



Universiteit
Leiden
The Netherlands

PMS2-associated Lynch syndrome : the odd one out

Broeke, S.W. ten

Citation

Broeke, S. W. ten. (2018, September 20). *PMS2-associated Lynch syndrome : the odd one out*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/65994>

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/1887/65994>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/65994> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Broeke, S.W. ten

Title: PMS2-associated Lynch syndrome : the odd one out

Issue Date: 2018-09-20

DUTCH SUMMARY

In het Westen is darmkanker een van de meest voorkomende soorten van kanker. Zo wordt in Nederland elk jaar bij ongeveer 11.000 mensen darmkanker gediagnosticeerd. Het risico op deze vorm van kanker hangt af van omgevings- en genetische factoren. Naar schatting is er bij 15-30% van de patiënten sprake van een familiale of een erfelijke predispositie voor darmkanker. Een erfelijke predispositie voor darmkanker wordt met name veroorzaakt door de volgende drie meest voorkomende syndromen: het Lynch syndroom (vroeger HNPCC genaamd), het familiale adenomateuze polyposis syndroom (FAP) en het MUTYH-geassocieerde polyposis syndroom (MAP). Deze syndromen verklaren tezamen 4- 5% van de patiënten met darmkanker. In de overige 10-25% is er sprake van zogenaamd familiale darmkanker, waarbij de precieze reden voor het vaker voorkomen van deze ziekte niet bekend is.

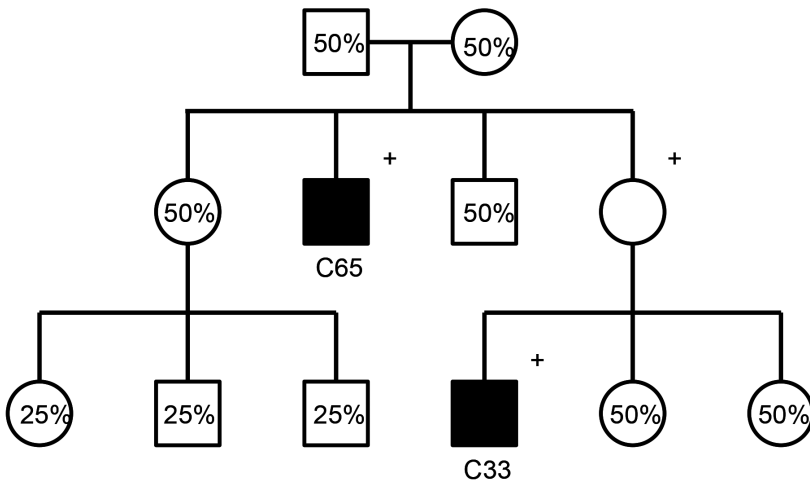
Dit proefschrift richt zich op onderzoek naar een belangrijke deelgroep van Lynch syndroom patiënten, namelijk degenen die een fout (mutatie) hebben in het mismatch reparatie gen *PMS2*. Lynch syndroom kan daarnaast worden veroorzaakt door een mutatie in één van de andere mismatch reparatie genen: *MLH1*, *MSH2* (en *EPCAM*) en *MSH6*. Bij Lynch syndroom patiënten is de mutatie in één van de mismatch reparatie genen aanwezig in alle lichaamscellen, een zogenaamde kiembaanmutatie. Dit geeft een verhoogd risico op het ontwikkelen van met name darmkanker en baarmoederkanker, maar ook andere vormen van kanker kunnen vaker optreden. Het daadwerkelijk transformeren van een gewone cel naar een kankercel gebeurt pas als er naast de reeds bij geboorte aanwezige kiembaanmutatie, lokaal nog een tweede somatische (=spontane) mutatie in een cel ontstaat. Het gevolg van de kiembaan mutatie en de somatische mutatie in beide kopieën van hetzelfde mismatch reparatie gen leidt tot mismatch reparatie deficiëntie. Dit wil zeggen dat het systeem dat zorgt voor de reparatie van mismatches ('foutjes') die ontstaan tijdens de DNA replicatie (verdubbeling) van een delende cel niet goed meer werkt. Dit resulteert in het ontstaan van diverse somatische mutaties in andere genen. De opeenstapeling van mutaties in de (tumor)cellen kunnen er voor zorgen dat een cel ongeremd gaat groeien. Een ander gevolg van mismatch reparatie deficiëntie is het ontstaan van microsatelliet instabiliteit (MSI), waarbij repeterende gebieden van nucleotiden (de letters van het DNA) instabiel worden. Indien een dergelijke instabiliteit in de tumor kan worden aangetoond, dan is dat een sterke aanwijzing voor mismatch reparatie deficiëntie. Deze kennis kan gebruikt worden in de diagnostiek naar Lynch syndroom. Naar verhouding was er tot voor kort nog maar weinig bekend over de patiëntengroep met *PMS2*-geassocieerd Lynch syndroom, met name in vergelijking met Lynch

syndroom veroorzaakt door mutaties in de genen *MLH1* en *MSH2*. Meer onderzoek naar PMS2-geassocieerd Lynch syndroom was dan ook nodig. Met name het vaststellen van het precieze risico op het ontwikkelen van kanker was van belang. In het verleden was deze groep patiënten onderbelicht wegens te stringente selectiecriteria en een moeizame mutatie analyse van het *PMS2* gen door de aanwezigheid van zogenaamde pseudogenen. De doelstelling van dit proefschrift is om de risico's op kanker als gevolg van een mutatie in het *PMS2* gen nader te definiëren en toe te werken naar een op maat gemaakte preventie van kanker. Een ander aandachtspunt is de taxatie van de oorzaak van de grote klinische variatie tussen en binnen families met *PMS2* mutaties, waarbij met name de rol van genetische - en leefstijl factoren onderzocht is.

Hoofdstuk 1 van dit proefschrift is een inleiding en beschrijft wat al bekend was over PMS2-geassocieerd Lynch syndroom voorafgaand aan de hierna beschreven studies. Allereerst was een bevestiging nodig van het veronderstelde lagere kankerrisico van *PMS2* mutaties en een analyse van minder voorkomende kanker locaties (zoals bijvoorbeeld eierstok- en maagkanker) die eerder geassocieerd zijn met andere Lynch syndroom mutaties. **Hoofdstuk 2** bevat daarom twee kankerrisico-analyses. In 2015 werd de eerste studie gepubliceerd waarin een analyse in 98 Europese families werd uitgevoerd. Gevonden risico's tot 70 jaar in deze studie waren voor dikke darmkanker respectievelijk 11 en 19% voor vrouwen en mannen, en 12% voor baarmoederkanker. De statistische methode die werd gebruikt in deze studie is de zogenaamde *modified segregation analysis*, een methode die corrigeert voor *bias* (vertekening) van het resultaat in families die werden geselecteerd in de kliniek. Een andere naam voor deze vorm van selectie *bias* is *ascertainment bias*. Het achterliggende idee is dat vanwege het gebruik van klinische selectiecriteria, de meest ernstig aangedane families vanzelfsprekend meer bekend zijn in de kliniek en om die reden terecht komen in onderzoek cohorten. Het volgende voorbeeld is een goede illustratie van *ascertainment bias*: Stel men wil de gemiddelde lengte in de Amerikaanse bevolking bepalen door het nemen van een steekproef met spelers uit de NBA, de Amerikaanse basketbal competitie. Dit zal leiden tot een forse overschatting van de lengte. Daarnaast is het waarschijnlijk dat mensen die al kanker hebben gehad zich eerder laten testen of eerder getest worden voor de aanwezigheid van de genetische aanleg voor Lynch syndroom, waarbij dan een *PMS2* mutatie gevonden kan worden. Dit geldt in ieder geval voor de eerst geteste persoon in een familie. Deze vorm van *bias* wordt *testing bias* genoemd. Risico analyses zonder correcties voor deze twee vormen van *bias* zullen daarom leiden tot een overschatting van het risico op kanker. De *modified segregation* analyse corrigeert op twee belangrijke manieren voor *bias*.

Ten eerste neemt het alle familieleden mee in de berekening, of ze nu getest zijn of niet. Het geeft deze personen allemaal een kans op het hebben van de mutatie. Alle familieleden krijgen op deze manier een gewichtje mee in de analyse. Dit gaat niet alleen *testing bias* tegen, maar vergroot ook het te analyseren cohort. Zie voor een voorbeeld hiervan figuur 1. Voorts wordt de analyse zo aangepast dat het resultaat gecorrigeerd wordt voor de mate waarin een familie is aangedaan, hiermee wordt gecorrigeerd voor de *ascertainment bias*.

De in hoofdstuk 2 beschreven eerste kankerrisico analyse maakt dus gebruik van de *modified segregation analysis* om het risico op dikke darm- en baarmoeder kanker te schatten. Bekend is echter dat ook andere vormen van kanker vaker voorkomen bij Lynch syndroom patiënten, zoals onder andere eierstok- en maagkanker. In de groep van 98 families in de eerste analyse kwamen deze vormen van kanker te weinig frequent voor om de *modified segregation* methode toe te passen. Daarom is een alternatieve, eenvoudiger, methode gebruikt. Hierin wordt de prevalentie van een bepaalde soort kanker in bevestigde mutatiedragers vergeleken met de algemene bevolking, waarbij rekening gehouden wordt met de leeftijdsverdeling (*standardized incidence ratio; SIR*).

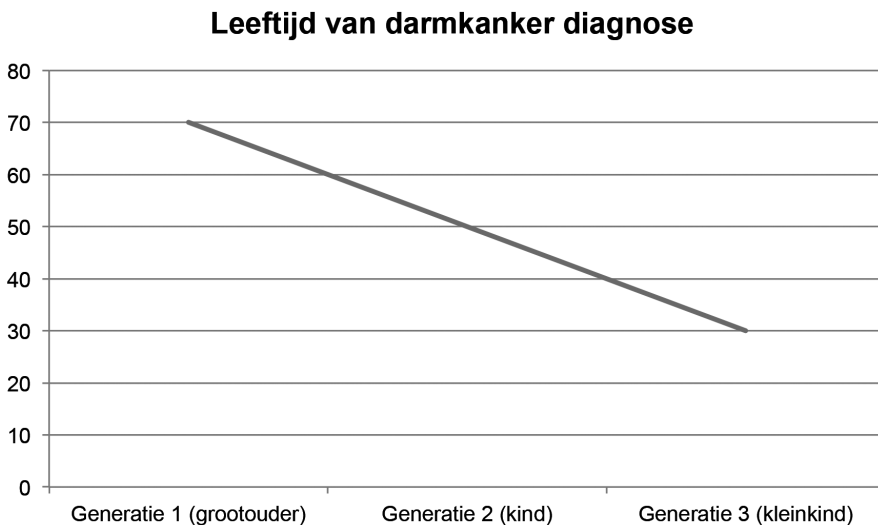


FIGUUR 1 In de modified segregation analyse krijgt ieder ongetest familielid een gewicht mee met de kans op het hebben van de *PMS2* mutatie. 'C' staat voor colorectaal carcinoom oftewel dikke darmkanker. '+' betekent dat de mutatie bevestigd is.

Hieruit kwam naar voren dat er een verhoogd risico zou zijn op eierstok-, dunne darm-, nierbekken- en mogelijk ook borstkanker. Deze analyse was echter zeer waarschijnlijk beïnvloed door de hierboven beschreven vormen van *bias*. Om dat te ondervangen is door het aangaan van nieuwe samenwerkingsverbanden met Amerika, Canada en Australië een veel groter cohort verzameld, bestaande uit 284 families. In deze groep was het mogelijk om een corrigerende analyse uit te voeren. Hieruit bleek dat alleen het risico op dikke darm- en baarmoederkanker verhoogd is in PMS2 families, geen van de andere vormen van kanker kwam vaker voor, vergeleken met de algemene bevolking. Het risico op dikke darmkanker tot de leeftijd van 80 jaar was 12-13% en voor baarmoederkanker 14%. Ten opzichte van het bevolkingsrisico betekent dat een verhoging van respectievelijk twee tot drie maal en vier tot vijf maal. Deze resultaten onderstrepen het belang van het toepassen van adequate statistische methodes en het gebruik van voldoende grote patiëntgroepen om kankerrisico's op een valide manier te berekenen. Bij het interpreteren van bovenstaande geschatte risico's moet benoemd worden dat zowel binnen als tussen families veel variatie bestaat in de frequentie waarin darmkanker gediagnosticeerd wordt en op welke leeftijd. De verklaring daarvoor moet waarschijnlijk gezocht worden in zogenaamde *modifiers* (risico-beïnvloedende factoren). Deze *modifiers* kunnen zowel extern (leefstijl, omgevingsfactoren) als intern zijn (genetische variantie in andere genen dan *PMS2*).

Hoofdstuk 3 beschrijft drie studies waarin potentieel relevante modifiers werden onderzocht in *PMS2* families. De eerste studie is een analyse van het effect van milde risicovarianten in het DNA (*single nucleotide polymorphisms*, ook wel SNPs genoemd). Deze SNPs zijn geïdentificeerd in darmkanker-cohorten uit de algemene bevolking. Uit eerdere studies zou zijn gebleken dat twee SNPs het risico op darmkanker significant beïnvloeden in Lynch syndroom. Deze studies includeerden echter geen of maar weinig *PMS2* mutatie dragers. In een cohort van 507 dragers vonden we geen effect van deze en 22 andere SNPs. Vervolgens werd door middel van een vragenlijstonderzoek geprobeerd vast te stellen wat de invloed is van leefstijlfactoren zoals roken, alcoholgebruik en overgewicht op jonge leeftijd op risico om darmkanker te krijgen. Er werden geen duidelijke associaties gevonden. Echter, de onderzochte groep bestond uit 270 *PMS2* dragers en was daarmee relatief klein. Meer subtiele effecten kunnen om die reden gemist zijn en grotere studies zijn nodig om tot een meer definitief antwoord te komen. Tot slot is nog gekeken naar het bestaan van genetische anticipatie, dat wil zeggen het steeds jonger worden van de leeftijd van darmkanker diagnose bij elke opvolgende generatie waaraan de *PMS2* mutatie doorgegeven wordt (figuur 2).

Eerdere studies rapporteerden dat over de generaties de leeftijd van diagnose van darmkanker in Lynch syndroom patiënten steeds lager werd. Onze studie beschrijft een nieuw ontwikkeld statistisch model om het genetische anticipatie effect nader te onderzoeken en te kunnen corrigeren voor *ascertainment* en *testing bias*. De resultaten bevestigden dat er inderdaad op het eerste gezicht anticipatie lijkt plaatst te vinden in *PMS2* families, maar als wordt gecorrigeerd voor het geboortecohort (het jaar waarin iemand geboren is) dan verdwijnt dit effect. Dit is deels te verklaren door een algemene stijging van het aantal darmkanker gevallen, ook op jonge leeftijd, beschreven in de algemene bevolking. Redenen hiervoor zijn bijvoorbeeld schadelijke leefstijl en een betere detectie van kanker door bijvoorbeeld het bevolkingsonderzoek. Hiermee lijkt de geobserveerde anticipatie in *PMS2* families het gevolg te zijn van een algemene trend in de algemene bevolking in plaats van een specifiek biologisch effect dat versterkt wordt bij elke generatie waarin de *PMS2* mutatie doorgegeven wordt. Samenvattend kan er gezegd worden dat met de huidige studies geen duidelijke *modifiers* die het wisselende klinische beeld tussen *PMS2* families kunnen verklaren. Grotere studies zijn noodzakelijk om hier meer duidelijkheid in te scheppen, zodat er toegewerkt kan worden naar individuele risicoschattingen.

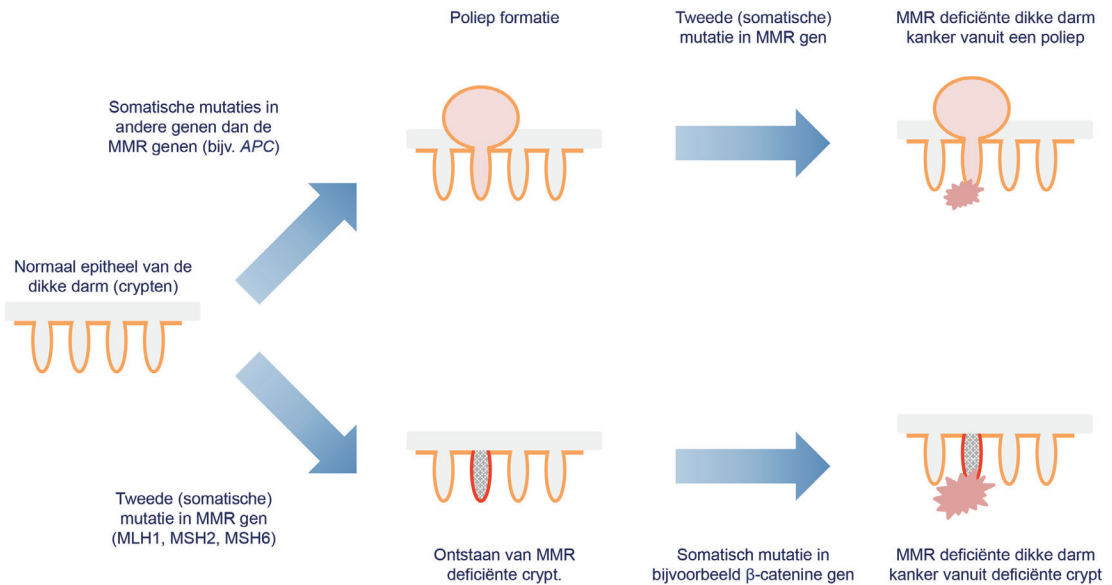


FIGUUR 2 Voorbeeld van genetische anticipatie. Over de generaties kan er verjonging van de leeftijd van darmkanker diagnose optreden, de vraag is echter of dit effect bij *PMS2* families wel bestaat.

De verschillen in het klinisch beeld tussen PMS2- en andere Lynch patiënten leidde ook tot de vraag of de tumoren zelf PMS2-specifieke karakteristieken hebben en wat de rol van een PMS2 mutatie is in het ontstaan van tumoren. **Hoofdstuk 4** beschrijft daarom twee studies betreffende deze twee onderzoeksvragen. De eerste studie is een samenwerking met de universiteit van Heidelberg en bekijkt de rol van kiembaan PMS2 mutaties in het ontstaan van dikke darm tumoren. Hiervoor is gekeken naar het zogenoemde microsatelliet instabiliteit profiel en werden PMS2 tumoren vergeleken met andere Lynch geassocieerde dikke darm tumoren. Er werd geen verschil gevonden in het microsatelliet instabiliteitspatroon, terwijl er op theoretische gronden wel een andere tumorontwikkeling te verwachten valt. De voorlopige conclusie uit onze eerste data in een relatief kleine groep is dat PMS2 mutaties wel een rol spelen bij het ontstaan van darmkanker. De tweede studie betreft een analyse van somatische DNA-mutaties in de tumor die secundair ontstaan zijn aan het niet meer werkende mismatch reparatie systeem. Het specifieke profiel van zulke mutaties in onze PMS2 tumoren werd daartoe nader onderzocht. De meest opvallende bevinding is het compleet ontbreken van somatische mutaties in het CTNNB1 gen in PMS2 tumoren, terwijl in MLH1 tumoren in de meerderheid wel een CTNNB1 mutatie gevonden werd. Dit gen codeert voor het eiwit β -catenine. Er is door anderen gesuggereerd dat mutaties in dit gen karakteristiek zijn voor een agressief groeiend type darmkanker dat zich niet ontwikkelt vanuit een goedaardig poliep voorstadium, maar direct invasief groeit vanuit zogenoemde mismatch reparatie deficiënte crypten in het darmepitheel. Het gebrek aan β -catenine mutaties in de PMS2 tumoren suggereert dat darmkanker in PMS2 mutatiedragers niet volgens dit tweede type groeipatroon ontstaat (figuur 3). De conclusie die uit hoofdstuk 4 getrokken kan worden is daarom dat hoewel PMS2 mutaties wel een rol lijken te spelen in de progressie van darmkanker, ze mogelijk niet de oorzaak zijn van het ontstaan van een tumor. Dit vormt daarmee een mogelijke verklaring voor het relatief lage kankerrisico van PMS2 mutatiedragers. Deze hypothese wordt verder gestaafd door eerdere observaties dat PMS2-mutatiedragers die regelmatige colonoscopieën (dikke darm onderzoeken) en, indien nodig, polypectomieën (verwijderen van weefsel dat het goedaardige voorstadium van darmkanker vormt) ondergaan, geen darmkanker ontwikkelen. Dit in tegenstelling tot andere Lynch patiënten die tot 46% kans hebben om ondanks deze surveillance toch darmkanker ontwikkelen. Dit zou kunnen betekenen dat het tijdig verwijderen van de poliepen bij PMS2 mutatiedragers het ontstaan van darmkanker voorkomt.

Hoofdstuk 5 gaat nader in op hetgeen in hoofdstuk 4 is besproken en bevat een manuscript dat de samenhang tussen de aanwezigheid van poliepen en het ontstaan van interval darmkanker (kanker die ontstaat tussen de colonoscopieën in) beschrijft

in een prospectieve studie opzet. In deze studie werden colonoscopie-verslagen opgevraagd van 171 *PMS2* mutatie dragers. Twee *PMS2* mutatie dragers ontwikkelden darmkanker ondanks regelmatige surveillance. Dit zou gezien kunnen worden als een ontkrachting van onze hypothese. Echter, verdere inspectie van de scopie-verslagen bracht aan het licht dat voorafgaande colonoscopieën suboptimaal waren door onvolledige reiniging van de dikke darm en het bestaan van obesitas bij de desbetreffende patiënten. Daardoor zou een eerdere poliep mogelijk gemist en dus niet verwijderd kunnen zijn, waardoor deze verder kon ontwikkelen tot darmkanker. Daarnaast bleek dat één van deze twee darmtumoren geen kenmerken liet zien passende bij *PMS2* deficiënte en dus niet het gevolg kon zijn van het onderliggende Lynch syndroom bij deze patiënt. De andere belangrijke observatie in deze studie is dat *PMS2* mutatie dragers in vergelijking met *MLH1*- en *MSH2* mutatie dragers waarschijnlijk langer poliep vrij blijven. Ook dit kan mogelijk verklaard worden door het feit dat er geen mismatch reparatie deficiënte poliepen groeien uit mismatch reparatie deficiënte crypten (figuur 3).



FIGUUR 3 Een beschrijving van de twee manieren waarop dikke darmkanker zich in Lynch syndroom patiënten ontwikkelt. Onze data suggereert dat alleen de bovenste route daadwerkelijk plaatsvindt bij *PMS2* mutatie dragers.

Dit proefschrift toont aan dat *PMS2* mutatie dragers een aparte entiteit zijn onder Lynch syndroom patiënten. Dit is gebaseerd op zowel epidemiologische analyse van het klinische fenotype als op tumor analyses. Naar aanleiding van de resultaten van de studies in dit proefschrift en studies van andere onderzoeksgroepen, hebben wij een voorlopig *PMS2*-specifiek controle advies geformuleerd. Dit houdt in dat *PMS2* mutatie dragers starten met twee tot drie jaarlijkse colonoscopieën op 35 tot 40-jarige leeftijd. Gezien het lage risico op baarmoederkanker en de goede kans op overleving, dient men terughoudend te zijn ten aanzien van risico-reducerende gynaecologische operaties bij vrouwelijke *PMS2* mutatie dragers. Het verrichten van een tweejaarlijkse transvaginale echo van de baarmoeder, eventueel met het nemen van biopsies uit de baarmoeder is een optie die aan deze vrouwen kan worden aangeboden. Niettemin dient dan besproken te worden dat er vooralsnog geen sluitend bewijs is voor een betere overleving na vroege opsporing van baarmoederkanker.

Door de directe klinische toepasbaarheid van de studie-uitkomsten op het screeningsbeleid in *PMS2*-geassocieerd Lynch syndroom is hetgeen in dit proefschrift is beschreven een goed voorbeeld van translationeel onderzoek dat direct toepasbaar is in de patiëntenzorg.