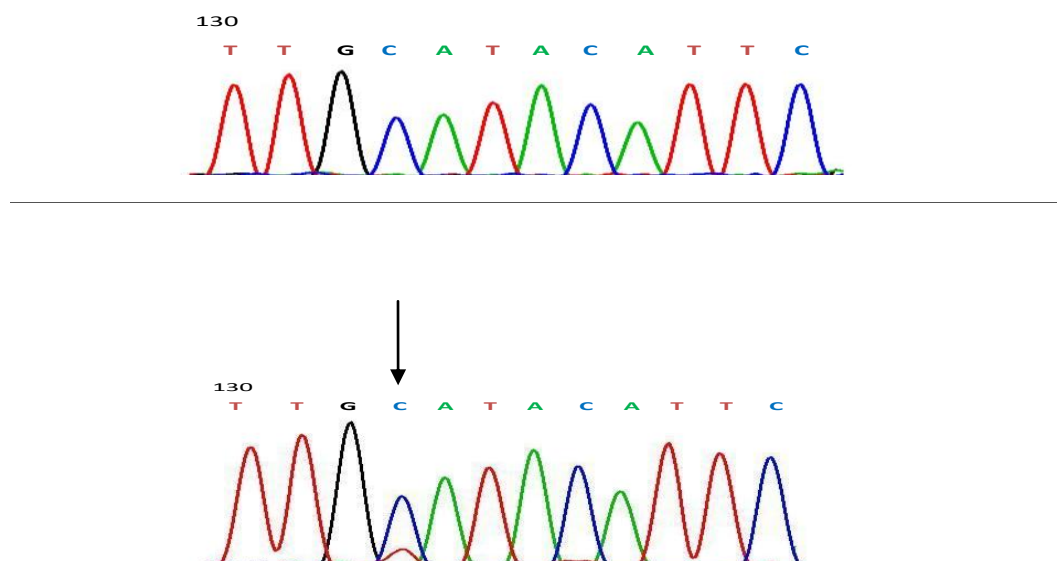
مراحل PCR و SSCP برای افزایش دقت و صحت نتایج سه بار تکرار شد. حساسیت SSCP تحت تاثیر طول محصول PCR می باشد به طوری که قطعات کوچکتر از 300bp برای SSCP مناسب ترند به همین دلیل برای اگزون ۲۰ دو جفت پرایمر طراحی شد. به منظور تایید نتایج تکنیک SSCP، و تعیین نوع جهش ها تعدادی از نمونه ها تعیین توالی شدند. به این منظور نمونه های هر اگزون پس از انجام PCR از ژل آگارز خالص سازی شدند برای استخراج و خالص سازی DNA، از کیت mi-Gel Extraction Kit شرکت Metabion استفاده شد. ارتباط بین جهش های *PIK3CA* با درگیری غدد لنفاوی ' سن بیمار '، مرحله پیشرفت بیماری و درجه تومور به وسیله آزمون مربع کای بررسی شد. بررسی های آماری به وسیله SPSS۱۶ انجام شد.



شکل ۲- بررسی جهش های اگزون ۲۰B به وسیله SSCP: در این شکل نمونه های شماره ۴ کنترل مثبت و ۲ کنترل منفی نمونه های ۶ و ۵ نمونه های بیمار دارای جهش هستند. نمونه ۳ و ۱ نمونه های بیمار فاقد جهش می باشند. (M: DNA مارکر ۱۰۰ bp)

یافته ها:

بیش از ۹۰٪ جهش های *PIK3CA* در سرطان رحم و سایر سرطان ها در اگزون ۹ و اگزون ۲۰ و تعداد کمی در اگزون ۱ رخ می دهند (۱۵). در این مطالعه جهش های *PIK3CA* در اگزون های ۹ و ۲۰ این ژن در سرطان جسم رحم در اصفهان و نمونه های دریافتی از انستیتو کانسر ایران در تهران بررسی شد. روش SSCP یک روش غربالگری اولیه برای تشخیص جهش است در مرحله بعد برای تایید جهش ها برخی از نمونه های مشکوک برای تعیین توالی فرستاده شدند. از جهش های مشاهده شده از ۵۰ نمونه تومور جسم رحم بررسی شده در اصفهان و تهران حدود ۴۷٪ جهش مشاهده شد که ۶۰٪ جهش ها در اگزون ۲۰ (دمین کاتالیتیک) و ۴۰ درصد در اگزون ۹ (دمین هلیکالی) رخ دادند. تعیین توالی اگزون ۲۰ جهش (C3059T) (A1020V) را نشان داد در شکل ۳ نتیجه تعیین توالی اگزون ۲۰ را مشاهده می کنید در بخش اول تعیین توالی یک نمونه کنترل منفی و شکل دوم تعیین توالی نمونه جهش دار اگزون ۲۰ را نشان می دهد. تعیین توالی اگزون ۹، جهش (E542K) G1624A که یک جهش متداول در این اگزون است و جهش دیگر، (R537Q) G1610A که تا به حال گزارش نشده را تایید کرد این جهش ها در نمونه های خون مشاهده نشدند در نتیجه این تغییرات چند شکلی های تک نوکلئوتیدی (SNP) نیستند.



شکل ۳ توالی نرمال و جهش یافته اگزون ۲۰، جهش لیفت تبدیل C به T شده است.

در این مطالعه هم چنین ارتباط بین جهش های *PIK3CA* با درگیری غدد لنفاوی، سن بیمار، مرحله پیشرفت بیماری و درجه تومور بررسی شد. در جمعیت مورد مطالعه ارتباط معنی داری بین جهش و درجه تومور مشاهده شد ($OR = 5.5$) و فراوانی Grade I,II و Grade III در افراد دارای جهش و فاقد جهش در جدول ۲ آورده شده است، اما ارتباط معناداری بین جهش با درگیری غدد لنفاوی ($\chi^2 = 0.107$ با $P=0.74$)، مرحله پیشرفت بیماری ($P=0.8$) و سن بروز بیماری ($P=0.12$) مشاهده نشد.

جدول ۲ فراوانی Grade I,II و Grade III در افراد دارای جهش و فاقد جهش

M+: بیماران دارای جهش در ژن مورد بررسی و M-: بیماران فاقد جهش در ژن

	Grade I,II	Grade III	Total
M+	۱۴	۷	۲۱
M-	۲۲	۲	۲۴
Total	۳۶	۹	۴۵

بحث:

فراوانی جهش های مشاهده شده در سرطان جسم رحم در مطالعات پیشین ۲۴ تا ۳۹ درصد گزارش شده بود. در این مطالعه حدود ۴۷ درصد جهش در این ژن مشاهده شد. تعیین توالی اگزون ۲۰ یک جهش (C3059T) را که قبلاً در مورد سرطان آندومتر گزارش نشده بود و فقط در مورد سرطان روده بزرگ دیده شده بود را تایید کرد (www.sanger.ac.uk). این جهش سبب تغییر اسید آمینه آلانین به والین می گردد (A1020V). در مطالعه ای که توسط خانم غربی و همکاران در جمعیت اصفهان انجام شد، این جهش در سرطان پستان نیز برای اولین بار گزارش شد (۱۷). این مشاهده می تواند نشان دهنده این مطلب باشد که عامل جهش زا در جمعیت مورد مطالعه ما با سایر جمعیت ها متفاوت است. تا به حال در مطالعات قبلی بیش از ۳۶ جهش در ۲۰ اگزون این ژن معرفی شده است. که جهش های H1047R یا A3140G جهش متداول اگزون ۲۰ و E545K یا G1633A و G1624A یا E542K جهش های متداول اگزون ۹ می باشند. تعیین توالی اگزون ۹، جهش G1624A (E542K) را نشان داد که باعث تغییر رمز اسید آمینه گلوتامیک اسید به لیزین می شود. اسید آمینه گلوتامیک اسید دارای بار منفی و قطبی، در حالیکه لیزین یک اسید آمینه بازی است. بنابراین می تواند ساختار پروتئین اثر بگذارد. جهش دیگر در اگزون ۹، G1610A (R537Q) است که تا به حال گزارش نشده این جهش باعث تبدیل اسید آمینه آرژنین به گلوتامین می شود. آرژنین یک اسید آمینه شدیداً بازی است در صورتی که گلوتامین خنثی است، بنابراین به نظر می رسد این جهش تأثیر زیادی بر روی ساختار پروتئین بگذارد. هم چنین در این مطالعه ارتباط معنی داری بین جهش و درجه بندی تومور مشاهده شد ($OR = 5.5$ و $P = 0.03$).

نتایج به دست آمده حاکی از این است که طیف سرطان رحم و نوع جهش در جمعیت مورد مطالعه ما با سایر جمعیت ها متفاوت است و جهش هایی مشاهده شد که تاکنون گزارش نشده است و می تواند نشان دهنده این مطلب باشد که عامل جهش زا در جمعیت مورد مطالعه ما با سایر جمعیت ها متفاوت است پس نیاز به بررسی نمونه های بیشتر و انواع دیگر سرطان وجود دارد.

Detection of mutations in PI3K gene in endometrial cancer in Iran

Masoumeh Elyasi¹, Manoochehr Tavasoli², Mehri Faghihi³, Simin Hemati⁴

Abstract

Background: The phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signaling pathway regulates a variety of biological processes including: Proliferation, motility, insulin metabolism and apoptosis. Activated PI3K phosphorylates phosphatidyl-inositol 4, 5 bisphosphate (PtdIns (4,5) P2), producing phosphatidyl-inositol 3, 4, 5 triphosphate (PtdIns (3,4,5) P3). This lipid activates Akt (protein kinase B). The frequency of *PIK3CA* mutations in endometrial cancer ranges from 24% to 39%. More than 90% of the mutations in *PIK3CA* have been localized in helical domain and the kinase domain.

Methods: In this study we have analyzed the presence of mutations in *PIK3CA* by means of single-strand conformational polymorphism (SSCP) and direct DNA sequencing in a population of Iranian endometrial cancer patients in the city of Isfahan and Tehran Cancer Institute. We have also investigated the correlation between *PIK3CA* mutations and lymph node involvement, age, histological stage and grade by Pearson Chi-Square analysis.

Finding: In the present study the frequency of *PIK3CA* mutation was 47%. 60% of mutations were identified in the kinase domain (exon 20). A novel mutation was found in codon 3059 of exon 20, C3059T (A1020V) which has not been reported previously in endometrial cancer. In addition to hotspot mutation of exon 9 G1624A, (E542K) we have also detected a novel mutation G1610A (R537Q) in exon 9. We found that *PIK3CA* mutations are mainly associated with histological grade of tumors (P=0.03 , OR=5.5), but we did not observed any significant correlation between *PIK3CA* mutations and lymph node involvement, stage or age of patients.

Conclusion: Our results show that the spectrum of *PIK3CA* mutations in our population is different and it shows a necessity for a larger number of samples and other types of cancers to be investigated.

Key words: Endometrial cancer, Mutation, Apoptosis, *PIK3CA*

¹ Student, Department of Biology, School of Sciences, The University of Isfahan, Isfahan, Iran.

² Associate Professor, Department of Biology, School of Sciences, The University of Isfahan, Isfahan, Iran

³ Associate Professor,

⁴ Assistant Professor, Department of Radiotherapy, School of Medicine, School Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

References :

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60(5): 277-300.

(گزارش کشوری ثبت موارد سرطانی ، ۱۳۸۳)

3. Bokhman J V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983; 15(1): 10-17

4. Hecht J, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol* 2006; 24(29): 4783-4791.

5. Oda K, Stokoe D, Taketani Y, McCormick F. High Frequency of Coexistent Mutations of PIK3CA and PTEN Genes in Endometrial Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 65(23): 10669-73.

6. Hirsch E, Braccini L, Ciraolo E, Morello F, Perino A, Twice upon a time: PI3Ks secret double life exposed. *Cell* 2009; 34(5): 244-248.

7. Vivanco I, Sawyers C L. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nature Rev* 2002; 2(7): 489-501.

8. Fry MJ. Structure, regulation and function of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1226(3): 237-268.

9. Vahaesebroeck K, Waterfield MD. Signaling by Distinc classes of Phosphoinositide 3-Kinase. *Exp Cell Res* 1999; 253(1): 239- 254.

10. Samuel Y, Wang Z, Bardeli A, Silliman N, Ptac J, Szabo SB, et al. High frequency of mutation of the PIK3CA gene in humen cancers. *Science* 2004; 304- 554.

11. Campbell IG, Russel SE, Choong DY, Montgomery KG, Civarella MI, Hooi CS, et al. Mutation of PIK3CA gene in ovarian and breast cance. *Cancer Res* 2004; 64(21): 7678- 7681.

12. Lee S, Choi EJ, Jin C, Kim DH. Activation of PI3K / Akt pathway reduction and PI3KCA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. *Gynecology* 2005; 97(1): 26- 34.

13. Catusus L, Gallardo A, Cuatrecasas M, Prat J. PIK3CA mutations in the kinase domain (exon 20) of uterine endometrial adenocarcinomas are associated with adverse prognostic parameters. *Mod Pathol* 2008; 21(2): 131–139.

14. Hayes MP, Wang H, Espinal-Witter R, Douglas W, Solomon GJ, Baker SJ, et al. PIK3CA and PTEN Mutations in Uterine Endometrioid Carcinoma and Complex Atypical Hyperplasia. *Clin Cancer Res* 2006; 12(20): 5932-5935.

15. Bachman KE, Argani p, Sael Y, Silliman N, Ptak J, Szobo S, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancer. *Cancer Biol Ther* 2004; 3(8): 772-775.

16. Qiu W, Schonleben F, Li X, Ho DJ, Close LG, Manolidis S, et al. PIK3CA Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12(5): 1441-1446.

17. Gharbi S, Faghihi M, Tavassoli M. A novel PIK3CA hotspot mutation in Isfahanian breast cancer patients *Cancer Inves.* 2011; Inpress.