



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Search for new breast cancer susceptibility genes

Oldenburg, R.A.

Citation

Oldenburg, R. A. (2008, May 29). *Search for new breast cancer susceptibility genes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12871>

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/1887/12871>

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

SAMENVATTING

HOOFDSTUK 1

In hoofdstuk 1 wordt het doel en de aanpak van dit onderzoek beschreven.

HOOFDSTUK 2

In Hoofdstuk 2 (introduction; gebaseerd op de publicatie in *Critical Reviews in Oncology and Hematology, mei 2007*) wordt een overzicht gegeven van de genetische aspecten van borstkanker. Alvorens hier verder op in te gaan is het voor de leek noodzakelijk om meer te begrijpen over het mechanisme van het ontstaan van kanker en dus ook borstkanker. Het menselijke lichaam is opgebouwd uit cellen. In de cel zit een celkern met daarin het overgrote deel van de genetische informatie (DNA moleculen), opgeslagen in 23 paar chromosomen. Het erfelijk materiaal is dus in tweevoud aanwezig, afkomstig van vader en afkomstig van moeder. DNA-moleculen zijn opgebouwd uit een veelvoud van vier bouwstenen (adenine (A), cytosine (C), guanine (G) en thymine (T)). Geselecteerde regio's van het DNA (genen) dienen als sjablonen voor het synthetiseren van RNA-moleculen, die op hun beurt gebruikt worden als blauwdruk voor het vormen van eiwitten (proteïnen). De term proteïne komt van het Griekse woord 'proteios' wat betekent 'van de hoogste rang' waarmee de belangrijke rol van eiwitten in de diverse cellulaire functies, zoals transcriptie, transport, signalering, en opslag wordt weerspiegeld. Gedurende ons leven delen cellen zich ter vervanging of ter vermenigvuldiging (cellulaire proliferatie), waarbij het genetische materiaal wordt gekopieerd en doorgegeven. Bij dit proces kunnen er echter veranderingen optreden in het DNA (somatische mutaties) die een bepaald voordeel kunnen geven aan de nieuwe cel. Indien door de verandering de cel beter in staat is zich voort te planten/te vermenigvuldigen zal deze de neiging vertonen om het organisme te gaan domineren. (ter vergelijking: een organisme dat zich beter kan voortplanten zal door natuurlijke selectie gaan domineren over de anderen). Daar tumoren worden gekenmerkt door een ongeremde groei (voortplanting) van cellen hebben ze dus door natuurlijke selectie een voordeel t.o.v. de andere cellen. Dus eigenlijk hebben mensen van nature de neiging om in tumoren te veranderen. Echter, tumoren zijn niet in staat om baby's te krijgen en deze te verzorgen. In de biljoen jaren van evolutie zijn op het niveau van het gehele organisme daarom sterke genetische controle mechanisme's ontwikkeld om te voorkomen dat een persoon (in elk geval in zijn reproductieve jaren) in een tumor verandert. Potentiële tumor cellen

worden of gerepareerd en terug in het gareel gebracht of gedwongen om zelfmoord (apoptose) te plegen. Desondanks leert de ervaring ons dat tumoren weldegelijk kunnen ontstaan. Hiervoor is het echter noodzakelijk dat meerdere van de verdedigingsmechanismen van de cel worden stil gelegd. Dus, om een cel te veranderen in een tumor cel zijn meerdere succesvolle mutaties nodig in met name genen die de celproliferatie bevorderen (ook wel 'gatekeepers'-genen genoemd), waardoor er een grotere populatie van cellen ontstaan voor de 'volgende' mutatie en genen die effect hebben op de stabiliteit van het gehele genome (op DNA of chromosomaal niveau), waardoor de mutatie frequentie kan toenemen (ook wel 'caretaker'-genen genoemd, bv DNA-repair-genen).

Onder vrouwen is borstkanker de meest frequent voorkomende vorm van kanker (22% van alle vormen van kanker bij vrouwen). Jaarlijks komen er wereldwijd ongeveer 1 miljoen borstkanker patiënten bij. Het cumulatieve lifetime risico op borstkanker voor Nederlandse vrouwen is 9%. Er zijn meerder risicofactoren voor borstkanker bekend waarvan een positieve familieanamnese voor borstkanker de belangrijkste is. Dit geeft aan dat erfelijke factoren een grote rol spelen bij het ontstaan van borstkanker. Eerstegraads familieleden (zussen, moeder, dochters) van borstkanker patiënten hebben ongeveer een tweemaal zo hoog risico op borstkanker. Dit risico neemt toe met het toenemen van het aantal borstkanker patiënten in de familie, de leeftijd waarop de borstkanker tot uiting komt (hoe jonger de patiënt des te hoger is het risico), het voorkomen van tweezijdig borstkanker en een voorgeschiedenis van goedaardige borstaandoeningen. Op dit moment wordt ongeveer 10% van alle borstkanker's verklaard door reeds vanaf de geboorte aanwezige mutaties (kiembaan mutaties) in bekende borstkanker predispositie genen. Deze genen kunnen grofweg verdeeld worden in hoogrisico genen (*BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53*, *LKB1/STK11* en *CDH1*) met lifetime risico hoger dan 4 en laag tot matig verhoogd risico genen (*CHEK2*, *TGFβ1*, *CASP8*, *BARD1*, *BRIP1*, *PALB2* en *ATM*). De hoogrisico genen zijn de voornaamste oorzaak van frequent voorkomen van borstkanker patiënten binnen bepaalde families en zijn voornamelijk gevonden door middel van koppelingsonderzoek (Linkage analyse), waarbij binnen families gezocht wordt naar gebieden op het genoom die gedeeld worden tussen borstkanker patiënten, onder aanname van een bepaald statistisch model (overerving, allelfrequentie en penetrantie). Een 'Logaritme of Odds' (LOD-score; een maat voor waarschijnlijkheid) groter dan 3 op een bepaald gebied wordt gezien als een significante bevinding en geeft aan dat op dat gebied mogelijk een aan borstkanker gerelateerd gen te ontdekken is.

De laag tot matig verhoogd risico genen kunnen echter niet op deze manier geïdentificeerd worden doordat de genotype-fenotype relatie (relatie tussen afwijkingen in genen en het tot uiting komen van de ziekte) een stuk zwakker is. De meest gangbare methode om deze genen te identificeren is de associatie studie, waarbij de allelfrequentie van bepaalde varianten in (kandidaat) genen wordt vergeleken tussen een groot aantal borstkanker patiënten en een controle groep.

Op dit moment verklaren *BRCA1* en *BRCA2* het grootste gedeelte van families met meerdere borstkanker patiënten, eierstokkanker patiënten en/of mannelijk borstkanker patiënten, maar in veel mindere mate in families waarin vrouwelijk borstkanker de voornaamst voorkomende vorm van kanker is. *BRCA1* en *BRCA2* worden beiden gezien als 'caretaker'-genen en spelen een belangrijke rol bij het signaleren en repareren van DNA-schade. De erfgang van mutaties in beide genen geschiedt op een klassieke autosomaal dominante wijze (kinderen van een persoon met een kiembaan mutatie in een van beide genen hebben 50% kans deze te erven). Functioneel zijn deze mutaties echter recessief. In *BRCA1* en *BRCA2* geassocieerde tumoren is één mutant allel via de kiembaan geërfd. Inactivatie van het andere allel wordt op somatisch niveau (in het epitheel van de borstklier) verkregen gedurende het leven. Draagsters van een mutatie in een van de andere hoogrisico kanker predispositie genen *TP53* (Li-fraumeni syndroom), *PTEN* (Cowden syndroom), *CDH1* (HDGC-syndroom) en *LKB1/STK11* (Peutz-Jegher syndroom) worden ook geassocieerd met een sterk verhoogd borstkanker risico, echter kiembaan mutaties zijn zeer zeldzaam en worden niet gevonden bij borstkanker patiënten zonder de andere geassocieerde stigmata van deze aandoeningen.

De ervaring uit de kliniek leert ons echter, dat er nog veel sterk belaste borstkanker families zijn zonder een mutatie in *BRCA1* of *BRCA2*. De hypothese is dan ook dat er nog andere hoog risico genen zouden moeten bestaan, die mogelijk met linkage onderzoek geïdentificeerd kunnen worden. De kracht van linkage onderzoek hangt echter sterk af van de informativiteit van de te onderzoeken families en het aantal nog te ontdekken predispositie genen (de heterogeniteit van de aandoening). Helaas is na de ontdekking van *BRCA1* en *BRCA2* halverwege de jaren 90 geen nieuw hoogrisico borstkanker predispositie gen middels linkage onderzoek meer gevonden. Dit zou onder andere verklaard kunnen worden doordat de heterogeniteit onder de families groter is dan werd verwacht en de tot nu toe uitgevoerde onderzoeken te weinig families bevatte om tot een significante LOD-score te komen. Ons onderzoek had als doel om d.m.v. genomwijd linkage analyse nieuwe hoogrisico borstkanker

predispositie genen te identificeren. In samenwerking met het Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC) zijn hiervoor 150 Nederlandse, Engelse, Franse en Australische *BRCA1/2* negatieve families geselecteerd met minimaal 3 borstkanker patiënten gediagnosticeerd onder 60 jaar, zonder eierstokkanker patiënten of mannelijke borstkanker patiënten. Daarnaast hebben wij uit 55 Nederlandse families zoveel mogelijk in paraffine ingebedde tumor samples verzameld, om te pogen de heterogeniteit binnen de geselecteerde families te verminderen. Onderzoek in *BRCA1* (en in mindere mate ook *BRCA2*) gerelateerde tumoren heeft namelijk uitgewezen dat deze tumoren zich onderscheiden van sporadische en *BRCA1/2*-negatieve tumoren qua histopathologie, array-CGH profiel, micro-array profiel en immunohistochemie. Wellicht is dit ook het geval voor *BRCA3*, *4*, etc (*BRCAX*).

HOOFDSTUK 3

Een van de families die wij voor dit doel geselecteerd hebben bevatte naast borstkanker een onverwacht groot aantal andere vormen van kanker, waaronder huidkanker (melanomen), longkanker, darmkanker en kanker in de mondholte (oral squamous cell carcinoma). In deze familie werd een mutatie in het *P16* gen gevonden (*P16-Leiden* mutatie), welke geassocieerd is met een verhoogd risico op melanomen. Aangezien er ook veel borstkanker in deze familie voorkomt en andere onderzoekers reeds gesuggereerd hadden dat het *P16* gen mogelijk een rol speelt in de etiologie van borstkanker, hebben we onderzoek verricht naar de rol van *P16* bij het ontstaan van borstkanker binnen deze familie, aangevuld met vier additionele borsttumoren van *P16-Leiden* positieve patiënten uit vier verschillende families. Met dit onderzoek zijn wij tot conclusie gekomen dat er geen duidelijk verband was tussen dragerschap van een *P16-Leiden* mutatie en het ontstaan van borstkanker, aangezien de meeste (4 van de 5) borstkanker patiënten binnen de hierboven beschreven familie de mutatie niet bij zich droegen en 3 van de vier additionele geselecteerde borsttumoren immunohistochemisch geen uitschakeling van het *P16* gen lieten zien. Wel werd er een verband tussen het ontstaan van longkanker, kanker in de mondholte (oral squamous cell carcinoma) en dragerschap van de *P16-Leiden* mutatie aangetoond. (Hoofdstuk 3.1: publicatie in de *Journal of Medical Genetics*, 2004).

Tijdens onze zoektocht naar nieuwe borstkanker predispositie genen stond het internationale onderzoeksveld niet stil op dit gebied. Zo identificeerde H. Meijers-Heijboer de *CHEK2*1100delC* variant als een laagrisico borstkanker predispositie gen. Hoofdstuk 3.2 (publicatie in *Cancer Research*, in 2003) beschrijft de rol van deze

variant binnen de door ons geselecteerde families. Het selecteren van borstkanker patiënten met een sterke familiale belasting laat duidelijk een verrijking zien van deze variant ten opzichte van sporadische borstkanker patiënten. In 15 van 71 families (21%) werd minimaal één borstkanker patiënt met deze variant gevonden. Opvallend was echter dat er binnen de families geen duidelijke co-segregatie van de variant met borstkanker werd aangetoond. Echter, patiënten die de variant bij zich droegen ontwikkelde borstkanker op jongere leeftijd dan patiënten zonder deze variant. Ook toonde we met dit onderzoek als eerste aan dat *CHEK2*110delC* dragerschap gepaard gaat met een afwezige immunohistochemische kleuring in de tumorcellen. Onze resultaten ondersteunen een model waarbij een verhoging van het borstkanker risico mogelijk verklaard kan worden door een interactie tussen *CHEK2*110delC* en een nog te identificeren nieuw borstkanker predispositie gen of genen (polygenetisch model).

Een Scandinavische groep claimde ondertussen dat er mogelijk een borstkanker predispositie gen te ontdekken is op de lange arm van chromosoom 13 (13q21). Hoofdstuk 3.3 is een manuscript dat werd gepubliceerd in *Proc Natl Acad Sci U.S.A* in 2002 waarin we dit tegenspreken. In dit onderzoek toonde het Breast Cancer Linkage Consortium aan dat in een groep van 128 hoog-risico families er geen associatie is tussen borstkanker en 13q21 (Heterogeniteit LOD-score: -11).

HOOFDSTUK 4

In dit hoofdstuk beschrijven we een poging om d.m.v. tumorkarakteristieken de vermoedelijk aanwezige genetische heterogeniteit binnen onze families te verkleinen. Hoofdstuk 4.1 is een manuscript dat werd gepubliceerd in *Clinical Cancer Research* in 2006. Recente studies hebben aangetoond dat de *BRCA1*-gerelateerde tumoren een specifiek histopathologisch, immunohistochemisch en genetisch profiel vertonen. Dit geeft aan dat het wellicht mogelijk is om de heterogeniteit binnen onze families te verlagen, indien er verschillende subgroepen geïdentificeerd kunnen worden binnen de *BRCAx*-gerelateerde tumoren. Voor dit doel werden 100 *BRCAx*-tumoren immunohistochemisch onderzocht en onderzocht op 'Loss of heterozygosity (LOH)'. Hierbij werden LOH-frequenties groter dan 40% gevonden op 1q41, 4p16, 11q23.3, 16p13, 16q24, 17p12, 21q22, 22q11 en 22q13, met de hoogste frequentie op 22q13 (59%). Deze gebieden, behalve de gebieden op 22q waren reeds ook gevonden in sporadische borsttumoren. In 28 families was het mogelijk om LOH te onderzoeken in minimaal 2 tumoren van verschillende patiënten. Hierbij vonden we op chromo-

soom 2, 3, 6, 12, 13, 21 en 22 (echter niet op 22q13) markers waarop LOH significant frequenter optrad in tumoren van patiënten behorend tot dezelfde familie dan je zou verwachten op basis van de totale LOH-frequenties. Helaas leverde linkage analyse voor markers op de overeenkomende gebieden voor chromosoom 12, 21 en 22 geen significante LOD-scores op. Immunohistochemisch waren de *BRCAx* tumoren significant vaker positief voor bcl2 dan *BRCA1* ($P=0.000005$) en *BRCA2* tumoren ($P=0.00003$), wat overigens ook het geval was voor de *CHEK2*110delC* tumoren. Ook viel op dat de *CHEK2*110delC* tumoren significant vaker negatief waren voor cytokeratine 19 kleuring t.o.v *BRCA1* ($P=0.0008$) en het restant van de *BRCAx* tumoren ($P=0.006$). Helaas leverde de cluster analyse voor de gecombineerde data (LOH en immunohistochemie) geen bruikbare subgroepen op die gebruikt konden worden voor linkage analyse.

Hoofdstuk 4.2 is een manuscript dat momenteel aangeboden is voor publicatie en beschrijft de m.b.v array-CGH gevonden resultaten in 58 *BRCAx* tumoren in vergelijking met 48 sporadische tumoren. The *BRCAx* tumoren laten in het algemeen significant meer kopienummer veranderingen zien dan sporadische tumoren ($p=0.003$). The *BRCAx* tumoren laten significant meer verlies van genetisch materiaal zien op chromosoom 1p, 1q, 4q, 5q, 9q, 13q, 14q, 15q, 19cen, 21p en Xp en toename op chromosoom 2q-ter, 6p, 8p, 11p, 12p, 14q, 17p, 17q, 19p, 19q en van meerdere gebieden op chromosoom 22 t.o.v. sporadisch tumoren. De toename op chromosoom 22 lijkt vrij uniek te zijn voor *BRCAx* tumoren daar dit niet wordt gevonden in zowel *BRCA1*, *BRCA2* als sporadische tumoren. Met behulp van ongesuperviseerde hiërarchische clustering werd een poging gewaagd de 58 *BRCAx* tumoren te groeperen in meer homogene subgroepen voor eventuele linkage analyse. Helaas werden er geen duidelijke subgroepen gevonden, echter wanneer de *BRCAx* tumoren samen met de sporadische tumoren werden geclusterd viel op dat er geen willekeurige vermenging ontstond. De *BRCAx* en de sporadische tumoren bundelen zich apart van elkaar.

HOOFDSTUK 5

Hoofdstuk 5.1 werd in 2006 gepubliceerd in *Genes Chromosome and Cancer*. Het manuscript beschrijft de resultaten van de door het Breast Cancer Linkage Consortium uitgevoerde genomwijde linkage onderzoek. De gedachte achter dit onderzoek is dat er nog hoogrisico genen bestaan. In 149 hoogrisico families (waarvan 22 uit Nederland afkomstig waren) werd onder een dominant model op chromosoom

4 een LOD-score van 1.80 gevonden. Een maximale LOD-score van 2.40 op chromosoom arm 2p werd gevonden, wanneer alleen de families met meer dan 4 borstkanker patiënten, gediagnosticeerd onder 50 jaar werden geanalyseerd. Ook onder een recessief model en middels nonparametrisch methodes werden geen significante LOD-scores gevonden. Het aantal gevonden linkage pieken was niet anders dan je op basis van toeval zou mogen verwachten. Dit onderzoek representeert verreweg het uitgebreidste linkage onderzoek dat tot op heden is gepubliceerd. De resultaten suggereren dat de heterogeniteit onder de families hoog is en wellicht is dit op te lossen door de set families verder uit te breiden. Momenteel wordt hiertoe door de BCLC een poging ondernomen (250 families). Ook kan het betekenen dat de gebruikte markermap onvoldoende informatief is.

Hoofdstuk 5.2 bevat een manuscript dat momenteel is aangeboden voor publicatie. De Nederlandse populatie staat bekend om het feit dat er voor veel genetische aandoeningen specifieke mutaties voorkomen die in andere populaties minder op de voorgrond staan. Daarom zou je de Nederlandse populatie kunnen beschouwen als een unieke genetische populatie. Om de mogelijkheid te evalueren dat de genetische heterogeniteit onder borstkanker families te verkleinen is door een meer homogene populatie te selecteren hebben we linkage onderzoek verricht in 85 Nederlandse families. 22 van deze families waren ook geïncludeerd in het linkage onderzoek verricht door het Breast Cancer Linkage Consortium. Onder aanname van een dominant en recessief model werden er geen significante LOD-scores gevonden. Echter met nonparametrische methoden werd op chromosoom 9q21 een significante LOD-score geïdentificeerd (voor marker D9s167 was de NPL-score 3.96 ; $p=0.00009$). Dit suggereert dat er op dit gebied mogelijk een borstkanker predispositie gen ligt. Indien dit daadwerkelijk het geval is zal waarschijnlijk maar een klein deel van de *BRCAx* families hierdoor verklaard worden, zeker in andere dan de Nederlandse populatie.

HOOFDSTUK 6

Dit Hoofdstuk bevat een samenvattende discussie. Genetisch onderzoek gericht op de identificatie van borstkanker predispositie genen staat momenteel op een interessant kruispunt. Enerzijds suggereert het bestaan van families met meerdere (jonge) borstkanker patiënten zonder een mutatie in *BRCA1* of *BRCA2* dat er nog genen moeten zijn die een, met *BRCA1* of *BRCA2* vergelijkbaar hoog borstkanker risico veroorzaken. Anderzijds heeft de afwezigheid van een significante linkage piek in een

groep van 149 hoog risico families zonder een *BRCA1* of *BRCA2* mutatie ons duidelijk gemaakt dat indien zo'n gen bestaat het waarschijnlijk maar een klein gedeelte van deze families kan verklaren.

Het is een mogelijkheid dat er nog meerdere hoogrisico genen bestaan maar dat de individuele bijdrage te klein is om met de huidige verrichte studies te identificeren. Dit zou opgelost kunnen worden door de set families uit te breiden of de families te groeperen in meer homogene subgroepen, dmv het gebruik van tumorkarakteristieken (biomarkers) of families uit een meer homogene populatie te selecteren. Met behulp van LOH, CGH en immunohistochemie hebben wij een eerste poging ondernomen om middels biomarkers de families te groeperen. Helaas heeft dit tot nu toe niet geleid tot de identificatie van een nieuw gen. Het eerste resultaat verkregen uit, met name CGH, geeft aan dat dit nog verdere exploratie verdient.

Het selecteren van families uit een meer homogene populatie leverde eveneens een interessant resultaat op, namelijk de identificatie van chromosoom 9q21 als een mogelijk locus voor een nieuw borstkanker predispositie gen. Echter indien dit het geval is zal het betreffende gen waarschijnlijk vooral een rol zal spelen in de Nederlandse populatie, daar in ander internationale linkage studies dit gebied niet naar voren is gekomen.

De schatting is dat de huidige borstkanker genen minder dan 5% van de totale borstkankerincidentie verklaren. Het aandeel van genetische factoren in de etiologie van borstkanker is niet geheel duidelijk. Meerdere studies geven aan dat dit waarschijnlijk veel hoger is dan 5%. Een studie betreffende de incidentie van contralateraal borstkanker suggereerde zelfs dat het grootste gedeelte van alle borstkanker optreedt in een kleine minderheid van vrouwen die een verhoogde gevoeligheid hiervoor hebben. Het is onwaarschijnlijk dat dit risico geheel is toe te schrijven aan hoogrisico genen, aangezien reeds voorspeld is dat, indien ze überhaupt bestaan, mutaties in deze genen zeer zeldzaam zijn. Het idee is daarom ontstaan dat meerdere frequent voorkomende varianten met een laag risico en of zeldzamere varianten met een matig risico in combinatie met elkaar een rol spelen. Zo'n poligenetisch model wordt inderdaad ondersteund door segregatie analyses in niet *BRCA1/2* gerelateerde families. Onder dit model zullen verschillende combinaties van meerdere laag-tot matig risico kanker predispositie genen, samen met omgevingsfactoren mogelijk de families verklaren. Aangezien zulke genen niet middels linkage onderzoek geïdentificeerd kunnen worden is er momenteel veel aandacht voor genomwijde associatie studies. Het probleem van deze studies is dat je zeer grote aantallen borstkanker

patiënten en controles nodig hebt (in de orde van grote van 20.000 patiënten en een even groot aantal controle personen), wat zeer kostbaar is. Zoals wij hebben aangetoond voor de *CHEK2*1100delC* variant, ontstaat er een verrijking van laag tot matig risico varianten door het selecteren van hoogrisico families. Het lijkt daarom zeer efficiënt te zijn om eerst in een kleine groep personen dat verrijkt is voor borstkanker predispositie een genomewijde associatie studie te verrichten. Dit kunnen familiare gevallen zijn maar ook bijvoorbeeld bilaterale borstkanker patiënten of personen met andere risico factoren met een sterke genetische component zoals borstweefsel densiteit. Vervolgens kunnen de varianten die hierbij significant geassocieerd zijn met borstkanker getypeerd worden in een grote (multicenter) case-control studie. Inmiddels zijn de eerste laag tot matig risico genen op deze manier ontdekt.

Het moge duidelijk zijn dat de identificatie van zulke genen uit het perspectief van de gezondheidszorg van groot belang is. Niet alleen om het (borst)kanker risico voor vrouwen en hun familieleden te kunnen inschatten en zo tot adequate beslissingen te komen qua preventieve strategieën (controle, preventieve ingrepen en chemopreventie). Maar ook voor de ontwikkeling van therapieën gericht op de onderliggende gen afwijkingen.

