

Naše zkušenosti s analýzou genu *PTEN* u pacientů s podezřením na Cowdenovou syndrom

Our Experience with Analysis of the *PTEN* Gene in Patients Suspected of Having Cowden Syndrome

Vasovčák P.¹, Foretová L.², Puchmajerová A.¹, Šenkeříková M.³, Martínek J.⁴, Křepelová A.¹

¹ Ústav biologie a lékařské genetiky, FN Motol a 2. LF UK, Praha

² Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů, Masarykův onkologický ústav, Brno

³ Oddělení lékařské genetiky, FN Hradec Králové

⁴ Oddělení hepatogastroenterologie, IKEM, Praha

Súhrn

Východiská: Cowdenovej syndróm (CS) je vzácne autozomálne dominantné ochorenie so zvýšeným rizikom vzniku rakoviny prsníka, štítnej žľazy a maternice. Medzinárodné Cowdenovej konzorcium definovalo striktné diagnostické kritériá pre jednotlivcov aj rodiny s podezrením na CS. **Súbor pacientov a metódy:** Analyzovali sme genomovú DNA 16 pacientov prostredníctvom sekvenacej analýzy a metódou MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). **Výsledky:** U dvoch pacientov sme našli zárodočné mutácie, c.825_840del, resp. c.438delT. Oba pacienti spĺňali prísne diagnostické kritériá. Ostatní pacienti, s výnimkou jedného, ktorí nespĺňali tieto kritériá, neboli nositeľmi žiadnej patologickej varianty. Pacienti nespĺňajúci striktné diagnostické kritériá boli do štúdie zaradení na základe symptómov, ktoré patria medzi veľké kritériá CS, ale nie patognomické. **Záver:** Naše výsledky a informácie získané z odborných publikácií naznačujú, že striktné medzinárodné kritériá sú dobre definované a analýza tzv. CS-like pacientov nemá veľký prognostický význam.

Klíčové slová

Cowdenovej syndróm – rakovina prsníka – rakovina štítnej žľazy – hamartómy – mukokutánne lézie

Summary

Backgrounds: Cowden syndrome (CS) is a rare autosomal dominant disorder with an increased risk of breast, thyroid and uterine cancer development. The International Cowden Consortium has defined strict diagnostic criteria for individuals and families suspected of having CS. **Patients and methods:** We analyzed the genomic DNA of 16 patients by sequencing analysis and MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) method. **Results:** We found germline mutations, c.825_840del, resp. c.438delT, in 2 patients. Both patients fulfilled strict diagnostic criteria. The other patients, except one, who did not fulfil the criteria, did not harbour any pathogenic mutation. Patients not fulfilling strict diagnostic criteria were included in the study according to major CS criteria but not pathogenic. **Conclusion:** Our results and information from relevant articles show that strict international criteria are well established and analysis of „CS-like“ patients has no significant prognostic meaning.

Key words

Cowden syndrome – breast cancer – thyroid cancer – hamartomas – mucocutaneous lesions

Práca bola podporená MZOFNM2005.

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

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

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

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



RNDr. Peter Vasovčák

Ústav biologie a lékařské genetiky

FN Motol a 2. LF UK

V Úvalu 84

150 06 Praha 5

e-mail: pevas78@centrum.cz

Obdrženo/Submitted: 11. 12. 2009

Přijato/Accepted: 2. 2. 2010

Úvod

Cowdenovej syndróm (OMIM 158350), ochorenie s odhadovanou frekvenciou výskytu 1 : 200 000, sa vyznačuje mnohopočetnými benígnymi hamartómami, ktoré sa najčastejšie vyskytujú v koži, štítnej žľaze, prsníkoch, gastrointestinálnom trakte a mozgu [1–2]. Príčinou tohto ochorenia sú zárodočné mutácie génu *PTEN* (OMIM 601728) nachádzané u 80 % pacientov s CS [2]. Stanovenie diagnózy CS býva problematické kvôli variabilnej expresivite a pleiotropii tohto ochorenia. Medzi patognomické znaky CS patria mukokutánne lézie, nachádzané u 99 % pacientov pred 30. rokom života [3]. Rakovina prsníka a štítnej žľazy sú dve najčastejšie malignity spojené s týmto syndrómom. Patria medzi veľké kritériá spoločne s rakovinou maternice a makrocefáliou. Celoživotné riziko rakoviny prsníka u žien s CS je 25–50 %, v porovnaní s 11 % všeobecnej populácie. Celoživotné riziko rakoviny štítnej žľazy je 10 % u mužov aj žien. Z histologického hľadiska ide najčastejšie o folikulárny, výnimočne papilárny karcinóm štítnej žľazy. Riziko rakoviny endometria sa odhaduje na 5–10 % [4–5].

Kritériá CS prevzaté z NCCN sú každoročne aktualizované
NCCN v.1.2009

Patognomické kritériá:

- Lhermittovo-Duclosovo ochorenie, LDD (dysplastický gangliocytóm mozočku)
- mukokutánne lézie
- trichilemómy (v oblasti tváre a hlavy)
- akrálne keratózy
- papilómy pier a bukalnej sliznice

Veľké kritériá:

- rakovina prsníka
- nemedulárny karcinóm štítnej žľazy
- makrocefália (nad 97. percentilom)
- rakovina maternice

Malé kritériá:

- benígne nálezy štítnej žľazy (adenómy, struma, uzly)
- mentálna retardácia (IQ pod 75)
- gastrointestinálne hamartomatózne polypy
- fibrocystické ochorenie prsníkov
- lipómy
- fibrómy

Tab. 1. Pacienti s podozrením na CS.

pacient č.	vek v čase diagnózy	príbuzní	analýza BRCA1/2
1*	makrocefália, polypóza GIT 14, papilomatóza pier, akrálne keratózy	/	
2*	makrocefália, struma 34, meningeóm 49, polypóza GIT, k. šž. 54	/	
3	k. p. 43, k. šž. 45	/	+
4	k. p. 46	dcéra – k. šž. 29	+
5	benígny k. p. 27, k. šž. 53	sestra – k. p. 56, sestra – k. p. 61	+
6	k. p. 43	paternálna teta – k. p. 59	+
7	k. p. 46	sestra – k. šž. 25 matka – k. p. 60, sestra – k. p. 47	+
8	k. p. 53	mat. sesternica – k. šž. 67 dcéra mat. sesternice – k. šž. 46	+
9*	k. p. 31, verrukoidné lézie	matka – k. p. 51, brat – t. t. 20, k. šž. 29	+
10	k. šž. 26, k. p. 36	/	+
11	strumektómia?, dysplázia prsníkov?	brat hypofunkčná struma?, sestra dysplázia prsníkov?	–
12	k. p. 23	matka – k. šž. 40	–
13	k. p. 37	matka matky – k. šž.?, brat matky k. šž.?	–
14	k. šž. 33, bazalióm, papilóm	matka matky – k. p. 67	–
15	adenóm šž. 20, polypy, cysta prsníka	matka – melanóm 50, otec – k. šž. 51	–
16	k. p. 49, melanóm 51, k. rektosigmoideum 54, 2× bazalióm	/	–

GIT – gastrointestinálny trakt, k. p. – karcinóm prsníka, k. šž. – karcinóm štítnej žľazy, t. t. – testikulárny tumor, mat. – maternálna, * – pacienti spĺňajúci kritériá, ? – vek v čase diagnózy neudaný

- genitourinárne nádory (hlavne karcinóm obličky)
- genitourinárne malformácie
- fibroidy maternice

Diagnostické kritériá pre jedinca s podozrením na CS:

- ktorékoľvek patognomické kritérium (LDD a/alebo mukokutánne lézie)
- mukokutánne lézie samostatne ak:
 - 6 a viac tvárových papuliek, z ktorých minimálne 3 musia byť trichilemómy
 - kožné tvárové papulky a ústna slizničná papilomatóza

- ústna slizničná papilomatóza a akrálne keratózy
- 6 a viac palmoplantárnych keratóz
- dve alebo viac veľkých kritérií (jedno musí byť makrocefália)
- jedno veľké a minimálne tri malé kritériá
- štyri a viac malých kritérií

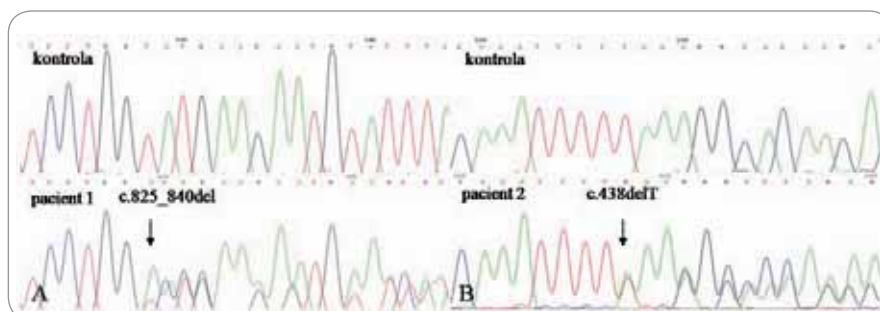
Diagnostické kritériá pre jedincov v rodinách s potvrdeným CS:

- patognomické kritérium
- jedno veľké s alebo bez malého kritériá
- dve malé kritériá
- anamnéza BRRS (Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrómu)

Súbor pacientov a metódy

Celkovo bolo analyzovaných 16 pacientov (15 žien a 1 muž) s podozrením na CS (tab. 1). Traja pacienti spĺňali diagnostické kritériá. Ostatní boli zaradení do štúdie na základe symptómov patriacich medzi hlavné diagnostické kritériá CS, ale nespĺňali striktné operačné kritériá stanovené medzinárodným CS konzorciom. Pacienti nespĺňajúci CS kritériá boli zaradení na základe výskytu rakoviny prsníka a/alebo nemedulárneho karcinómu štítnej žľazy. Boli bez mukokutánnych lézií a/alebo makrocefálie. Osem žien pred zaradením do nášho súboru bolo negatívne testovaných na *BRCA1* a *BRCA2* mutácie.

Všetci pacienti podpísali informovaný súhlas s genetickým vyšetrením. Ich DNA bola izolovaná z periférnej krvi prostredníctvom izolačného kitu (Gentra). Genomová DNA bola amplifikovaná primermi prekrývajúcimi všetkých deväť kódujúcich exónov. Po prečistení PCR produktov purifikačným kitom (Bioline) bola prevedená sekvenčná reakcia s BigDye Terminator v3.1 sekvenčným kitom a automatická analýza pomocou 3100-Avant genetického analyzátoru (ABI). Vzorky s negatívnym výsledkom boli potom analyzované me-



Obr. 1. Sekvenčný elektroforeogram: A – posunová mutácia v 8. exóne (delícia 16 nukleotidov), B – delícia T v 5. exóne.

tódou MLPA, kitom SALSA MLPA KIT P225-A1 *PTEN* (MRC Holland) na odhľadanie prípadných veľkých prestavieb génu *PTEN*.

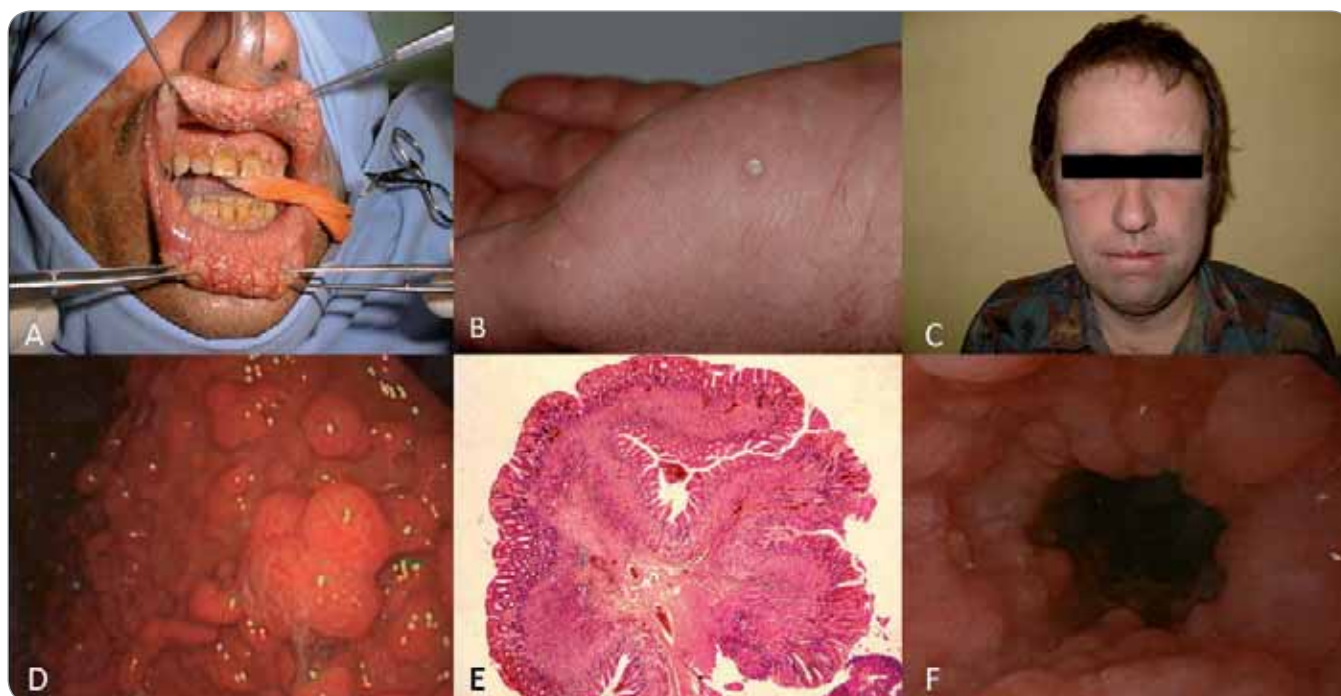
Výsledky

Zo 16 nepribuzných pacientov, u ktorých bola uskutočnená mutačná analýza génu *PTEN*, sme našli zárodočné mutácie u dvoch z nich. Obaja spĺňali prísne diagnostické kritériá.

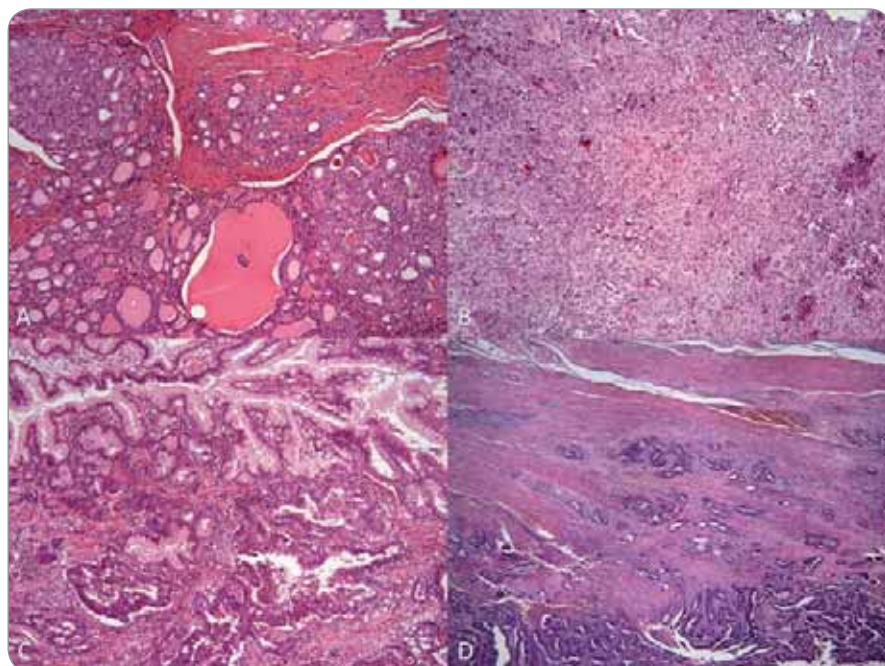
Prvým pozitívne testovaným pacientom bol 36-ročný muž, ktorý už bol publikovaný, a je nositeľom zárodočnej mutácie c.825_840del (obr. 1A) [6]. Do nemocnice bol prijatý pre opakované žalúdočné záchvaty a tam bol podro-

bený gastrointestinálnemu vyšetreniu, ktoré odhalilo mnohopočetné polypy. Histologické vyšetrenie potvrdilo hyperplastické a hamartomatózne polypy v žalúdku a taktiež zápalové polypy a adenómy v hrubom čreve. Ďalej bola diagnostikovaná glykogénna akantóza, rozsiahla papilomatóza pier, tri plantárne keratózy a makrocefália (obr. 2). Ultrasonografia štítnej žľazy odhalila niekoľko uzlov. Struma a karcinóm neboli potvrdené. Otec probanda bol bez klinických príznakov CS a matka spáchala samovraždu v 33 rokoch. Pacient nemá žiadnych súrodencov a je bezdetný.

Ďalším pozitívne testovaným pacientom bola 55-ročná žena, u ktorej sme



Obr. 2. Pacient 1: A – rozsiahla papilomatóza pier, B – akrálne keratózy, C – makrocefália, D – polypóza žalúdka, E – histologický preparát hyperplastického polypu žalúdka, F – glykogénna akantóza.



Obr. 3. Pacient 2: histologické preparáty: A – folikulárny karcinóm štítnej žľazy, B – meningeóm, C – hyperplastický polyp žalúdka s adenokarcinómom, D – tubulárny adenokarcinóm hrubého čreva

zistili zárodočnú mutáciu c.438delT (obr. 1B) (sub. Familial Cancer). Do 34 rokov, keď bola u nej zistená struma, nemala žiadne vážnejšie ochorenie. O 9 rokov neskôr podstúpila hysterektómiu pre myomatózu a adnexektómiu pre adenopapilokarcinóm ľavého vaječníka. O dva roky neskôr bola vykonaná strumektómia a histologické vyšetrenie potvrdilo makrofolikulárny adenóm v ľavom laloku a uzavretý nádor v pravom laloku. V 54 rokoch jej pre folikulárny karcinóm bola kompletne odstránená štítna žľaza. Ako 49-ročná bola hospitalizovaná kvôli epileptickým paroxyzmálnym záchvatom. CT vyšetrenie mozgu ukázalo ľavostrannú frontálnu léziu, ktorá bola chirurgicky odstránená a klasifikovaná patológom ako benígny meningeóm. Pacientka bola opakovane chirurgicky liečená kvôli rekurencii meningeómu a zhoršujúcemu sa stavu v 53 a 57 rokoch. Komplexné vyšetrenie pri prvej detekcii meningeómu odhalilo mnohopočetné polypy v žalúdku, duodene a hrubom čreve. Histologicky boli klasifikované ako hyperplastické zápalové polypy a tubulovilózne a vilózne adenómy (obr. 3). V 57 rokoch, po niekoľkých predchádzajúcich biopsiách s negatívnym nálezom, bol u nej potvrdený adenokarci-

nóm v hyperplastickom polype žalúdka. O rok neskôr bol zistený aj agresívne rastúci synchronný adenokarcinóm anorekta a sigmoidea. Bola vykonaná Milesova operácia. Pacientka zomrela mesiac po zákroku kvôli pooperačným komplikáciám. O rodičoch a súrodencoch pacientky sa nám nepodarilo získať žiadne informácie. Syn, ktorý je bez príznakov CS, bol negatívne testovaný.

Ďalší pacienti, s výnimkou pacientky, u ktorej bol diagnostikovaný karcinóm prsníka v 31 rokoch a verukoidné lézie (nepodarilo sa zistiť počet ani lokalizácia), boli výlučne ženy s karcinómom prsníka a/alebo štítnej žľazy bez ďalších symptómov typických pre CS. Makrocefália alebo kožné zmeny u týchto pacientiek neboli zaznamenané alebo táto informácia nebola dostupná. Na koľko tieto kožné zmeny môžu byť veľmi diskrétné, poprípade prehliadané z dôvodu, že sa bežne vyskytujú aj u zdravých jedincov populácie, bolo ich zaradenie do súboru odôvodnené. Na druhej strane, metaanalýzou všetkých dostupných článkov zaoberajúcich sa problematikou CS sme zistili, že bol zaznamenaný len jediný prípad pacienta s CS bez mukokutánných lézií a LDD [7]. V súlade s literatúrou mutácie génu

PTEN sa v rodinách s rakovinou prsníka, resp. štítnej žľazy, nachádzajú vzácné [7–10]. Marsh et al uskutočnili mutačnú analýzu 64 nepríbuzných v „CS-like“ rodinách, kde aspoň jeden člen rodiny mal nemedulárny karcinóm štítnej žľazy a druhý minimálne karcinóm prsníka v akomkoľvek veku. Testovali taktiež pacientov s rakovinou prsníka alebo štítnej žľazy spoločne s ďalším kritériom CS, avšak bez spĺňajúcich CS kritérií. V jednom prípade našli zárodočnú mutáciu (c.209T > C) u 31-ročného pacienta s karcinómom štítnej žľazy, ktorého matka mala diagnostikovaný adenokarcinóm prsníka v 49 a 53 rokoch. Obaja boli bez kožných lézií a makrocefálie [7].

Na základe našich výsledkov a informácií získaných z relevantných publikácií môžeme povedať, že u pacientov bez patognomických kritérií, hlavne mukokutánných lézií, spoločne s niektorým s ďalších kritérií CS, má analýza génu *PTEN* mizivú úspešnosť záchytu zárodočných mutácií. Z tohto dôvodu detailné klinické vyšetrenie jedinca s podozrením na CS, zvlášť akýchkoľvek mukokutánných lézií, je mimoriadne dôležité a malo by byť uvedené pri odporúčaní na genetické vyšetrenie.

Literatura

1. Lloyd KM 2nd, Dennis M. Cowden's disease. A possible new symptom complex with multiple system involvement. *Ann Intern Med* 1963; 58: 136–142.
2. Nelen MR, van Staveren WC, Peeters EA et al. Germline mutations in the *PTEN/MMAC1* gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet* 1997; 6(8): 1383–1387.
3. Eng C. *PTEN*: one gene, many syndromes. *Hum Mutat* 2003; 22(3): 183–198.
4. Starink TM, van der Veen JP, Arwert F et al. The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients. *Clin Genet* 1986; 29(3): 222–233.
5. Waite KA, Eng C. Protean *PTEN*: form and function. *Am J Hum Genet* 2002; 70(4): 829–844.
6. Vasovcak P, Krepelova A, Puchmajerova A et al. A novel mutation of *PTEN* gene in a patient with Cowden syndrome with excessive papillomatosis of the lips, discrete cutaneous lesions, and gastrointestinal polyposis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19(6): 513–517.
7. Marsh DJ, Dahia PL, Caron S et al. Germline *PTEN* mutations in Cowden syndrome-like families. *J Med Genet* 1998; 35(11): 881–885.
8. Chen YM, Ott DJ, Wu WC et al. Cowden's disease: a case report and literature review. *Gastrointest Radiol* 1987; 12(4): 325–329.
9. Tsou HC, Teng DH, Ping XL et al. The role of *MMAC1* mutations in early-onset breast cancer: causative in association with Cowden syndrome and excluded in *BRCA1*-negative cases. *Am J Hum Genet* 1997; 61(5): 1036–1043.
10. Ueda K, Nishijima M, Inui H et al. Infrequent mutations in the *PTEN/MMAC1* gene among primary breast cancers. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89(1): 17–21.