

Nederlandse samenvatting

Functionele analyse van MSH2/MSH6 varianten: zuiver of vals?

Lynch syndroom is een erfelijke aandoening waarbij patiënten een verhoogd risico lopen op darmkanker, baarmoederkanker en een aantal andere vormen van kanker. Dit risico ligt bij deze patiënten ongeveer 10 keer hoger dan bij gezonde personen. Lynch syndroom is wat we in de erfelijkheid “dominant” noemen. Dat betekent dat je al een sterk verhoogd risico op kanker hebt als je slechts één kopie van het defecte gen hebt. In een gezonde situatie heeft een mens van alle genen twee kopieën, eentje van moeder en de andere van vader. Bij dominante erfelijke aandoeningen heb je een grote kans om ziek te worden zodra één van die kopieën defect is, bij recessieve aandoeningen speelt dit pas als beide kopieën defect of veranderd zijn.

Bij Lynch syndroom gaat het om een defect in de zogenaamde mismatch repair genen (afgekort tot MMR). De belangrijkste vier mismatch repair genen werken samen in twee “teams” van eiwitten, dimeren genoemd. Deze teams bestaan uit MSH2 met MSH6 en MLH1 met PMS2. Deze twee teams vormen samen met nog wat andere eiwitten een soort spellingscontrole voor het DNA. Bij elke celdeling wordt het DNA eerst verdubbeld zodat elke nieuwe cel een volledige kopie van al het erfelijke materiaal, het genoom, meekrijgt. Hierbij moeten natuurlijk zo min mogelijk fouten worden gemaakt. Het mismatch repair systeem

controleert na de verdubbeling (replicatie) het DNA en herkent een groot percentage van deze spelfouten, mismatches genoemd. Vervolgens zet het de reparatie van deze fouten in gang. Dit is belangrijk omdat kanker een ziekte is die ontstaat door fouten (mutaties) in het DNA. Gelukkig leidt niet elke mutatie meteen tot kanker. Vooral fouten in genen die belangrijk zijn voor de regulering van celdeling geven een verhoogd risico op kanker omdat kanker een ziekte is van ongecontroleerde celdeling en celgroei. Hoe meer fouten je hebt in dit soort genen hoe groter je kans op kanker. Dus factoren die de kans op mutaties in je DNA vergroten, vergroten de kans op kanker. Dit kunnen factoren van buitenaf zijn zoals roken of overmatige blootstelling aan zonlicht maar ook factoren binnenin de cel zoals een niet goed werkend controlemechanisme. MMR is een van die mechanismen, want als de mismatches na celdeling niet opgespoord of gerepareerd kunnen worden neemt het risico op mutaties in cruciale genen toe.

Naast het controleren van het DNA na replicatie heeft het MMR systeem nog een aantal functies die belangrijk zijn bij het voorkomen van fouten in het DNA. Een daarvan is het voorkomen van homologe recombinatie tussen stukken DNA die onvoldoende op elkaar lijken. Homologe recombinatie is een proces dat gebruikt kan worden als

er een breuk in het DNA is ontstaan. Mechanismen in de cel gaan dan op zoek naar de andere kopie van het gebroken gen, je hebt er van elk tenslotte twee, om dat te gebruiken als voorbeeld voor het repareren van de breuk. MMR controleert dan of het stuk DNA dat als voorbeeld gebruikt wordt genoeg lijkt op het gebroken stuk, om te voorkomen dat er door de reparatie teveel veranderingen optreden in het DNA. Tenslotte zijn er ook nog vormen van DNA schade die zo moeilijk te herstellen zijn dat het beter is dat die cel in apoptose gaat (gecontroleerde celdood) omdat het risico op mutaties te groot is. MMR speelt ook in dit proces een belangrijke rol.

Wanneer een arts bij een patiënt Lynch syndroom vermoedt, wordt de tumor onderzocht op aanwijzingen voor een MMR defect. Dit wordt gedaan door immunohistochemie (IHC) waarbij d.m.v. antilichaamkleuringen gekeken wordt of de vier belangrijkste MMR eiwitten, MSH2, MSH6, MLH1 en PMS2 nog aanwezig zijn. Ook wordt er een microsatelliet (MSI) analyse gedaan. Microsatellieten zijn stukjes DNA waarvan bekend is dat er bij de replicatie veel fouten in gemaakt worden. MMR repareert deze fouten normaal gesproken. Dus, als er in de tumor van de patiënt veel fouten zitten in deze microsatellieten, dan is dat een aanwijzing dat MMR niet goed werkt. Als men op basis van deze resultaten een MMR defect vermoedt, dan wordt het verdachte MMR gen gesequenced, dat wil zeggen dat de DNA code bekeken wordt om te kijken of het gen

nog functioneert. Vaak worden er dan grote afwijkingen gevonden waardoor meteen duidelijk is dat het gen defect is. Maar in een significant deel worden kleine veranderingen in de code gevonden waarvan je niet meteen kunt zeggen of het een onschuldige variatie is, zoals bijvoorbeeld blauwe of bruine ogen, of dat die kleine verandering het hele eiwit waarvoor het gen codeert lamlegt en derhalve ziekteverwekkend is. Deze groep noemt men dan varianten met onbekende significantie, in het Engels Variants of Uncertain Significance (VUS).

Als er een verandering gevonden wordt waarvan duidelijk is dat het MMR systeem niet meer werkt, dan kunnen familieleden van deze patiënt onderzocht worden op deze mutatie. Op die manier weet je dan wie er verhoogd risico loopt op darm- en baarmoederkanker. Vooral bij darmkanker is dit erg belangrijk omdat dit in een vroeg stadium, of zelfs voorstadium, opgespoord kan worden bij een jaarlijks of tweejaarlijks darm-onderzoek door middel van een colonoscopie. Dit is geen prettig onderzoek maar wel bewezen effectief ter voorkoming van darmkanker. Als er echter een mutatie gevonden wordt waarvan het effect op MMR niet voorspeld kan worden heeft het onderzoek naar de mutatie bij familieleden geen zin omdat je niet weet of dit de oorzaak is van het verhoogde risico op darmkanker binnen de familie. Je kunt dan niet veilig zeggen dat iemand zonder deze mutatie, deze VUS, geen risico loopt.

Dus wordt alle familieleden geadviseerd om zich regelmatig te laten screenen op darm- en baarmoederkanker. Dit is zowel lichamelijk als psychisch een behoorlijke belasting. Daarom is het erg belangrijk dat er methoden ontwikkeld worden om de effecten van deze VUS op het MMR systeem te onderzoeken.

In dit proefschrift beschrijven we een methode om de effecten te onderzoeken van VUS die gevonden zijn in de MSH2 en MSH6 genen van families waarbij Lynch syndroom wordt vermoed. Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten te krijgen hebben we gekozen voor een systeem waarbij we de gevonden verandering namaken in het genoom van muizen embryonale stamcellen. Dit deden we met een techniek die we oligotargeting noemen. Hierbij gebruik je een klein stukje enkelstrengs DNA (de oligo) die de verandering op de juiste plek in het genoom plaatst (target). Op deze manier bootsen we de menselijke situatie na in een celtipe waarin we de gevolgen van de mutatie gemakkelijk kunnen bestuderen. Omdat de MMR eiwitten van mens en muis erg op elkaar lijken, kunnen we in dit systeem bijna alle veranderingen die in mensen gevonden worden nabootsen. Een ander groot voordeel van dit systeem is dat we op deze manier net zoveel veranderd eiwit in de cel krijgen als van het intacte eiwit in een gezonde situatie. Op die manier kun je goed bepalen in welke mate MMR nog werkt omdat een gedeeltelijk defect niet

verbloemd wordt door een teveel aan eiwit in de cel. In onze stamcellen kunnen we vervolgens met behulp van functionele assays de drie belangrijkste functies van het MMR systeem bestuderen zodat we kunnen achterhalen wat het effect van de VUS op MMR is.

We begonnen in **hoofdstuk 2** met het opzetten van het systeem door vier MSH2 mutaties na te maken die gevonden waren bij (vermoedelijke) Lynch syndroom patiënten. Deze mutaties zijn geselecteerd op basis van de beschikbare wetenschappelijke literatuur. Als controle namen we een mutatie mee waarvan sterk vermoed wordt dat deze pathogeen is, d.w.z. Lynch syndroom veroorzaakt. Daarnaast selecteerden we ook een vermoedelijk onschuldige variant, een zogenaamd polymorfisme. Onze resultaten classificeerden deze twee mutaties inderdaad als respectievelijk pathogeen en polymorfisme en de andere twee varianten als polymorfismen. De data van onze assays kwamen overeen met de klinische data zoals die gepubliceerd was.

Hoofdstuk 3 is op een vergelijkbare manier opgezet maar dan nu met vier VUS gevonden in MSH6, om te kijken of onze methode ook voor dit gen bruikbaar is. Ook hier zagen we dat de bewezen pathogene mutatie die we ter controle meegenomen hadden zich ook als zodanig gedroeg in onze assays. De andere drie VUS gaven resultaten vergelijkbaar met normaal "wild-type" eiwit en werden dus geclassificeerd als

polymorfismen. Ook hier vonden we grote overeenkomsten met de klinische data waardoor we concludeerden dat onze aanpak ook werkt voor MSH6.

Nu we de betrouwbaarheid van onze methode aangetoond hadden, hebben we deze toegepast in samenwerking met drie Nederlandse centra voor klinische genetica. Vanuit elk van deze centra kregen we een VUS die gevonden was in een Nederlandse familie met vermoedelijk Lynch syndroom. In deze drie gevallen waren de conventionele classificeringsmethoden ontoereikend waardoor familieleden niet onderzocht konden worden op aanwezigheid van de mutatie. In **hoofdstuk 4** staan de resultaten van de onderzoeken naar deze VUS, zowel in de kliniek (de familiegeschiedenis, IHC en MSI analyse) als m.b.v. onze methode. De twee datasets hadden duidelijke overeenkomsten wat voor ons benadrukte hoe dicht ons systeem de situatie in patiënten benadert. Verrassend genoeg zagen we dat twee VUS een duidelijk defect vertoonden maar dit defect was minder sterk dan bij een volledig inactiverende mutatie. Dit was dus een gedeeltelijk defect. De derde variant vertoonde geen MMR defect en werd dus geclassificeerd als polymorfisme. Ondanks dat bij de overige twee mutaties het defect niet volledig was, was het wel zodanig groot dat we aan kunnen nemen dat het de oorzaak is van het verhoogde risico op (darm)kanker in deze families.

In **hoofdstuk 5** benutten we een ander belangrijk voordeel van het

gebruik van muizen embryonale stamcellen in combinatie met oligotargeting, namelijk het gegeven dat we met deze cellen een muis kunnen maken die in elke cel de gemaakte verandering in zijn DNA heeft. Door deze muizen te volgen kunnen we bestuderen welk effect de VUS heeft op het ontstaan van kanker, iets wat in een celsysteem niet mogelijk is. In dit hoofdstuk selecteerden we een VUS die ervoor zorgt dat de laatste 60 aminozuren (bouwstenen) van het MSH2 eiwit ontbreken. Dit is een interessante mutatie vanuit klinisch oogpunt, aangezien een sterk vergelijkbare mutatie (ook wel truncatie genoemd) ook bij patiënten gevonden wordt. Bovendien is deze mutatie interessant vanuit een fundamenteel aspect. Er is namelijk nog niet veel bekend over de rol van dit laatste stukje van het MSH2 eiwit. Daarom hebben we in dit hoofdstuk niet alleen cellijnen gemaakt met deze VUS maar hebben we ook cellijnen gemaakt met combinaties van inactief MSH3 of MSH6. Deze twee eiwitten kunnen allebei samenwerken met MSH2 in twee verschillende teams die elk net een iets andere activiteit en functie hebben. Op deze manier konden we het effect van de truncatie op zowel het MSH2/MSH3 team als op MSH2/MSH6 team bestuderen. Uit onze resultaten bleek dat de truncatie de binding tussen MSH2 en de andere twee eiwitten sterk verminderde. Maar omdat we, hoewel weinig, toch nog wel wat MMR activiteit zagen concludeerden we dat er toch nog wel

wat binding moet zijn omdat MMR alleen kan functioneren met intacte teams. De muizen met deze mutatie leefden duidelijk korter dan hun gezonde broertjes en zusjes en hadden een verhoogd risico op kanker. Maar net als bij de functionele assays was het effect ook hier minder groot dan bij volledige afwezigheid van MSH2. Uit onze data concluderen we dat de laatste 60 aminozuren van MSH2 essentieel zijn voor de interactie met MSH6 en MSH3 en voor effectief mismatch repair.

We hebben in dit proefschrift laten zien dat onze methode een waardevolle aanvulling is op de bestaande functionele assays en dat het kan helpen bij de classificering van VUS. Dit laatste is erg belangrijk in de kliniek omdat het de begeleiding van patiënten en families sterk ten goede komt. Bovendien kunnen, als wordt vastgesteld dat de VUS pathogeen is, de overige familieleden onderzocht worden op de aanwezigheid van de mutatie zodat diegenen die de VUS niet hebben (geen drager zijn) veilig af

kunnen zien van de screening op darm- en baarmoederkanker.

Het grootste voordeel van onze methode is het feit dat het systeem sterk lijkt op de menselijke situatie en dat we een grote variëteit aan functionele assays kunnen toepassen om alle aspecten van MMR te bestuderen. Bovendien kunnen we een mutante muis maken wat extra belangrijk is in die gevallen waarbij het effect van de VUS op het ontstaan van tumoren niet direct voorspeld kan worden uit de functionele assays. Er moet wel gezegd worden dat het een vrij arbeidsintensieve aanpak is die bovendien specifieke kennis en vaardigheden vereist. Op dit moment zijn er al een aantal verbeteringen aangebracht die de tijdsduur verkorten waardoor onze methode beter toepasbaar en toegankelijk wordt.

Naar ons idee kan het maximale voordeel van onze aanpak behaald worden door een nauwe samenwerking tussen de kliniek en het lab, zoals we hebben laten zien in hoofdstuk 4 waar beide partijen hun kennis en kunde combineren om tot de best mogelijke classificatie te komen.