



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Functional characterization of BRCA2 variants to improve cancer risk assessment

Mesman R.L.S.

Citation

Functional characterization of BRCA2 variants to improve cancer risk assessment. (2020, October 29). *Functional characterization of BRCA2 variants to improve cancer risk assessment.* Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/138056>

Version: 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/1887/138056>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138056> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Mesman, R.L.S.

Title: Functional characterization of BRCA2 variants to improve cancer risk assessment

Issue Date: 2020-10-29



Nederlandse samenvatting
Curriculum vitae
List of publications
Acknowledgements | Dankwoord

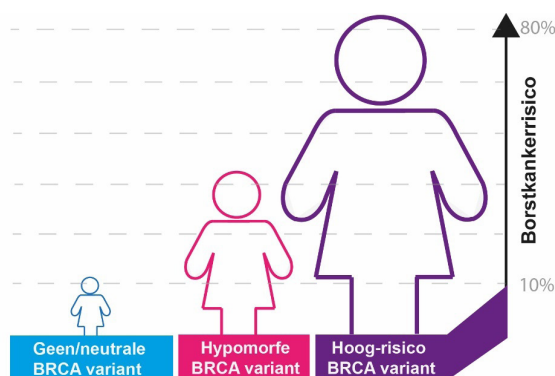
Nederlandse samenvatting

Achtergrond informatie

Borstkanker is de meest voorkomende vorm van kanker bij vrouwen in de westerse wereld. De kans dat een vrouw in de loop van haar leven borstkanker krijgt is 12-13%. Jaarlijks worden er in Nederland dan ook ongeveer 15.000 vrouwen gediagnosticeerd met invasieve borstkanker. De kans om borstkanker te overleven is vrij groot; volgens de cijfers van Borstkankervereniging Nederland (BVN) is vijf jaar na diagnose 87% van de borstkankerpatiënten nog in leven.

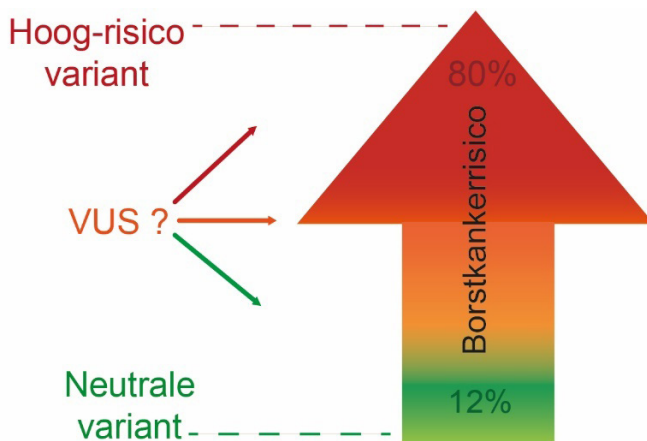
Het populatierisico voor eierstokkanker ligt een stuk lager dan dat voor borstkanker en bedraagt in Nederland ongeveer 1%. Jaarlijks komen er zo'n 1.400 nieuwe gevallen van eierstokkanker bij. De diagnose wordt vaak pas laat vastgesteld, omdat de klachten zich meestal pas ontwikkelen als de kanker al in een vergevorderd stadium is. Patiënten met een tumor in een gevorderd stadium hebben een 5-jaars overleving van minder dan 40%. Patiënten waarbij de eierstokkanker in een vroeg stadium wordt gediagnosticeerd hebben een grotere kans op langdurige genezing.

In 5-10% van de gevallen van borst- en eierstokkanker is er sprake van een erfelijke aanleg. Het vermoeden dat een familie erfelijk belast is, ontstaat wanneer er vrouwen op relatief jonge leeftijd borstkanker en/of eierstokkanker krijgen. Vrouwen uit "verdachte families" kunnen via de huisarts doorverwezen worden naar een klinisch geneticus voor het uitvoeren van een erfelijkheidsonderzoek. Een DNA-test kan deel uit maken van een dergelijk onderzoek. Bij deze DNA-test worden meerdere genen bekeken waarvan bekend is dat bepaalde veranderingen het risico op kanker sterk verhogen. Deze veranderingen in het DNA worden pathogene varianten genoemd (d.w.z. ziekte veroorzakend). *BRCA1* en *BRCA2* zijn de meest bekende genen die deel uit maken van zo'n gen-panel onderzoek bij verdenking op erfelijke borstkanker. Pathogene varianten in deze genen leiden tot een sterk verhoogd risico op borstkanker (60-80%) en/of eierstokkanker (10-45%) (Figuur 1).



Figuur 1. Verhoging van het borstkankerrisico voor BRCA mutatiedraagsters ten opzichte van het populatierisico (aangegeven met het blauwe poppetje).

Het DNA-onderzoek kent vier verschillende uitkomsten: er wordt geen genverandering gevonden, er wordt een onschuldige genverandering gevonden (neutrale variant), er wordt een pathogene variant gevonden of er wordt een genverandering gevonden met een onzekere betekenis (Variant of Uncertain Significance, VUS). Een VUS kan de oorzaak van de ziekte zijn, maar een VUS kan ook een onschuldige genetische variant zijn (Figuur 2). De uitslag van het DNA-onderzoek kan worden gebruikt om advies op maat te bieden en preventieve maatregelen te nemen passend bij het individuele kankerrisico. In Nederland zijn er duizenden families waarin een pathogene variant is gevonden. Voor familieleden die drager zijn van de pathogene variant is het kankerrisico doorgaans sterk verhoogd. Vandaar dat er voor vrouwen die drager zijn van een pathogene variant een aangepast periodiek screeningsbeleid wordt gehanteerd waarbij vrouwen vanaf 25 jaar hun borsten jaarlijks kunnen laten onderzoeken door een specialist. Daarnaast kan worden besloten om risicoreducerende chirurgie toe te passen en preventief de borsten en/of eierstokken te verwijderen. Tevens komen overige familieleden desgewenst ook in aanmerking voor DNA-onderzoek, zodat alle personen die drager zijn en dus een verhoogd risico hebben, in kaart kunnen worden gebracht. Erfelijkheidsonderzoek kan dus ingrijpende gevolgen hebben voor een familie en mutatiedraagsters kunnen voor belangrijke keuzes komen te staan



Figuur 2. Voor sommige genetische varianten is het effect op de eiwit functie lastig te voorspellen waardoor het kankerrisico niet kan worden bepaald op basis van DNA-onderzoek. Er is extra informatie nodig om de klinische betekenis van deze zogenaamde Variants of Uncertain Significance (VUS) te bepalen.

Probleemstelling

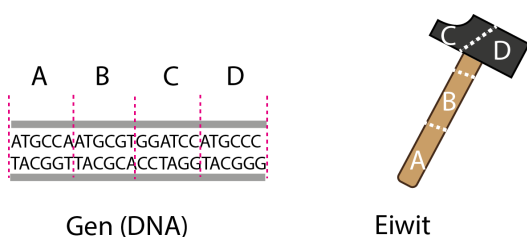
In ongeveer 15% van de DNA-testen wordt er een genverandering gevonden waarvan het effect onduidelijk is. In de praktijk wordt zo'n genverandering een VUS genoemd. De interpretatie van een VUS is erg lastig; het kan een onschuldige variant betreffen maar het kan ook een VUS zijn die het risico op kanker sterk verhoogd (Figuur 2). Zoals hiervoor al aangegeven is het van groot belang dat de uitslag van de DNA-test goed

geïnterpreteerd wordt zodat alle vrouwen met een sterk verhoogd kankerrisico in een klinisch traject terecht komen waarin ze goed geadviseerd worden omtrent uitvoering van screening en andere preventieve maatregelen.

Om meer inzicht te krijgen in de pathogeniteit (het ziekmakende vermogen) van een VUS is verder onderzoek noodzakelijk. Dit kan in de vorm van een zogenaamd co-segregatieonderzoek waarbij gekeken wordt of de VUS samen met de ziekte overerft in de familie. Maar de hoeveelheid bruikbare klinische informatie is vaak beperkt doordat veel VUS zeldzaam zijn. Er zijn zoveel verschillende VUS dat er maar weinig families zijn waarin precies dezelfde variant voorkomt. Kortom, er is een andere bron van informatie nodig om de pathogeniteit van een VUS te bepalen. Een “functionele test” is zo’n alternatieve bron van informatie. We weten namelijk dat wanneer een DNA variant de biologische functie van het BRCA eiwit ernstig aantast de variant een sterk verhoogd kankerrisico met zich meedraagt. De mate waarin het BRCA eiwit nog functioneel is lijkt informatief te zijn voor het kankerrisico. In dit proefschrift lees je hoe functionele testen kunnen helpen bij de interpretatie van VUS in *BRCA2* en bijdragen aan een betrouwbare inschatting van het kankerrisico.

Samenvatting proefschrift

Met financiële ondersteuning van het KWF hebben wij een functionele test ontwikkeld om te bepalen of een VUS de functie van het BRCA2 eiwit aantast. Het gen *BRCA2* bevat informatie voor het produceren van het BRCA2 eiwit dat betrokken is bij het repareren van dubbelstrengs breuken in ons DNA via een proces genaamd ‘homologe recombinatie (HR)’ (Figuur 3). Als het BRCA2 eiwit kapot is, bijvoorbeeld door een pathogene variant in het gen, kunnen DNA breuken niet goed gerepareerd worden. Daardoor gaat essentiële informatie in het DNA van sommige cellen verloren. Als gevolg daarvan kunnen enkele van die cellen zich ongecontroleerd gaan delen en zo kan kanker ontstaan.



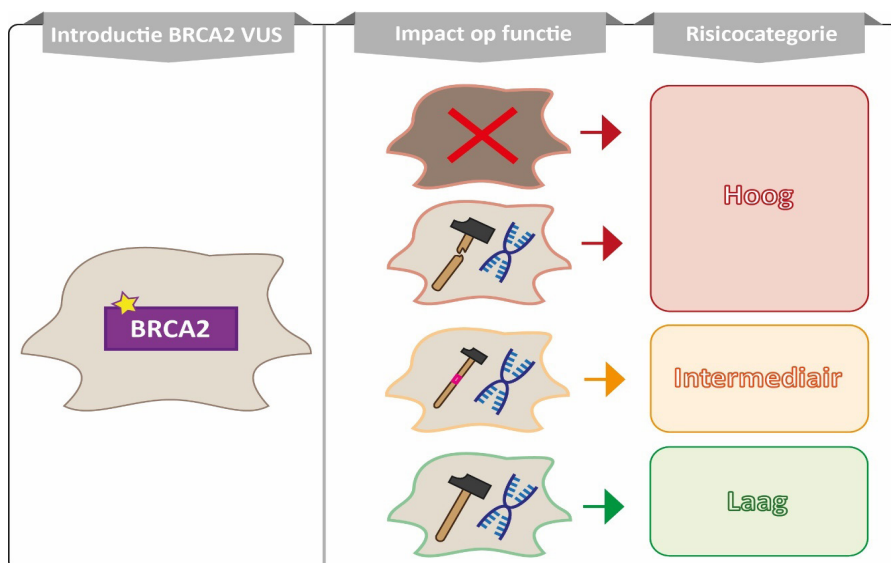
Figuur 3. Het gen *BRCA2* bevat informatie voor het produceren van het BRCA2 eiwit dat betrokken is bij het repareren van dubbelstrengs breuken in ons DNA. Het gen (stukje DNA) wordt eerst omgezet in RNA alvorens de genetische informatie kan worden gebruikt voor het produceren van een eiwit.

In het laboratorium kan elke VUS in het *BRCA2* gen die gevonden wordt bij een adviesvrager door ons worden nagemaakt. Vervolgens introduceren we het *BRCA2*

gen met de VUS in muizencellen om het effect op de BRCA2 functie te bestuderen (Figuur 4). We zorgen ervoor dat de muizencellen zelf geen BRCA2 eiwit meer kunnen aanmaken, waardoor ze volledig afhankelijk worden van de ingebrachte *BRCA2* variant. Als de VUS het BRCA2 eiwit volledig inactieveert zullen de muizencellen dood gaan. Als de VUS de functionaliteit van het BRCA2 eiwit niet al te ernstig aantast zullen de cellen overleven. Vervolgens kunnen we, in de cellen die overleven, onderzoeken in welke mate de BRCA2 activiteit is aangetast. Hierbij kijken we naar het vermogen om DNA breuken te repareren via HR, een BRCA2 afhankelijk herstelmechanisme. Wij handteren drie klinisch relevante risicocategorieën; hoog, intermediair en laag. Pathogene varianten die leiden tot een totaal verlies van eiwit functie behoren in de hoog-risico categorie (borstkankerrisico is ≥ 4 keer verhoogd t.o.v. het populatierisico). Varianten die niet of nauwelijks de functie aantasten komen in de laag-risico categorie (borstkankerrisico ≤ 2 keer verhoogd t.o.v. het populatierisico). Varianten die daartussen in zitten, dus leiden tot een verminderde functie maar niet tot totaal verlies, classificeren we in de intermediaire categorie (borstkankerrisico is 2-4 keer verhoogd t.o.v. het populatierisico). De mate van functionaliteit bepaalt dus in welke risicocategorie de VUS terecht komt. In **Hoofdstuk 2** staat beschreven hoe we de mate van BRCA2 functionaliteit hebben kunnen koppelen aan het risico op kanker. Hiervoor hebben we de BRCA2 functionaliteit gemeten voor DNA varianten waarvan we al wisten dat ze het risico op kanker wel (pathogene varianten) of niet (neutrale varianten) sterk verhoogden. De cellen waarin we hoog-risico varianten tot expressie brachten gingen dood terwijl de cellen waarin we neutrale *BRCA2* varianten inbrachten bleven leven. De functionele test kan dus betrouwbaar de DNA varianten die een hoog risico geven op kanker onderscheiden van DNA varianten die geen verhoogd risico geven.

Daarnaast hebben we ook een groot aantal VUS (n=43) getest waarvan nog niet bekend was welk effect ze hadden op de functie van BRCA2. De meeste VUS (n=26) hadden geen sterk effect op de eiwit functie en werden door onze test geclassificeerd als laag-risico varianten. Desalniettemin hebben we zeven varianten gevonden die celdood induceerden en zich in de functionele test dus gedroegen als typische pathogene hoog-risico varianten. Daarnaast waren er nog drie varianten die wel levensvatbaar waren maar het HR reparatiemechanisme ernstig hadden aangetast. Met grote waarschijnlijkheid hebben draagsters van deze VUS ook een sterk verhoogd kankerrisico. Verder hebben we nog drie hypomorfe (gedeeltelijk functionele) varianten gevonden die tot verminderde BRCA2 activiteit leidden. Vermoedelijk zorgt de “rest-functie” van deze varianten ervoor dat het borstkankerrisico slechts matig verhoogd is in vergelijking met typische pathogene varianten (Figuur 1). De vraag blijft welk kankerrisico geassocieerd is met deze “rest-functie”? Het is nog onbekend hoe we verschillende niveaus van functionaliteit kunnen vertalen naar kankerrisico. Als BRCA2 helemaal niet meer werkt is je risico om voor de leeftijd van 70 jaar borstkanker te krijgen zo’n 60%, maar wat als BRCA2 nog maar op halve kracht zijn werk doet? Gaat het risico dan ook met de helft omlaag? De studie beschreven in **Hoofdstuk 3** levert daarvoor het eerste bewijs. Voor hypomorfe varianten die de BRCA2 activiteit met 50% verlaagden was het geassocieerde borstkankerrisico 2.5 keer verhoogd ten opzichte van vrouwen met een normaal *BRCA2* gen. Lopende onderzoeken zijn er op

gericht om de correlatie tussen BRCA2 functionaliteit en het risico op borstkanker nog verder te specificeren.



Figuur 4. Een VUS die wordt gedetecteerd in een DNA-onderzoek kan door ons worden nagemaakt in het BRCA2 gen. Vervolgens introduceren we het gemuteerde BRCA2 gen (aangegeven met een gele ster) in de muizencellen zodat we de functionele consequenties van de variant kunnen bepalen met behulp van onze test. Als de cellen dood gaan of wanneer BRCA2 de DNA breuken niet of nauwelijks kan repareren dan is het waarschijnlijk een hoog-risico variant, als de cellen blijven leven maar toch een verminderd reparatie vermogen hebben dan komt de variant in de intermediaire risicocategorie terecht en als de BRCA2 variant de DNA breuken nog goed kan repareren dan classificeren we het als een laag-risico variant.

BRCA2 is een groot eiwit en waarschijnlijk zijn niet alle delen in het eiwit (ook wel domeinen genoemd) even belangrijk voor de functie. Het kan dus uitmaken waar de DNA verandering zich in het gen bevindt (en dus uiteindelijk in het eiwit) (Figuur 3). Zijn er domeinen waarin veranderingen mogelijk zijn zonder de functie ernstig aan te tasten? Het principe kan worden vergeleken met het verwijderen/veranderen van woorden uit een zin. Sommige woorden kunnen weggelaten worden zonder dat de tekst onbegrijpelijk wordt. Dit laten we zien in **Hoofdstuk 4** en **Hoofdstuk 5**. Er zijn varianten die ervoor zorgen dat stukjes informatie uit het gen worden verwijderd waardoor je dus ook een bepaald domein in het BRCA2 eiwit mist. Uit onze studies is gebleken dat dit soort varianten niet altijd destructief zijn omdat er bepaalde domeinen verwijderd kunnen worden zonder de eiwit functie ernstig aan te tasten.

De belangrijkste bevindingen uit de verschillende studies worden in **Hoofdstuk 6** in perspectief van de bestaande literatuur geplaatst. Tot slot wordt er in dit hoofdstuk gespeculeerd over de toekomstige implementatie van functionele data in de kliniek.

Conclusie

Dit proefschrift laat zien dat we een betrouwbare test hebben ontwikkeld om DNA varianten die een hoog risico op kanker geven te kunnen onderscheiden van DNA varianten in *BRCA2* die het risico op kanker niet verhogen. Daarnaast is onze test ook geschikt om *BRCA2* varianten te identificeren die mogelijk een matig verhoogd kankerrisico kunnen geven (Figuur 1). Dankzij uitgebreid functioneel onderzoek hebben we bepaald welke delen van het *BRCA2* gen essentieel zijn voor het behoud van *BRCA2* functionaliteit. Deze informatie helpt bij de interpretatie van VUS.

De informatie die de functionele test genereert moet uiteindelijk verwerkt worden in de huidige aanpak voor de classificatie van varianten. De combinatie van familiegegevens, genetische data, leefstijlfactoren en functionele data moet een betrouwbare risicoschatting mogelijk maken. Wetenschappers, laboratoriumspecialisten en klinisch genetici over de hele wereld werken nauw samen om dit te realiseren en zo de zorg voor draagsters van VUS te verbeteren.