

## SAMENVATTING

### MUTATIE ANALYSE DOOR OLIGONUCLEOTIDE-GEMEDIEERDE GENVERANDERING: EEN FUNCTIONELE TEST VOOR MISMATCH REPAIR GEN VARIANTEN

Lynch syndroom (LS) is een erfelijke aandoening waardoor patiënten een verhoogd risico op vroegtijdige darm en endometriumkanker hebben. Dit is te wijten aan een inactiverende mutatie in één van de DNA mismatch herstel (MMR) genen: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* of *PMS2*. Bij hun geboorte zijn LS-patiënten heterozygoot voor de DNA MMR mutatie; tumoren vormen pas wanneer de gezonde kopie van het gen verloren gaat door somatische veranderingen. Dit heeft tot gevolg dat het DNA MMR systeem niet meer functioneert en de fouten die in het genoom optreden wegens foutieve DNA polymerase activiteit en blootstelling aan beschadigende stoffen, niet meer herkend worden. Hierdoor zal een mutator fenotype ontstaan wat de kans dat er een mutatie in een oncogen of tumor suppressor gen wordt geïntroduceerd vergroot en zo ook een verhoogd risico op kanker geeft.

Het is van uiterst belang dat LS correct gediagnostiseerd wordt om patiënten de optimale behandeling aan te bieden. LS wordt gediagnostiseerd op basis van het klinische fenotype, de tumor pathologie en genetische data. Typische LS-gevallen hebben een uitgebreide kankergeschiedenis in de familie waarbij kanker geassocieerd is met de aanwezigheid van een MMR gen mutatie en microsatelliet instabiele tumoren waarin één van de DNA MMR eiwitten afwezig is. Er zijn ook veel vermeende LS patiënten waarvoor de cosegregatie en tumor pathologie data onduidelijk zijn. In alle gevallen is de genetische analyse doorslaggevend; het vinden van een pathogene mutatie in één van de DNA MMR genen is vereist voor een definitieve LS-diagnose. Veel LS-veroorzakende varianten zijn nonsense en frameshift mutaties die overduidelijk het eiwit beknotten en het DNA MMR systeem beschadigen. Maar missense mutaties die één enkel aminozuur veranderen en zo tot MMR-deficiëntie leiden, worden ook geregeld ontdekt in (vermeende) LS patiënten. Zonder duidelijke functionele data, is de diagnose van vermeende LS patiënten met missense mutaties moeilijk omdat de consequenties van deze varianten lastig zijn in te schatten. Om het diagnostiseren van LS patiënten te vergemakkelijken, moeten er technieken aanwezig zijn die de klinische implicaties van DNA MMR gen 'variants of uncertain significance' (VUS) kunnen vaststellen. Dit proefschrift onthult een nieuwe methode voor het karakteriseren van DNA MMR gen varianten.

In *Hoofdstuk 1* geven we een uitgebreid overzicht van het DNA MMR systeem en hoe verlies van dit systeem tot kanker predispositie leidt. We beschrijven ook hoe LS behandeld wordt en benadrukken het belang van een correcte LS diagnose.

In *Hoofdstuk 2* wordt de genetische screen die we gecreëerd hebben voor het identificeren van pathogene *MSH2* DNA MMR gen varianten gepresenteerd. De genetische screen is opgezet in

muis embryonale stamcellen (mESCs) met een enkele kopie van het *Msh2* gen. Introductie van de gewenste *Msh2* variant in dit *Msh2* allel leidt tot expressie van alleen het variante eiwit. Om het effect van de variant op het MMR-systeem snel te zien, worden de cellen vervolgens blootgesteld aan de DNA-beschadigende stof 6-thioguanine (6TG). Alleen MMR deficiënte cellen zijn 6TG resistent; MMR deficiënte cellen gaan dood bij blootstelling aan 6TG. In principe kunnen dus alleen mESCs met MMR inactiverende mutaties de 6TG behandeling overleven. In een proof-of-principle studie met 12 bewezen-pathogene en 10 bewezen-niet-pathogene varianten tonen we aan dat de screen inderdaad (zwak en sterk) inactiverende MMR-mutaties kan onderscheiden van polymorfismen. Vervolgens hebben we de genetische screen benut om 59 *MSH2* VUS van vermeende-LS-patiënten te bestuderen. Negentien van de 59 VUS werden aangetroffen in 6TG-resistente cellen. Functionele analyses bevestigde de pathogene fenotypes van deze 19 varianten. In *Hoofdstuk 3* wordt de genetisch screen aangepast voor het karakteriseren van *MSH6* DNA MMR gen varianten. We demonstreren dat de screen pathogene *MSH6* mutaties kan identificeren en gebruiken het om het effect van 26 klinisch relevante *MSH6* VUS op MMR activiteit te bestuderen. Acht van de 26 varianten bleken tot MMR-deficiëntie te leiden. De resultaten van deze genetische screen werden vergeleken met de klinische en tumor pathologie data die verzameld waren door een aantal medische centra in Nederland of bekend waren uit de literatuur. In *Hoofdstuk 4* hebben we de applicatie van de genetische screen uitgebreid om ook *MLH1* DNA MMR gen varianten te karakteriseren. We bevestigen dat de screen inactiverende *MLH1* mutaties kan onderscheiden van polymorfismen en gebruiken het om de functionele implicaties van 50 *MLH1* VUS te bestuderen. Zesentwintig van de 50 varianten leiden tot MMR-deficiëntie. In *Hoofdstuk 5* benutten we de genetische screens beschreven in Hoofdstukken 2 en 4 om de functionele implicaties te bepalen van 18 VUS die ontdekt waren in de *MLH1* en *MSH2* genen van 21 vermeende-LS-families van het Erasmus Medisch Centrum Rotterdam en het Nederlands Kanker Instituut Amsterdam. Deze studie demonstreert de klinische relevantie van de genetische screen.

In *Hoofdstuk 6* vatten we de resultaten beschreven in dit proefschrift samen en bediscussiëren we de conclusies die eruit getrokken zijn. We concluderen dat de genetisch screen een veelbelovende diagnostische methode is die geïmplementeerd kan worden in klinisch genetische laboratoria die geconfronteerd worden met vermeende-LS-patiënten met DNA MMR gen VUS.