

## SAMENVATTING VOOR LEKEN

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek heeft als doel om de erfelijke factor voor paragangliomen in het hoofd/hals gebied te identificeren.

Paragangliomen zijn tumoren van het parasympathische zenuwstelsel, dat onder andere betrokken is bij het bewaken van de zuurstofconcentratie in het bloed. Deze tumoren kunnen door het gehele lichaam voorkomen, maar de erfelijke vorm betreft vooral tumoren die in het hoofd/hals gebied voorkomen, de HN-paragangliomen. HN-paragangliomen zijn onder andere te vinden bij de splitsing van de halsslagader (de carotid body tumor), in het middenoor (de glomus vagale tumor) of aan de schedelbasis (de glomus jugularis tumor). De meerderheid van deze tumoren is goedaardig en groeit langzaam. Er wordt geschat dat de jaarlijkse incidentie van deze tumoren tussen de 1 op de 100.000 tot 1 op de 1.000.000 personen is (Oosterwijk et al., 1996).

Van een aantal HN-paraganglioom patiënten is bekend dat ook andere familieleden deze tumoren hebben wat duidt op een erfelijke factor. Het interessante aan de overerving is dat de tumoren alleen ontstaan als deze erfelijke factor door de vader wordt doorgegeven. Als een moeder de factor doorgeeft ontstaan nooit tumoren maar haar erfelijk belaste zoon kan wel weer aangedane kinderen hebben. Zo'n ouder-afhankelijk effect wordt genomische imprinting genoemd.

Elk individu bestaat uit een zeer grote collectie van uiteenlopende typen cellen. Om te kunnen functioneren moet elke cel beschikken over de informatie die nodig is om al zijn moleculaire onderdelen te kunnen maken. In plaats van dat cellen nu alleen de informatie bevatten die voor hun specifieke functie nodig is b.v. voor het maken van specifieke spiereiwitten in spiercellen en lenseiwit in cellen van de ooglenzen, bevatten alle cellen de informatie voor alle celtypen. Echter alleen de voor hun specifieke functie noodzakelijke informatie is toegankelijk en kan worden gebruikt voor de productie van eiwitmoleculen die de bouw en functie van het celtype bepalen.

Deze informatie ligt opgeslagen in het DNA, dat de basen (letters) A, G, C en T bevat. Lange strengen basen (in wenteltrapvorm) vormen chromosomen, waarvan ieder individu 23 paren heeft: van chromosoom 1 t/m 22 één van de moeder en één van de vader, en twee geslachts-chromosomen (XX of XY). Tijdens de vorming van de geslachtscellen, de eicellen en zaadcellen, wordt het aantal chromosomen in tweeën gedeeld, zodat na samensmelting van de twee geslachtscellen elke cel in de embryo weer in totaal 46 chromosomen heeft. Tijdens de vorming van de geslachtscellen kunnen er stukken DNA uitgewisseld worden tussen de identieke chromosoomparen; dit wordt recombinatie genoemd. Het DNA codeert voor alle macromoleculen (eiwitten) die het lichaam nodig heeft, waarbij iedere opeenvolging van drie basen één onderdeel hiervan, een aminozuur, representeren. Het gehele stuk DNA dat codeert voor één zo'n eiwit heet een gen. Hoewel de overeenkomstige chromosomen in elk van de 21 paren lichaamschromosomen in principe dezelfde erfelijke informatie bevatten zijn er toch geringe verschillen die zorgen voor de variatie in erfelijke eigenschappen. Ook in de niet-coderende stukken DNA van de chromosomen komen verschillen voor b.v. variaties in de lengte van gerepeteerde base sequenties zoals CACACA... of TATTATTAT..... die ons in staat stellen de vaderlijke en moederlijke chromosomen van een paar te onderscheiden. Deze gerepeteerde DNA fragmenten liggen verspreid over alle chromosomen en zijn daarom zeer bruikbare markeringspunten ("markers") om een chromosomale positie (locus) aan te duiden. De lengte van deze markers varieert

met het aantal keren dat het base sequentie CA of TAT gerepeteerd is. De varianten van een bepaalde marker worden "allelen" genoemd. Elke persoon heeft dus voor iedere marker twee allelen: één van de vader en één van de moeder. Elk chromosoom bevat vele markers die onregelmatig verspreid liggen. Door dat bandenpatroon van meerdere markers (een soort streepjescode, aangeduid als "haplotype") van alle individuen van een grote familie met behulp van statistische programma's te vergelijken met het voorkomen van HN-paragangliomen kan een specifieke marker gevonden worden dat dichtbij het niet goed functionerende gen ligt dat deze tumoren veroorzaakt. Elk gen is uniek; als het gen dat als celgroeiremmers werkt echter kapot is, kan het niet goed meer, of helemaal niet meer functioneren en kunnen er bijvoorbeeld tumoren ontstaan. Een beschadiging van het DNA heet een mutatie; een mutatie kan bijvoorbeeld het veranderen van één base zijn of het missen (een deletie) van vele duizenden basen. Dit kan per aangedane familie verschillen. Het gemuteerde gen dat groei van HN-paragangliomen toestaat, is PGL1 genoemd (voor paragangliomen). Analyse van een Nederlandse familie (FGT1; Familiaire Glomus Tumoren) toonde aan dat het ergens gelokaliseerd is op de lange arm van chromosoom 11, 11q (Heutink et al., 1992). Mijn taak was nu om het PGL1 gen te vinden met de specifieke mutaties; de resultaten heb ik in dit proefschrift beschreven.

**Hoofdstuk 1** bevat de algemene inleiding, waarvan een klein gedeelte hierboven beschreven is.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we de analyse van 5 andere Nederlandse families met HN-paragangliomen. Recombinant-onderzoek plaatste het PGL1 gen in een interval van 16 centiMorgan (cM) op chromosoom 11q22-q23; een genetische afstand van 1 cM komt ruwweg overeen met 1 miljoen basen. Gezien het feit dat een enkel gen zo klein kan zijn als enkele honderden basen, is dit gebied dus nog veel te groot om het PGL1 gen te gaan zoeken.

In **hoofdstuk 3** beschrijven we de analyse van een zeer grote HN-paraganglioma familie, waardoor veel patiënten met elkaar vergeleken konden worden. Deze nieuwe familie (FGT189) bestaat uit de 3 verschillende families FGT1, FGT8 en FGT9 die door genealogisch of stamboom-onderzoek aan elkaar gekoppeld werden door een vrouw geboren in 1776. Alle patiënten vertoonden voor 3 markers (met de namen D11S1327, D11S1792 en D11S908) dezelfde allelen, wat het gen PGL1 in een interval van ongeveer 2 cM rondom deze markers plaatste. Een nadeel van deze 3 markers is het feit dat het allel dat gekoppeld is met de ziekte veel voorkomt (64%, 76% en 38%, respectievelijk), waardoor de kans vergroot is dat deze koppeling een toevalswaarneming is.

Indertijd werd een andere Nederlandse HN-paraganglioma familie (FGT2) beschreven door Mariman en collega's (1993,1995), maar zij lokaliseerden het gen (PGL2) in een ander gebied op hetzelfde chromosoom (11q13). Een mogelijke oorzaak zou kunnen zijn dat die familie een ander defect gen heeft dat de tumorgroei veroorzaakt. Het feit dat er meer dan één gen verantwoordelijk is voor een specifieke ziekte, wordt genetische heterogeniteit genoemd. Om deze genetische heterogeniteit te onderzoeken, hebben we in een samenwerkingsverband 17 families onderzocht met zowel markers in het gebied 11q22-q23 als in het gebied 11q13. Hieruit bleek onder andere dat alleen familie FGT2 genetische koppeling vertoonde met 11q13, terwijl alle andere 16 families met 11q22-q23 gekoppeld bleken (**hoofdstuk 4**).

Door het genealogisch onderzoek zoals vermeld in hoofdstuk 2, kregen we de indruk dat misschien wel meer families met HN-paragangliomen eenzelfde (verre) voorouder zouden kunnen hebben. Aangezien familie FGT189 uit de buurt van Leiden komt, hebben we alle 10 beschikbare HN-paraganglioma families uit Zuid-Holland geanalyseerd (**hoofdstuk 5**). Enerzijds met

stamboomonderzoek met behulp van burgerregisters en kerkregisters, en anderzijds met haplotype analyse. Het stamboomonderzoek terugvoerend tot omstreeks 1800 leidde niet tot koppeling van verschillende families, maar de genetische data liet zien dat al deze families hetzelfde haplotype hebben op het ziektechromosoom in de buurt van het PGL1 gen. Dit is een zeer sterke aanwijzing dat deze families toch een verre gemeenschappelijke voorouder hebben en dus ook allemaal dezelfde mutatie in het PGL1 gen hebben.

Het gebied van zo'n 2 miljoen basen waar het PGL1 gen zich zou moeten bevinden, is vervolgens uitgebreid bestudeerd. Om dit te doen is er gebruik gemaakt van stukjes DNA die in gist en bacteriën zijn gekloneerd, zodat er veel uitgangsmateriaal beschikbaar is. Vervolgens konden we verschillende bekende markers en genen precies lokaliseren (**hoofdstuk 9**). Eén gen trok onze aandacht, aangezien dit gen in de muis een belangrijke functie heeft in de embryonale ontwikkeling van hersenstructuren in het hoofd/hals gebied en tevens omdat het gemuteerde gen in de mens kan leiden tot kanker van bloedcellen (leukemie). Dit gen, PLZF voor promyelocytic leukaemia zinc finger gene, hebben we intensief onderzocht (**hoofdstuk 10**). Allereerst hebben we de precieze samenstelling van het gen bepaald; de stukken die coderen voor een deel van het eiwit (een exon) zijn namelijk gescheiden door stukken die niet coderen (de intronen). Elke base van het gen (in totaal meer dan 3000 basen) hebben we geanalyseerd, maar er is geen verandering gevonden in de patiënten. Dit zou erop kunnen duiden dat dit gen niet het PGL1 ziektegen is. In één van de intronen van het PLZF gen vonden we twee nieuwe markers (PLZF-CA en PLZF-CTTT). Analyse van de markers in familie FGT189 liet echter zien dat beide markers niet gekoppeld zijn met de ziekte, waardoor er een soort van zebra-patroon ontstond van gekoppelde en niet-gekoppelde markers. De koppeling van de allelen van de 3 markers D11S1792, D11S1327 en D11S908 was dus inderdaad een toevalstreffer, zodat we moesten concluderen dat het PGL1 gen dus in een ander klein gebied op chromosoom 11q22-q23 moet liggen.

Analyse van nieuwe markers in het grotere gebied waar PGL1 zou kunnen liggen (tussen markers D11S1647 en D11S2077, zo'n 6 cM) toonde aan dat er inderdaad een nieuw gebied van ongeveer 2 cM is waar PGL1 hoogstwaarschijnlijk gelokaliseerd is (**hoofdstuk 6**). In dit gebied zijn tot nu toe al 8 verschillende markers gevonden die in familie FGT189 gekoppeld zijn, waardoor de statistische significantie veel hoger is. Genetisch onderzoek van de andere HN-paraganglioma families toonde aan dat vrijwel alle Nederlandse families een verre voorouder delen, alhoewel een drietal families een andere voorouder lijken te delen. Families die uit het buitenland komen, o.a. België, India en USA, lijken inderdaad niet verwant te zijn aan deze specifieke Nederlandse voorouder en zouden dus een andere mutatie in het PGL1 gen kunnen hebben.

Zoals hierboven beschreven, zou PGL1 een functie als celtgroeiremmers kunnen hebben en fungeren als zogenaamd tumor suppressor gen. Om tumorgroei te initiëren, zullen beide genkopieën uitgeschakeld moeten worden. De eerste mutatie (hit) is reeds via de geslachtscellen overgedragen, en is bij een erfelijke belaste persoon aanwezig in alle cellen. De 2e hit vindt plaats in een lichaamscel en kan als deze door 'mitotische recombinatie' veroorzaakt wordt gepaard gaan met verlies van het "wild type" gen met flankerende DNA sequenties. Hierdoor zal van de markers die in de buurt liggen ook één allel verloren gaan. Dit fenomeen wordt LOH (loss of heterozygosity) genoemd. Analyse van HN-paragangliomen op LOH duidde erop dat er inderdaad een regio lijkt te zijn op chromosoom 11q22-q23 waar één van de twee allelen verloren is gegaan (**hoofdstuk 7**). Echter, er werd nooit een compleet verlies van een allel waargenomen, waardoor ook andere mogelijkheden tumorgroei kunnen

veroorzaken. In die gevallen waar we de ouder konden vaststellen van het allel dat een zwakker bandje gaf, was het altijd het maternale allel. Dit ondersteunt ons vermoeden dat PGL1 een tumor suppressor gen is, aangezien de eerste hit overgeërfd is via de vader en de 2e hit verlies van het maternale allel (met een nog functioneel PGL1-gen) zou moeten zijn. Door alle tumorsamples met elkaar te vergelijken, zou er een gemeenschappelijke regio gevonden moeten kunnen worden waar alle tumoren een verlies te zien geven en waar het desbetreffende gen zou moeten liggen. In ons geval zou het PGL1 gen ten opzichte van marker D11S560 meer naar het uiteinde van chromosoom 11q kunnen liggen, maar het zebra-patroon van wel en geen verlies, zoals waargenomen in een aantal samples, geeft aan dat dit nog geen eenduidige lokalisatie is.

Om het eventuele verlies beter te kunnen analyseren, hebben we uit tumorcoups specifieke cellen geïsoleerd. Een HN-paraganglioom bestaat uit twee typen cellen: de chieft (type I) cellen die geklusterd liggen en omgeven worden door de zogenaamde sustentacular (type II) cellen. De chieft cellen vertonen inderdaad compleet verlies van het wildtype allel, een indicatie dat PGL1 inderdaad een tumor suppressor gen is. Indien een tumor ontstaat uit een enkele voorouder cel die klonaal uitgroeit, zullen alle cellen hetzelfde defect bevatten. Indien in de tumorcellen het aantal chromosomen door verstoring van de normale celdelingsregulatie verandert (aneuploidie), zal dit dan ook in alle tumorcellen waargenomen worden. Dit is inderdaad het geval in de tumoren waar we gekeken hebben naar deze gesorteerde fracties. In de aneuploide fracties werd compleet verlies waargenomen van de regio rondom PGL1, een indicatie dat de chieft cellen deze fractie vormen en dat de tumoren inderdaad een klonale nieuwvorming zijn (**hoofdstuk 8**).

Het proefschrift wordt afgesloten met een algemene discussie (**hoofdstuk 11**), waarin ik naast het fenomeen van mogelijke recombinatie-onderdrukking op het ziektechromosoom, ook mogelijke modellen bespreek waarmee alle karakteristieken van deze tumoren verklaard zouden kunnen worden. In elk geval lijken deze tumoren een zeer specifieke groep te vormen en zouden ze een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan het begrijpen van het mechanisme van genomische imprinting en hoe dit verband houdt met het ontwikkelen van tumoren.