



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Discovery of genetic defects in unexplained colorectal cancer syndromes

Jansen, A.M.L.

Citation

Jansen, A. M. L. (2018, May 29). *Discovery of genetic defects in unexplained colorectal cancer syndromes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/62614>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/62614>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/62614> holds various files of this Leiden University dissertation.

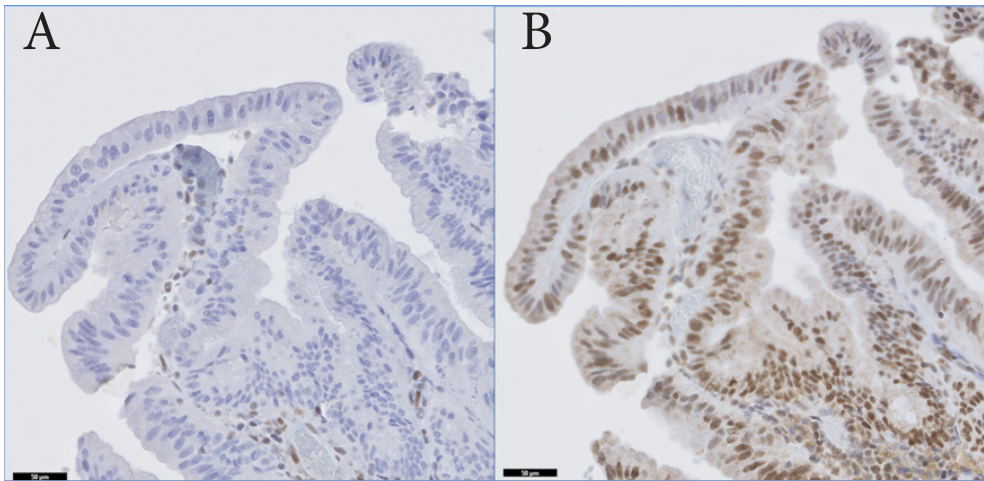
Author: Jansen, A.M.L.

Title: Discovery of genetic defects in unexplained colorectal cancer syndromes

Issue Date: 2018-05-29

Nederlandse samenvatting

Darmkanker is de op twee na meest voorkomende kanker bij mannen en de op één na meest voorkomende kanker bij vrouwen. Ongeveer 20-30% van alle darmkankerpatiënten heeft een familiegeschiedenis van darmkanker en 3-5% van alle patiënten kan verklaard worden door een verandering in het DNA (mutatie) in één van de bekende darmkankergenen. De meest voorkomende vorm van erfelijke darmkanker is Lynch Syndroom en wordt veroorzaakt door mutaties in de DNA-herstelgenen: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* en *PMS2*. Van deze genen worden de DNA-hersteleiwitten afgelezen, die er voor zorgen dat foutjes in het DNA worden gevonden en worden hersteld. Een mutatie in het gen kan ervoor zorgen dat er geen eiwit wordt gemaakt, wat er voor zorgt dat foutjes in het DNA niet meer hersteld worden. Om te kijken of de DNA-hersteleiwitten aanwezig zijn in een tumor, wordt er een kleuring gedaan. Hierbij wordt een stofje toegevoegd dat zich bindt aan één specifiek eiwit. Als het eiwit aanwezig is, en het stofje zich kan binden, is dat te zien aan een bruine kleur (Figuur 1B). Als het eiwit niet aanwezig is, is alleen de blauwe achtergrondkleuring te zien (Figuur 1A).



Figuur 1- Kleuring van (A) MLH1 en (B) MSH2.

Bruin laat zien dat het eiwit aanwezig is, terwijl blauw de achtergrondkleuring is om de cellen zichtbaar te maken. A en B laten dezelfde tumor zien, maar met negatieve kleuring voor MLH1 (A) en positieve kleuring voor MSH2 (B).

Negatieve kleuring – het ontbreken van een kleur – duidt op het ontbreken van het eiwit. Dit betekent meestal een onderliggende erfelijke mutatie. Tumoren met een DNA-herstedefect hebben daarnaast instabiliteit van hun DNA-microsatellieten. Microsatellieten zijn kleine stukjes DNA met een herhalend patroon, zoals CACACACA. Als er een defect is in de DNA-herstelfunctie, kan de lengte van deze microsatellieten veranderen, iets wat we microsatelliet-instabiliteit of MSI noemen. Somatische, niet erfelijke, mutaties – mutaties die tijdens het leven ontstaan en niet van de ouders komen – kunnen ook zorgen voor verlies van de DNA-herstelfunctie. Een veelvoorkomende somatische verandering is hypermethylering van de promotor van *MLH1*. Dit houdt in dat het eerste stukje van het *MLH1*-gen (de promotor) wordt afgedekt met methylgroepen (CH_3 -groepen). Daardoor wordt het hele gen geïnactiveerd, en wordt er geen eiwit gemaakt. Meer dan 85% van de tumoren waarin we geen MLH1-eiwit

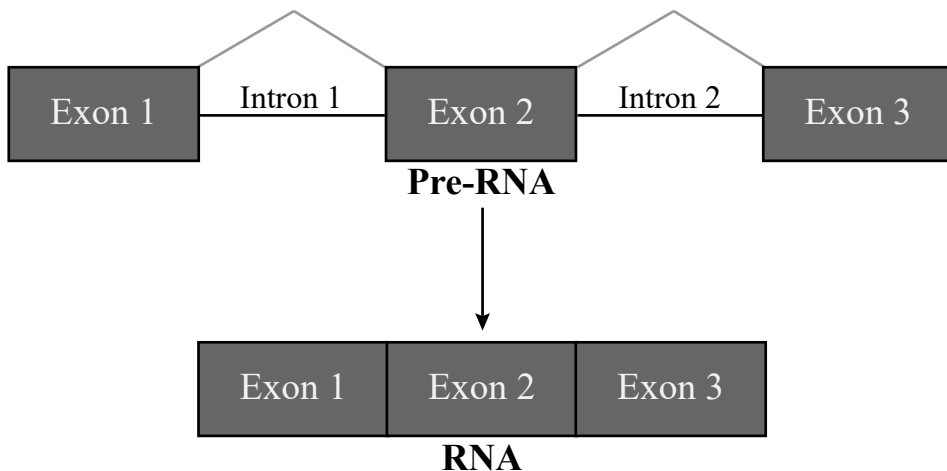
kunnen detecteren, kunnen verklaard worden door *MLH1* promoter hypermethylering. In 60% van de tumoren met negatieve kleuring voor de DNA-hersteleiwitten en/of MSI wordt geen erfelijke mutatie en geen *MLH1* promoter hypermethylering gevonden. Deze patiënten noemen we ‘verdacht Lynch Syndroom’-patiënten. Omdat de oorzaak van de tumoren in deze patiënten onbekend is, is het moeilijk om screeningsrichtlijnen op te stellen. Ook kunnen familieleden niet getest worden op dragerschap van een erfelijke mutatie. Dit proefschrift richt zich op het vinden van de onderliggende erfelijke oorzaak van de darmkanker van deze ‘verdacht Lynch Syndroom’-patiënten en hun familie. We stellen dat dit kan komen door: (1) mutaties in de DNA-herstelgenen die voorheen gemist zijn, (2) andere (somatische) manieren van inactivatie van de DNA-herstelgenen, (3) mutaties in andere genen die microsatelliet instabiliteit kunnen veroorzaken.

Zodoende beschrijft **hoofdstuk 2** een poging tot detectie van gemiste erfelijke mutaties in de DNA-herstelgenen. DNA bestaat uit coderende gedeeltes (exonen) en niet-coderende gedeeltes (intronen). Van dit DNA (een dubbele helix) wordt eerst RNA gemaakt (een directe kopie van één van de twee strengen), waarna de intronen eruit ‘geknipt’ worden. Het RNA dat overblijft wordt ‘gelezen’ en vertaald naar aminozuren, die in een lange keten een eiwit vormen. Vaak wordt gedacht dat de niet-coderende gedeeltes niet belangrijk zijn voor het uiteindelijke eiwit, en wordt alleen gekeken naar mutaties in het coderende gedeelte: de exonen. Om te kijken of we daardoor mutaties missen die de darmkanker wel kunnen verklaren, hebben we gekeken naar erfelijke mutaties in de exonen én intronen van de DNA-herstelgenen: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* en *PMS2* maar ook in elf andere bekende darmkankergenen. Door deze 15 darmkankergenen te analyseren bij 45 verdacht Lynch Syndroom patiënten, vonden we 1979 mutaties, waarvan het grootste gedeelte (97%) in het niet-coderende gedeelte van de genen lag. In één patiënt werd een eerder gemiste erfelijke mutatie in het *MLH1*-gen gevonden. Deze mutatie zorgde voor 29 extra aminozuren in het *MLH1* eiwit waardoor het niet meer met *PMS2* kon binden, en niet meer als DNA-hersteleiwit kon functioneren. Omdat kleuring van de tumor alleen liet zien dat er geen *PMS2* eiwit was, was er voorheen niet getest op mutaties in het *MLH1*-gen. Naast deze mutatie werden erfelijke mutaties met onbekend effect gevonden in vier andere darmkankergenen, maar er werden geen verdere testen gedaan naar de het effect van deze mutaties.

In **hoofdstuk 3** beschrijven we een veelvoorkomende verklaring voor deze ‘verdacht Lynch Syndroom’-tumoren, waarbij we de tumoren testen voor somatische mutaties. Recentelijk is ontdekt dat als er twee somatische mutaties ontstaan in hetzelfde DNA-herstelgen, dit leidt tot dezelfde soort tumoren als verdacht Lynch Syndroom patiënten hebben. Of verdacht Lynch Syndroom patiënten met een familiegeschiedenis ook verklaard konden worden door twee somatische mutaties, was voorheen niet bekend. In de studie beschreven in **hoofdstuk 3** werden 62 verdacht Lynch Syndroompatiënten getest op mutaties in het DNA geïsoleerd uit bloed (op zoek naar erfelijke mutaties) én de tumor (op zoek naar somatische mutaties) in de DNA-herstelgenen, maar ook in de *POLE* en *POLD1* genen. Mutaties in deze genen zijn eerder beschreven in een ander type darmkanker, maar zijn niet eerder onderzocht in tumoren met Lynch Syndroomkarakteristieken. Door analyse vonden we in 10 patiënten twee somatische mutaties in het DNA-herstelgen, dat verlies van kleuring liet zien. Daarnaast hadden negen patiënten een mutatie in het *POLE* of *POLD1*-gen, waarvan twee erfelijke- en zeven somatische mutaties waren. Alle tumoren met een mutatie in het *POLE*- of *POLD1*-

gen lieten heel veel somatische DNA-mutaties zien, iets wat eerder beschreven is in dit type tumoren en we 'gehypermuteerd' noemen.

In **hoofdstuk 4** is onderzoek gedaan naar mutaties die een effect hebben op RNA splicing. Als DNA wordt afgelezen wordt eerst pre-RNA gemaakt met alle intronen er nog in. Deze intronen moeten eruit geknipt worden om RNA te maken. Het eruit knippen van de intronen noemen we splicing (Figuur 1). Mutaties aan de rand van het exon of het intron kunnen een effect hebben op de splicing. Ze kunnen ervoor zorgen dat de exon-intron rand niet goed herkend wordt en er niet correct geknipt wordt. Zo kan het gebeuren dat er per ongeluk een exon uitgeknipt wordt, of dat een intron blijft zitten. In de studie in **hoofdstuk 4** hebben we gekeken naar varianten die op de rand van het intron of exon liggen. Hierbij zijn niet alleen de DNA-herstelgenen geanalyseerd, maar ook *BRCA1* (een bekend borstkanker gen) en *APC* (een bekend darmkankergen). Voor 11 mutaties werd RNA geïsoleerd uit tumormateriaal. Dit tumormateriaal was gefixeerd in formaline en daarna omhuld in paraffine, om het te kunnen bewaren. Sommige tumoren waren al meer dan 20 jaar oud. Daarnaast werd voor twee mutaties RNA geïsoleerd uit gekweekte bloedcellen. Acht van de 13 mutaties waren bekende mutaties, en eerdere studies lieten zien dat deze invloed hebben op splicing. Van de overige vijf mutaties was door predictieprogramma's voorspeld dat ze splicing beïnvloedden, maar dit was nog niet bewezen. Van de acht bekende mutaties kon voor zes mutaties RNA geïsoleerd worden. Alle zes lieten het splice-effect zien zoals eerder beschreven. Eén van deze mutaties, waarvan het RNA geïsoleerd was uit de gekweekte bloedcellen, liet alleen het specifieke splice-effect zien nadat de gekweekte cellen gefixeerd waren met formaline. Dit laat zien dat formaline de afbraak van RNA tegengaat. Van de vijf mutaties waarvan voorspeld was



Figuur 2: Splicing

Pre-RNA, nog bestaande uit exonen en intronen, wordt omgezet in RNA door de intronen ertussenuit te knippen.

dat ze invloed hadden op splicing, kon voor vier mutaties RNA geïsoleerd worden, en werd een afwijkende splicing aangetoond voor drie mutaties.

In **hoofdstuk 5** beschrijven we hoe mutaties in het *PMS2*-gen gedetecteerd en geanalyseerd kunnen worden. Het gaat hierbij om mutaties in DNA geïsoleerd uit formaline gefixeerd tumorweefsel dat ingebed is in paraffine. DNA uit dit weefsel is vaak erg gefragmenteerd, waardoor de standaardmethodes die gebruikt worden voor DNA uit bloed niet te gebruiken zijn op dit materiaal. Dit maakt de analyse van *PMS2* complexer, terwijl *PMS2* op zichzelf al een complex gen is. *PMS2* heeft namelijk veel pseudogenen. Een pseudogen is een gen dat heel erg lijkt op een ander gen, maar vaak niet functioneel is, en waar vaak geen eiwit van wordt gemaakt. *PMS2* heeft 14 pseudogenen met bijna dezelfde sequentie als de sequentie van *PMS2* exon 1 tot exon 5, en één pseudogen dat bijna hetzelfde is als *PMS2* exon 9 en exon 11 tot 15. *PMS2* is te onderscheiden van zijn pseudogenen door 'paraloge sequentie variaties' (PSVs): een klein aantal specifieke nucleotides die wel in *PMS2* zitten, maar niet in de pseudogenen. We analyseren het DNA stukje voor stukje, en door ervoor te zorgen dat elk stukje zo'n PSV bevat, kunnen we zeggen of het bij *PMS2* of bij één van de pseudogenen hoort.

In **hoofdstuk 6** wilden we de erfelijke oorzaak in een groep patiënten met onverklaarde polyposis vinden. Polyposispatiënten hebben veel poliepen in de darm, soms wel meer dan 1000. Vaak hebben deze patiënten een mutatie in het *APC*-gen. In het verleden zijn ook patiënten beschreven met een mozaïeke mutatie in *APC*. Een mozaïeke mutatie is een mutatie die ergens tijdens de ontwikkeling is ontstaan, vaak in de embryonale fase. Hierdoor zit de mutatie niet in elke cel in het lichaam, maar slechts in een deel van de cellen. Om te zoeken naar een mozaïeke mutatie werd er voorheen altijd gekeken naar bloed, en ging men op zoek naar een mutatie die aanwezig was in een deel van de cellen. In deze studie zijn 27 polyposis patiënten zonder *APC*-mutatie onderzocht of zij drager waren van een mozaïeke *APC*-mutatie. Hierbij werd niet gekeken naar DNA uit bloed, maar juist naar DNA geïsoleerd uit de poliepen. De hypothese was dat als twee of meerdere poliepen dezelfde mutatie hadden, er een onderliggende mozaïeke mutatie kon zijn. In negen van de 18 patiënten met 21 tot 100 poliepen in de darm, en in twee patiënten waarvan we wisten dat ze een mozaïeke *APC*-mutatie droegen, konden we dezelfde *APC*-mutatie vinden in meerdere poliepen. Om te kijken of deze mozaïeke mutatie in het hele lichaam zat, of alleen in de darmen, hebben we DNA uit verschillende weefsels (bloed, speeksel, normaal darmweefsel) getest op de *APC*-mutatie aanwezig in de poliepen. In drie patiënten was de mutatie die in de poliepen zat ook terug te vinden in DNA uit bloed, in 1 patiënt zat de mutatie niet in bloed maar wel in normaal darmweefsel en in zes patiënten zat de mutatie niet in DNA uit bloed en was geen DNA uit normaal darmweefsel aanwezig, of was testen van dit weefsel niet mogelijk. In één patiënt werd een mutatie gevonden in de poliepen die niet aanwezig was in het normale darmweefsel. Voor deze patiënt verwachtten we dat 1 gemuteerde cel zich verspreidde door de darm, zich deelde en uiteindelijk uitgroeide tot een poliep. Uit deze poliep liet dan weer een cel los die zich verder verspreidde zodat er meerdere poliepen ontstonden.