



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Molecular pathology of colorectal cancer predisposing syndromes**

Puijenbroek, M. van

### **Citation**

Puijenbroek, M. van. (2008, November 27). *Molecular pathology of colorectal cancer predisposing syndromes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13286>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13286>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

# **CHAPTER 11**

**Nederlandse samenvatting**

**Curriculum vitae**

**List of additional publications**



## Nederlandse samenvatting

Dikke darmkanker (colorectaal carcinoom, CRC) is de op een na meest voorkomende doodsoorzaak in de westerse wereld. In Nederland worden elk jaar circa 11000 nieuwe gevallen gediagnosticeerd. Ongeveer de helft zal hieraan overlijden. Voor de algemene bevolking is het risico om CRC te ontwikkelen gedurende het leven bij benadering 4%, dus 1:25 personen krijgt darmkanker. Aan de oorzaak van CRC kunnen meerdere factoren ten grondslag liggen, enerzijds erfelijke hoog en laag risico factoren, anderzijds omgevingsfactoren inclusief de rol van de individuele levensstijl.

DNA is de essentie van erfelijkheid, de opslagplaats van alle informatie die nodig is om een mens "te bouwen". Het erfelijk materiaal is verankerd in de chromosomen (elke cel heeft 46 chromosomen; 23 chromosomen van vader en 23 van moeder). De informatie voor een kenmerk (bv. oogkleur) die aanwezig is op een chromosoom, wordt gen genoemd. De vorm (bv. blauw) waarin een bepaald gen zich manifesteert in het DNA van een chromosoom, wordt allel genoemd.

Dikkedarm tumoren zijn het gevolg van een reeks van opeen stapelende DNA fouten waarbij het normale darmslijmvlies uiteindelijk verandert in een kankerproces.

De tumorontwikkeling bij CRC kan worden verdeeld in twee verschillende richtingen, te weten; chromosomale instabiliteit (CIN) en microsatelliet instabiliteit (MIN, MSI). Chromosomale instabiliteit wordt gekenmerkt door variaties in het aantal kopieën van een chromosoom waaronder chromosoom (arm) vermeerdering, chromosoom (arm) verlies en zogenaamd kopieneutraal verlies van heterozygositeit. Microsatelliet instabiliteit wordt gekenmerkt door kleine DNA deleties en inserties in korte repeterende DNA-stukjes (bijvoorbeeld CGCGCGCGCGCGCG). Naast CIN en MIN kunnen ook zogenaamde epigenetische veranderingen plaatsvinden gedurende de tumorontwikkeling. Dit proces kenmerkt zich door methyleringsveranderingen, een modificatie van het DNA in de cellen zonder wijziging in de DNA sequentie volgorde. Deze veranderingen leiden tot wijzigingen in genfunctie.

Het spectrum van CRC kan in twee klinische groepen worden verdeeld: sporadisch en familiair CRC. Met sporadisch wordt bedoeld dat er geen andere gevallen van dikke darmkanker worden gevonden in de familie. De meeste patiënten (65-90%) behoren tot deze groep. Zij ontwikkelen CRC meestal op oudere leeftijd (gemiddeld 70 jaar). De tweede groep bestaat uit 10-35% van alle CRC gevallen hierbij zijn er meer CRC patiënten binnen de familie. Slechts een klein deel van deze groep kan worden verklaard door bekende hoog penetrante erfelijke syndromen zoals het Lynch syndroom (eerder HNPCC genaamd) en familiale adenomateuze polyposis (FAP). Lynch syndroom betreft een erfelijke aandoening met vaak rechts in de buik gelegen dikke darmkanker en relatief weinig dikke darmpoliepen. Het syndroom ontstaat door erfelijke kiembaanmutaties in de genen *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* of *PMS2*. FAP-patiënten hebben juist heel veel poliepen

(adenomen) met een hoge kans dat een of meerdere hiervan zich kwaadaardig ontwikkelen. Het ziektebeeld wordt voornamelijk veroorzaakt door kiembaanmutaties in het *APC* gen. Het is reeds voldoende om de ziekte te krijgen als deze mutatie van een van de ouders wordt geërfd (een zogenaamd autosomaal dominant overervings patroon) dan wel nieuw ontstaan is. Een deel van de patiënten met adenomateuze polyposis kan verklaard worden door *MUTYH*-geassocieerde polyposis (MAP). Het onderliggende lijden wordt verklaard door twee kiembaan mutaties in *MUTYH*, geërfd van beide ouders (een autosomaal recessief overervings patroon). Voor veel individuen met familiair darmkanker is de reden nog onverklaard. Het risico van personen uit onverklaarde darmkankerfamilies om gedurende het leven CRC te ontwikkelen in vergelijking met de algemene bevolking is > 2 keer verhoogd wanneer een individu een aangedane eerstegraads verwant heeft. Het risico is > 3 keer verhoogd in vergelijking met de algemene bevolking wanneer de eerstegraads verwant jonger is dan 50 jaar op het moment van diagnose. Mogelijk zijn enkele onverklaarde familierisico's aan nog niet geïdentificeerde erfelijke hoogrisicofactoren toe te schrijven. Een andere optie zou een combinatie van verschillende erfelijke laagrisicofactoren kunnen zijn. Van omgevingsfactoren, als de westerse leefstijl; alcohol consumptie, roken, dieet en vetzucht is bekend dat ze in enige mate bijdragen aan het risico op CRC.

Dit proefschrift beschrijft de zoektocht naar analyses in de moleculaire pathologie die een rol kunnen spelen in het identificeren van individuen met een verhoogd risico op dikke darmkanker gebaseerd op onderliggende erfelijke oorzaken en die het mogelijk maken inzicht te verkrijgen in de tumorontwikkeling bij familiair CRC.

Het beschreven werk kan ruwweg worden verdeeld in:

- 1) Het toepassen van betrouwbare moleculaire analyses in formaline gefixeerd in paraffine ingebed (FFPE) weefsel. Dit laatste is bijzonder belangrijk omdat het gros van het tumor weefsel van familiale dikke darmkanker patiënten alleen beschikbaar is als FFPE materiaal.

- 2) Karakterisering van tumor materiaal waardoor richting gegeven kan worden aan genetische test strategie en klinisch genetische besluitvorming maar tevens wordt ook inzicht verkregen in de tumorgenese in familiair dikke darmkanker (inclusief Lynch syndroom en *MUTYH* geassocieerde polyposis) en het bestuderen van de rol van de genen; *CHEK2* en *PTPRJ*.

De CRC tumoren van individuen die voldoen aan een aantal klinische criteria (jonge leeftijd dan wel meerdere individuen in de familie met CRC) dienen te worden geanalyseerd op microsatelliet instabiliteit en eiwitexpressie van de mismatch herstel (MMR) eiwitten (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*). Deze analyses maken het mogelijk om het patiënten met Lynch syndroom te identificeren en richting te geven aan mogelijke aanvullende kiembaanmutatie analyses. Wanneer eenmaal een kiembaanmutatie in één van de MMR genen wordt gevonden, kunnen familieleden op de aanwezigheid van de geïden-

tificeerde mutatie worden onderzocht. De dragers van de mutatie kunnen vervolgens worden gescreend op darmslijmvlies afwijkingen zodat deze in een vroeg stadium van eventuele tumor ontwikkeling kunnen worden verwijderd. In **hoofdstuk 2** werd de opbrengst van microsatelliet instabiliteits (MSI) analyse geëvalueerd; enerzijds in families verdacht voor Lynch syndroom, anderzijds in een groep die niet aan de klinische criteria voldeden. Uit de resultaten bleek dat het beter is families met drie of meer gevallen van CRC gediagnostiseerd > 50 jaar oud, in de test schema's te includeren en de indicatie leeftijd voor MSI analyse op te trekken van 45 naar 50 jaar. Daarnaast werden de resultaten van de immunohistochemische (IHC) kleuringen vergeleken met die van de MSI analyse en werd de additionele waarde van de PMS2 kleuring bestudeerd. De PMS2 kleuring leidde tot de identificatie van een additionele 23% *MLH1* kiembaan mutatie dragers. Gebaseerd op dit deel van de studie was het advies, de PMS2 kleuring op te nemen in het panel van MMR antilichamen (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*) voor het identificeren van families die in aanmerking komen voor mutatie analyse.

In **hoofdstuk 3** werden de patronen van genomische abnormaliteiten van microsatelliet instabiele (MSI-high) FFPE carcinomen bestudeerd met "genoom omvattende enkel nucleotide polymorfisme arrays" (SNP arrays). Drie groepen MSI-high carcinomen werden samengesteld, de eerste groep bestond uit carcinomen van dragers van pathogene kiembaanmutaties in één van de MMR genen. De tweede groep was samengesteld uit carcinomen van niet geclassificeerde varianten (UVs) in de MMR genen, de derde groep bevatte carcinomen met sporadische hypermethylering van de *MLH1* promotor. Wij identificeerden verschillende chromosomale afwijkingen in de drie MSI-high carcinoma groepen, hoewel deze verschillen subtiel waren. Interessant was het verhoogde aantal chromosomale afwijkingen in carcinomen van MMR-UV dragers in vergelijking met pathogene MMR mutatie dragers. Blijkbaar, ontstond additionele CIN bij de aanwezige microsatelliet instabiliteit in deze MMR-UVs tijdens tumor ontwikkeling. Dit zou kunnen suggereren dat dergelijke additionele CIN voor tumorontwikkeling in gevallen met een *a priori* zwak mutator effect noodzakelijk is. Om deze bevinding beter te kunnen onderbouwen, lijkt het logisch de studie uit te breiden; meerdere carcinomen van patiënten met eenzelfde UV moeten verzameld worden en de genomische tumor patronen zullen moeten worden bestudeerd. Afhankelijk van de resultaten zal deze SNP array benadering nuttig kunnen zijn om naast de reeds gebruikte hulpmiddelen (MSI analyse, IHC van MMR proteïnen, segregatie analyse en functionele analyses) inzicht te verschaffen in de pathogeniciteit van MMR-UVs.

Om MAP families te identificeren die niet aan de klinische criteria voldeden, en dus niet in aanmerking kwamen voor kiembaan *MUTYH* onderzoek, bestudeerden wij de haalbaarheid van het uitvoeren van een onderzoekmethode die een specifieke *KRAS2* mutatie (c.34 G> T) analyseert. Deze specifieke *KRAS2* mutatie wordt gevonden in 60% van de carcinomen van MAP patiënten en is zeldzaam in dikke darmcarcinomen van an-

dere origine. Bij detectie van de *KRAS2* mutatie in onze studie werd deze analyse gevolgd door een mutatie analyse van de drie meest voorkomende *MUTYH* mutaties in Nederland (*MUTYH* hotspots). In **hoofdstuk 4** hebben wij FFPE tumoren getest, van individuen met <10 adenomen of patiënten met een microsatelliet stabiele dikke darmtumor met <10 additionele poliepen (adenomen), op somatische DNA-veranderingen in *KRAS2* en op drie Nederlandse hotspot *MUTYH* kiembaanmutaties (p.Tyr165Cys, p.Gly382Asp en p.Pro391Leu). Wij waren in staat met deze benadering bi-allelische *MUTYH* mutatie dragers te identificeren. Daarom adviseren wij om dit onderzoek van tumoren op aanwezigheid van de *KRAS2* c.34G >T mutatie bij positiviteit te vervolgen met *MUTYH* hotspot mutatie analyse en deze combinatie van analyses te implementeren in de moleculaire diagnostiek voor het opsporen van mogelijk erfelijke vormen van darmkanker. Wanneer een heterozygote hotspot *MUTYH* verandering wordt geïdentificeerd, moet een volledig kiembaan *MUTYH* mutatie onderzoek worden uitgevoerd op DNA uit bloed. Tevens is de directe hotspot *MUTYH* mutatie analyse een praktisch alternatief voor patiënten met >10 adenomen of in gevallen van veelvoudige CRCs in één generatie waarvan slechts FFPE weefsel beschikbaar is.

Zoals eerder genoemd zijn er in CRC twee klassieke wegen die tot tumorontwikkeling leiden; CIN en MIN cq MSI. Het proces dat in *MUTYH*-geassocieerde polyposis (MAP) tot tumor formatie leidt is nog niet compleet ontrafeld. In **hoofdstuk 5** analyseerden wij 26 MAP carcinomen, gebruik makend van SNP arrays. Een hoge frequentie kopienummer neutraal verlies van heterozygositeit (cnLOH) werd gevonden in deze carcinomen. Dit betekent dat er verlies heeft plaats gevonden van een paternaal of een maternaal allel. Het allel dat overbleef is gedupliceerd zodat er weer twee allelen zijn. Dit proces wordt mitotische recombinatie genoemd. De bevindingen suggereren een relatie tussen mitotische recombinatie en deficiëntie van het base excisie herstel mechanisme (BER) waar het *MUTYH* gen deel vanuit maakt. Echter verder onderzoek naar deze mogelijke relatie is belangrijk.

In **hoofdstuk 6** werd een tak van een Lynch syndroom familie waarin zowel een *MSH6* als twee *MUTYH* kiembaan mutaties voorkomen bestudeerd. Eén patiënt droeg alle drie de veranderingen en had een uiterst mild klinisch beeld met tot op heden slechts enkele adenomen. Wij concludeerden dat een defect in zowel *MSH6* mismatch herstel en base excisie herstel wellicht niet goed naast elkaar kan bestaan. Cellen die alle drie de defecten dragen hebben wellicht maar een kleine kans om te overleven.

Het is essentieel dat mogelijke genetische risicofactoren, die leiden tot een hogere kans op CRC beschreven in de literatuur, in goed gedefinieerde CRC cohorten met controle groepen worden geverifieerd. Wij kozen twee methoden met een hoge doorvoersnelheid om beschreven mogelijke genetische risicofactoren te bestuderen (**hoofdstuk 7** en **hoofdstuk 8**). In **hoofdstuk 7** onderzochten we de rol van *PTPRJ*- c.827A>C in familiair CRC met de MassEXTEND LOH analyse. *PTPRJ* behoort tot de eiwit tyrosine fosfatase

familie. Deze familie bestaat uit signaal moleculen die verschillende processen in de cel regelen waaronder celgroei, celdifferentiatie en er is gesuggereerd dat ze mogelijk functioneren als een tumoronderdrukker in darmkanker. Wij beschreven dat de impact van de nieuw geïdentificeerde *PTPRJ*- c.827A>C beperkt lijkt te zijn in familiale CRC. Verder concludeerden wij dat de MassEXTEND LOH analyse (gebruik makend van Sequenom MassARRAY software) een sensitieve, kosteneffectieve analyse is met een hoge doorvoersnelheid om LOH van SNPs te bestuderen in gearhiveerd tumor weefsel.

In **hoofdstuk 8** werd de rol van de *CHEK2*\*1100delC mutatie bestudeerd. CHEK2 speelt een rol in DNA herstel, in celdeling en celdood. Een immunohistochemische pre-screening met een CHEK2 antilichaam werd uitgevoerd op 564 tumoren afkomstig van familiale darmkanker patiënten die op "tissue micro array's" (TMAs) waren samengevoegd. Wij identificeerden drie patiënten met een *CHEK2*\*1100delC mutatie één van deze patiënten had twee *CHEK2*\*1100delC mutaties, welke niet leidde tot een evident klinisch beeld. Tevens werd verlies van eiwitexpressie van CHEK2 in familiair CRC in een beperkt deel door de *CHEK2*\*1100delC verklaard, het expressie verlies kon niet worden verklaard door *CHEK2* kiembaan varianten R117G, R137Q, R145W, I157T, en R180H. IHC pre-screening van TMAs is een betrouwbare pre-screenings methode voor *CHEK2*\*1100delC. Het nadeel van deze methode met hoge doorvoersnelheid is dat de te onderzoeken mutatie moet leiden tot afschakeling van het betreffende eiwit en een antilichaam voorhanden moet zijn wil deze methode bruikbaar zijn.

**Hoofdstuk 9** bevat concluderende opmerkingen over het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift en de invloed die het mogelijk in de toekomst zal hebben. De moleculaire pathologie heeft een hoog potentieel om een actieve rol te spelen in het identificeren van individuen met een erfelijke belasting op CRC. Tevens kan met moleculaire technieken tumorontwikkeling van CRC worden bestudeerd.

Testen zoals; MSI, additionele MMR IHC (hoofdstuk 2) en *KRAS2* mutatie analyse (hoofdstuk 4) die goed toepasbaar zijn en relatief eenvoudig te implementeren zijn worden nu intensief gebruikt in de dagelijkse moleculaire diagnostiek op pathologie-afdelingen.

Binnen het wetenschappelijk onderzoek zal de moleculaire pathologie een belangrijke schakel zijn bij het bepalen van de biologische rol van de allelen die op dit moment met associatie studies geïdentificeerd worden als veronderstelde ziekte gerelateerde allelen. Bovendien zijn de onderscheidende tumorprofielen die gevonden werden in de verschillende tumor groepen(hoofdstuk 3 en 5) overtuigende voorbeelden van het feit dat benaderingen met moleculaire pathologie cruciaal kunnen zijn in het karakteriseren en mogelijk oplossen van tot op heden onopgeloste oorzaken van darmkanker.





## Curriculum vitae

De auteur van dit proefschrift werd geboren op 6 november 1972 te Goirle. Na het behalen van een diploma aan de St. Canisius MAVO te Tilburg in 1990 werd in 1994 het diploma van het Middelbaar Laboratorium Onderwijs aan het toenmalige Spectrum College Breda te Breda behaald. Tijdens de afstudeerstage van het Hoger Laboratorium Onderwijs aan de Leidse Hogeschool te Leiderdorp werd onderzoek gedaan naar de rol van CD40-CD40 ligand interacties in muizen met experimentele autoimmuun-encephalomyelitis (TNO Preventie en Gezondheid, Immunologische en Infectieziekten, Leiden, Prof. J.D. Laman). Na het behalen het HLO diploma in 1997 werd een VSB-beurs aan de auteur toegekend waarmee zij, in de functie van analiste, een jaar onderzoek deed naar B cel ontwikkeling in muismodellen (Basel Institute for Immunology, Basel, Zwitserland, Prof. J. Anderson and Prof. F. Melchers). Na terugkeer in Nederland werd gedurende 8 maanden als analiste gewerkt aan een onderzoek naar immunotherapie in muismodellen (Nederlands Kanker Instituut, Tumor Immunologie, Amsterdam, Prof. A.M. Kruisbeek). In mei 1999 trad de auteur als analiste in dienst van de afdeling pathologie van het LUMC in Leiden. Van januari 2003 tot mei 2008 werd het onderzoek beschreven in dit proefschrift aldaar uitgevoerd.



## List of additional publications

1. de Jong AE, Morreau H, **van Puijenbroek M**, Eilers PHC, Wijnen J, Nagengast FM, Griffioen G, Cats A, Menko FH, Kleibeuker JH, Vasen HFA. (2004) The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology* 126:42-48.
2. de Leeuw WJ, **van Puijenbroek M**, Merx R, Wijnen JT, Brocker-Vriends AH, Tops C, Vasen H, Cornelisse CJ, Morreau H. (2001) Bias in detection of instability of the (C)8 mononucleotide repeat of MSH6 in tumours from HNPCC patients. *Oncogene* 20:6241-6244.
3. de Leeuw WJ, **van Puijenbroek M**, Tollenaar RA, Cornelisse CJ, Vasen HF, Morreau H. (2003) Correspondence re: A. Muller et al., Exclusion of breast cancer as an integral tumor of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res.*, 62: 1014-1019, 2002. *Cancer Res* 63:1148-1149.
4. de Vos tot Nederveen Cappel WH, Offerhaus GJ, **van Puijenbroek M**, Caspers E, Gruis NA, De Snoo FA, Lamers CB, Griffioen G, Bergman W, Vasen HF, Morreau H. (2003) Pancreatic carcinoma in carriers of a specific 19 base pair deletion of CDKN2A/p16 (p16-leiden). *Clin Cancer Res* 9:3598-3605.
5. Dierssen JW, de Miranda NF, Mulder A, **van Puijenbroek M**, Verduyn W, Claas FH, van d, V, Jan FG, Cornelisse CJ, Corver WE, Morreau H. (2006) High-resolution analysis of HLA class I alterations in colorectal cancer. *BMC Cancer* 6:233.
6. Dierssen JW, de Miranda NF, Ferrone S, **van Puijenbroek M**, Cornelisse CJ, Fleuren GJ, van WT, Morreau H. (2007) HNPCC versus sporadic microsatellite-unstable colon cancers follow different routes toward loss of HLA class I expression. *BMC Cancer* 7:33.
7. Dierssen JW, **van Puijenbroek M**, Dezentje DA, Fleuren GJ, Cornelisse CJ, van WT, Offringa R, Morreau H. (2008) Frequent mutations in the 3'-untranslated region of IFNGR1 lack functional impairment in microsatellite-unstable colorectal tumours. *Eur J Hum Genet* : DOI:10.1038/ejhg.2008.81.
8. Haven CJ, Howell VM, Eilers PH, Dunne R, Takahashi M, **van Puijenbroek M**, Furge K, Kievit J, Tan MH, Fleuren GJ, Robinson BG, Delbridge LW, Philips J, Nelson AE, Krause U, Dralle H, Hoang-Vu C, Gimm O, Morreau H, Marsh DJ, Teh BT. (2004) Gene expression of parathyroid tumors: molecular subclassification and identification of the potential malignant phenotype. *Cancer Res* 64:7405-7411.
9. Haven CJ, **van Puijenbroek M**, Karperien M, Fleuren GJ, Morreau H. (2004) Differential expression of the calcium sensing receptor and combined loss of chromosomes 1q and 11q in parathyroid carcinoma. *J Pathol* 202:86-94.
10. Haven CJ, **van Puijenbroek M**, Tan MH, Teh BT, Fleuren GJ, van WT, Morreau H. (2007) Identification of MEN1 and HRPT2 somatic mutations in paraffin-embedded (sporadic) parathyroid carcinomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67:370-376.
11. Hendriks YM, Wagner A, Morreau H, Menko F, Stormorken A, Quehenberger F, Sandkuijl L, Moller P, Genuardi M, Van HH, Tops C, **van Puijenbroek M**, Verkuijlen P, Kenter G, van MA, Meijers-Heijboer H, Tan GB, Breuning MH, Fodde R, Wijnen JT, Brocker-Vriends AH, Vasen H. (2004) Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counseling and surveillance. *Gastroenterology* 127:17-25.
12. Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM, Morreau H, **van Puijenbroek M**, Tops C, van Os T, Wagner A, Ausems MG, Gomez E, Breuning MH, Brocker-Vriends AH, Vasen HF, Wijnen JT. (2006) Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 130:312-322.

13. Laman JD, Maassen CB, Schellekens MM, Visser L, Kap M, de JE, **van Puijenbroek M**, van Stipdonk MJ, van MM, Schwarzler C, Gunthert U. (1998) Therapy with antibodies against CD40L (CD154) and CD44-variant isoforms reduces experimental autoimmune encephalomyelitis induced by a proteolipid protein peptide. *Mult Scler* 4:147-153.
14. Menon AG, Morreau H, Tollenaar RA, Alphenaar E, **van Puijenbroek M**, Putter H, Janssen-Van Rhijn CM, van d, V, Fleuren GJ, Kuppen PJ. (2002) Down-regulation of HLA-A expression correlates with a better prognosis in colorectal cancer patients. *Lab Invest* 82:1725-1733.
15. Nielsen M, Poley JW, Verhoef S, **van Puijenbroek M**, Weiss MM, Burger GT, Dommering CJ, Vasen HF, Kuipers EJ, Wagner A, Morreau H, Hes FJ. (2006) Duodenal carcinoma in MUTYH-associated polyposis. *J Clin Pathol* 59:1212-1215.
16. Oldenburg RA, de Vos tot Nederveen Cappel WH, **van Puijenbroek M**, van den OA, Bakker E, Griffioen G, Devilee P, Cornelisse CJ, Meijers-Heijboer H, Vasen HF, Morreau H. (2004) Extending the p16-Leiden tumour spectrum by respiratory tract tumours. *J Med Genet* 41:e31.
17. Sanchez-de-Abajo A, de la Hoya M, **van Puijenbroek M**, Godino J, az-Rubio E, Morreau H, Caldes T. (2006) Dual role of LOH at MMR loci in hereditary non-polyposis colorectal cancer? *Oncogene* 25:2124-2130.
18. Sanchez-de-Abajo A, de la Hoya M, **van Puijenbroek M**, Tosar A, Lopez-Asenjo JA, Díaz-Rubio E, Morreau H, Caldes T. (2007) Molecular analysis of colorectal cancer tumors from patients with mismatch repair proficient hereditary nonpolyposis colorectal cancer suggests novel carcinogenic pathways. *Clin Cancer Res* 13:5729-5735.
19. Vasen HF, Hendriks Y, de Jong AE, **van Puijenbroek M**, Tops C, Brocker-Vriends AH, Wijnen JT, Morreau H. (2004) Identification of HNPCC by molecular analysis of colorectal and endometrial tumors. *Dis Markers* 20:207-213.
20. Wagner A, Barrows A, Wijnen JT, van der KH, Franken PF, Verkuijlen P, Nakagawa H, Geugien M, Jaghmohan-Changur S, Breukel C, Meijers-Heijboer H, Morreau H, **van Puijenbroek M**, Burn J, Coronel S, Kinarski Y, Okimoto R, Watson P, Lynch JF, de la CA, Lynch HT, Fodde R. (2003) Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States: high mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an American founder genomic deletion of the MSH2 gene. *Am J Hum Genet* 72:1088-1100.