



Samenvatting van het proefschrift

Celine H.M. Leenen

"Diagnostic strategies for early Lynch syndrome detection"

Promotiedatum: 28 januari 2015

Universiteit: Erasmus Universiteit Rotterdam

Promotor:

Prof. dr. E.J. Kuipers

Prof. dr. E.W. Steyerberg

Co-promotors:

Dr. W.N.M. Dinjes

Dr. M.E. van Leerdam

Dr. A. Wagner

Lynch syndroom (LS) is een autosomaal dominant overervend kanker-syndroom dat wordt gekenmerkt door het ontstaan van verschillende kwaadaardige tumoren, voornamelijk dikke darmkanker en baarmoeder kanker. LS wordt veroorzaakt door kiembaan mutaties in de DNA herstelgenen MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 of het TACSTD1 gen. Aangezien surveillance door middel van colonoscopie heeft bewezen de morbiditeit en mortaliteit van darmkanker met 65-70% terug te brengen, is vroege opsporing van LS belangrijk.¹⁻³ De huidige diagnostiek van LS bestaat uit een combinatie van klinische criteria (gereviseerde Bethesda richtlijnen) en tumorweefselanalyse. Moleculaire tumorweefselanalyse bestaat uit micro-satelliet instabiliteit (MSI) analyse in combinatie met immuno-histochemische kleuring van DNA hersteleiwitten en methylerings-onderzoek van de MLH1-promoter. De definitieve diagnose LS wordt gesteld bij een bewezen kiembaanmutatie in één van de DNA herstelgenen of het TACSTD1 gen. Het doel van dit proefschrift was om te onderzoeken of routine moleculaire screening voor LS kan bijdragen aan vroegtijdige opsporing van LS. Het eerste deel van dit proefschrift beschrijft uitdagingen en valkuilen van tumorweefselanalyse voor LS en het meer zeldzame 'constitutionele mismatch repair-deficiëntie' (CMMR-D). In het tweede deel van dit proefschrift worden de resultaten van een grote populatie studie genaamd LIMO (Lynch Immunohistochemisch en MSI Onderzoek) beschreven. In dit prospectieve cohort bestaande uit 1117 patiënten met darmkanker ≤ 70 jaar, 125 patiënten met advanced adenomen (darmpoliepen) ≤ 45 jaar en 179 patiënten met baarmoeder kanker ≤ 70 jaar, werd routine moleculaire analyse voor LS uitgevoerd en de opbrengst geëvalueerd. Aanvullend werd de kosteneffectiviteit van deze strategie berekend. Een andere diagnostische strategie voor LS om de kans op een mutatie in een van de DNA

herstelgenen te voorspellen is het gebruik van predictiemodellen. Een aantal van deze predictiemodellen voor LS werd in internationaal onderzoekverband gevalideerd. De belangrijkste resultaten van deze studies zijn samengevat in dit hoofdstuk.

Deel I: Uitdagingen en valkuilen van moleculaire analyses
Tumorweefselanalyse in CMMR-D Constitutionele mismatch repair-deficiëntie (CMMR-D) is een zeldzaam kankersyndroom veroorzaakt door biallelische (beide allelen) mutaties in de DNA herstelgenen. Dit syndroom wordt gekenmerkt door de ontwikkeling van hematologische maligniteiten, hersentumoren en tumoren in het maagdarmsstelsel op jonge leeftijd. Meer dan 100 kinderen met CMMR-D zijn beschreven in de literatuur.⁴⁻⁹ Bij tumorweefselanalyse van maag- en darmtumoren van deze patiënten werd, in overeenstemming met LS, MSI en afwezigheid van DNA herstel eiwitexpressie gevonden.⁹ Echter, MSI bleek niet detecteerbaar in hersentumorweefsel van de meeste gerapporteerde CMMR-D patiënten.^{7, 8} In hoofdstuk 2, beschrijven wij een familie met biallelische kiembaanmutaties in het PMS2 gen uit het Erasmus MC klinisch onderzoekscohort van de afdeling Klinische Genetica. Er werd onder andere bij twee kinderen behorend tot deze familie hersenkanker en bij hun vader darmkanker op jonge leeftijd vastgesteld. Tumorweefselanalyse van tumoren uit deze familie toont de valkuilen van de huidige diagnostische strategie voor CMMR-D. MSI analyse van in totaal vijf tumoren uit deze familie toont slechts één tumor met MSI. Echter, immunohistochemische analyse van DNA herstel eiwitten toont afwezige expressie van PMS2 in de hersentumoren van twee familieleden. Deze bevinding is in overeenstemming met vijf eerder onderzochte hersentumoren van CMMR-D patiënten beschreven in de literatuur.^{7, 8, 10, 11} Uit de literatuur en de bevindingen bij deze familie kan worden geconcludeerd dat immunohistochemisch onderzoek van de DNA hersteleiwitten gevoeliger is dan MSI analyse in hersentumoren van CMMR-D patiënten. Om deze reden is het aan te bevelen in geval van een klinisch fenotype passend bij CMMR-D, routinematig MSI analyse te combineren met immunohistochemisch onderzoek van de DNA hersteleiwitten. In geval van onduidelijke of tegenstrijdige resultaten van deze onderzoeken, zal kiembaanmutatieanalyse moeten worden overwogen na counseling van de patiënten en hun familieleden. Daarnaast zal toekomstig onderzoek in Europees verband verder richting geven aan surveillance adviezen voor dit zeldzame kankersyndroom.¹² Patiënten verdacht voor LS zonder aangetoonde kiembaanmutatie. Vanuit onze recente prospectieve cohortstudies onder darmkanker en baarmoeder kankerpatiënten is bekend dat 35% van de patiënten verdacht voor LS op basis van tumorweefselanalyse, geen kiembaanmutatie blijkt te hebben in één van de DNA herstelgenen.^{13, 14} Het is mogelijk dat kiembaanmutaties, die op dit moment nog niet in verband staan met LS, een rol spelen. Daarnaast kunnen somatische mutaties in DNA herstelgenen optreden.¹⁵ Onlangs, werden door Mensenkamp et al. 25 MSIpositieve tumoren gescreend op het optreden van deze somatische mutaties en verlies van heterozygotie (LOH) in mutL homolog 1 (MLH1) en mutS homolog 2 (MSH2). In 13 van de 25 tumoren

(52%, 8 MLH1 deficiënte en 5 MSH2 deficiënte tumoren), werden twee somatische mutaties geïdentificeerd in MLH1 en MSH2. Wij testten 40 tumoren (baarmoederkanker en darmkanker) van patiënten verdacht voor LS voor somatische afwijkingen in de DNA herstelgenen (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) door middel van next generation sequencing en LOH analyse (hoofdstuk 3). In de helft (21/40) van deze MSI tumoren werden twee somatische afwijkingen in de DNA herstelgenen gevonden. Geconcludeerd werd dat in deze gevallen de tumoren niet geassocieerd zijn met een kiembaanmutatie in het kader van LS. Hieruit volgend hoeven familieleden veelal geen LS surveillance programma te volgen. Vanwege deze belangrijke gevolgen, adviseren wij om analyse naar somatische DNA afwijkingen en LOH analyse toe te voegen aan de huidige diagnostische tests voor LS in tumorweefsel.

Deel II: Klinische en populatie studies Routine moleculair onderzoek

Uit een eerdere studie door Van Lier et al. is bekend dat de gereviseerde Bethesda richtlijnen onvoldoende worden toegepast in de klinische praktijk. Dit is een van de redenen dat er sprake is van onderdiagnostiek van LS.¹⁶ In 2008 werden de MIPA criteria in Nederland geïntroduceerd met een centrale rol voor de patholoog (Tabel 3, Hoofdstuk 1). Echter, deze strategie detecteert slechts een beperkt deel van de mutaties en mist met name mutaties in de genen MSH6 en PMS2 aangezien de gemiddelde leeftijd van de diagnose darmkanker bij deze mutatiedragers boven de leeftijd van 50 jaar is.^{17, 18} In de prospectieve LIMO studie werd routine moleculaire screening door middel van MSI analyse in combinatie met immunohistochemisch onderzoek van DNA hersteleiwitten en MLH1 hypermethylering in 1117 dikke darmkanker patiënten ≤ 70 jaar geëvalueerd (hoofdstuk 4). Screening leverde een moleculair profiel verdacht voor LS in 4,5% van de darmkanker patiënten ≤ 70 jaar op. In totaal werden 24 LS mutatiedragers (2%) via deze strategie opgespoord. Twintig patiënten verdacht voor LS (74%) voldeden aan de gereviseerde Bethesda richtlijnen. Interessant is dat een grote meerderheid van de opgespoorde LS mutatiedragers (70%) ouder dan 50 jaar was en dus niet zou worden opgespoord via het momenteel gebruikte leeftijdscriterium voor LS screening. Op basis van deze resultaten adviseren we om de leeftijdsgrens voor LS screening bij darmkanker patiënten uit te breiden naar 70 jaar. Dit resultaat wordt ondersteund door twee internationale prospectieve studies.^{19, 20} MSI kan zelfs al worden aangetoond in advanced adenomen (darmpoliepen). Om deze reden werden 125 patiënten ≤ 45 jaar met advanced adenomen routinematig gescreend voor LS. Adenomen werden als advanced geclassificeerd wanneer: 1) de diameter van het adenoom groter dan 10 mm was, 2) het adenoom een vilieuze component bevatte ($\geq 25\%$) of hooggradige dysplasie, of 3) wanneer minimaal drie synchrone adenomen (ongeacht grootte en histologie) werden gevonden bij één patiënt. In alle drie de patiënten (2.4%) met advanced adenomen verdacht voor LS werd een kiembaanmutatie vastgesteld. Deze patiënten met advanced adenomen zouden niet zijn ontdekt via de gereviseerde Bethesda richtlijnen of de huidige nationale richtlijnen voor opsporing van LS. De opsporing van LS in

patiënten met advanced adenomen is van groot belang, omdat behalve familieleden, ook deze patiënten zelf mee kunnen doen aan surveillance programma's die morbiditeit en mortaliteit van dikke darmkanker verminderen met 65-70%.¹⁻³ Daarnaast evalueerden we volgens dezelfde methode routine moleculair onderzoek in baarmoeder kankerpatiënten tot en met de leeftijd van 70 jaar (hoofdstuk 5). In Nederland adviseren de MIPA criteria en de internationale richtlijnen van de Society of Gynaecologic Oncology LS screening bij baarmoederkanker patiënten onder de leeftijd van 50 jaar of bij patiënten met twee of meer LS geassocieerde tumoren.^{21, 22} In onze studie hebben we routine moleculaire screening voor LS onderzocht in 179 baarmoederkanker patiënten tot en met 70 jaar. Elf patiënten (6%) werden verdacht voor LS en in zeven patiënten (4%) werd de diagnose LS vastgesteld met kiembaanmutatie analyse. Een belangrijke meerderheid, namelijk 92% van de patiënten verdacht voor LS was ouder dan 50 jaar op het moment van diagnose. Bovendien, vonden we dat 82% van de patiënten verdacht voor LS niet aan de Amsterdam criteria II voldeden en 73% niet aan de gereviseerde Bethesda richtlijnen voldeden. Deze bevindingen geven aan dat de huidige richtlijnen niet geschikt zijn om LS te detecteren in baarmoederkanker patiënten. Op basis van deze gegevens dient routine moleculair onderzoek voor LS niet beperkt te blijven tot baarmoeder kankerpatiënten jonger dan 50 jaar. Kosteneffectiviteit van routine moleculaire screening In eerder gepubliceerde kostenstudies werden Markov modellen gebruikt om de kosteneffectiviteit van de opsporing van LS te berekenen. In hoofdstuk 6 werd kosteneffectiviteit van het prospectieve cohort met darmkanker patiënten ≤ 70 jaar geëvalueerd. Belangrijk is dat via de gedetecteerde LS patiënten, 67 LS mutatedragers gevonden werden onder de familieleden. Bij berekening van de kosteneffectiviteit van moleculaire screening voor LS bij darmkanker patiënten ≤ 70 jaar bleek een incrementele kosteneffectiviteitsratio van €19.695 per gewonnen levensjaar in vergelijking met LS screening volgens de gereviseerde Bethesda richtlijnen. Geconcludeerd werd dat routine screening voor LS door middel van analyse van MSI, immunohistochemisch onderzoek van de DNA hersteleiwitten en MLH1 hypermethylering in tumorweefsel van darmkanker patiënten tot en met 70 jaar een kosteneffectieve strategie is, met belangrijke klinische voordelen voor darmkanker patiënten en hun familieleden. Predictiemodellen Predictiemodellen voor LS zijn ontwikkeld om de kans op een mutatie in een van de DNA herstelgenen te voorspellen. Een groot voordeel van predictiemodellen is dat het risico op LS mutaties wordt gekwantificeerd. Bovendien kunnen deze modellen gebruikt worden voor individuen zonder beschikbaar tumorweefsel of wanneer geen kiembaan mutatie wordt gevonden. Echter, grootschalige validatie van LS predictiemodellen in verschillende darmkanker populaties was nog niet gedaan. Om deze reden hebben we meegewerkt aan een grote internationale validatie studie voor predictiemodellen (hoofdstuk 7). Zes klinische en vijf populatiecohorten bestaande uit dikke darmkanker patiënten werden geïncludeerd in deze validatie studie. Dit resulteerde in een cohort bestaande uit 5755 darmkanker patiënten in totaal, respectievelijk 2304 patiënten uit klinische cohorten en 3451 patiënten uit populatie cohorten. Vanuit het

Erasmus MC werden zowel het klinische cohort van de afdeling Klinische Genetica met verwezen dikke darmkanker patiënten op basis van klinische criteria, als het LIMO populatie cohort met dikke darmkanker patiënten die routinematig gescreend waren voor LS, geïnccludeerd. In het totale cohort werden drie predictiemodellen bestudeerd: MMRPredict, MMRPro en PREMM1,2,6. De voorspelde kans op een pathogene mutatie in de genen MLH1 MSH2 en MSH6 werd berekend door elk model afzonderlijk. Genspecifieke voorspellingen werden berekend door MMRPro en PREMM1,2,6. Bij 539/2304 (23%) patiënten uit de klinische cohorten en bij 150/3451 (4,4%) patiënten uit de populatie cohorten werden mutaties vastgesteld. Discriminatie van alle drie de geteste predictiemodellen was vergelijkbaar voor de klinische en populatie cohorten. Mutatie specifieke voorspellingen door de modellen MMRPro en PREMM1,2,6 werden klinisch bruikbaar bevonden. De resultaten voor het klinische Erasmus MC cohort en populatie cohort LIMO, lieten een betere prestatie van PREMM1,2,6 in vergelijking met de andere twee predictiemodellen zien. Het voorspellen van de kans op DNA herstel genmutaties bleek het minst nauwkeurig voor MSH6 in het Erasmus MC klinische en het LIMO populatie cohort in vergelijking met andere cohorten, mogelijk vanwege het bekende founder effect van MSH6.²³

Familiecommunicatie Zodra LS in een familie wordt vastgesteld, kan genetisch onderzoek binnen de gehele familie worden aangeboden via de vastgestelde LS mutatie drager (index patiënt). Uit eerder onderzoek door Ramsoekh et al. is bekend dat slechts de helft van familieleden deelneemt aan genetisch onderzoek voor LS.²⁴ Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat er een tekort aan beschikbare informatie is voor familieleden, vanwege de huidige familie-gemedieerde aanpak. Deze aanpak impliceert dat familieleden worden geïnformeerd door een familielid over LS. We evalueerden de tevredenheid van patiënten met deze huidige familie communicatie procedure (hoofdstuk 8). Hoewel de meerderheid van de respondenten aangaf tevreden te zijn met de huidige familie communicatie procedure binnen de onderzochte families, gaf een meerderheid van de respondenten (57%) aan het worden geïnformeerd door een familielid als (matig) belastend te ervaren. Echter, een minderheid (21%) van de respondenten gaf de voorkeur aan een andere manier om familieleden te informeren over LS. De meesten van deze respondenten waren van mening dat familieleden rechtstreeks zouden moeten worden geïnformeerd door een medisch specialist. Tenslotte hebben we onderzocht om welke redenen LS familieleden afzien van counseling en genetisch onderzoek voor LS. De belangrijkste redenen die door zestien niet-geteste LS familieleden werden gerapporteerd om af te zien van genetisch onderzoek, betroffen problemen met levensverzekeringen en hypotheek, gelukkig zijn met het leven zoals het is en afwezigheid van lichamelijke klachten. De genoemde redenen ondersteunen vooral het belang van volledige informatie over genetisch onderzoek en de beschikbare surveillance programma's voor LS.