

Samenvatting

Het bestuderen van families waarin een zeldzaam “kanker” gen segregiert is niet alleen van zeer groot belang geweest voor het vinden van deze “kanker”genen maar ook voor het inzicht dat we nu hebben in erfelijke en sporadische vormen van kanker. De familiale aanleg voor kanker is ook aanwezig bij de ziekte van Cowden (CD), met name voor borst- en schildklierkanker. Karakteristiek voor dit ziektebeeld zijn de hamartomen die gevonden kunnen worden in verschillende organen en weefsels waaronder de huid, de schildklier, de borsten, het central zenuwstelsel en het maag-darm kanaal. Het specifieke symptoom voor dit ziektebeeld is de trichilemmoma in het gezicht, een goedaardige uitgroei van het haarzakje. Dit erfelijke ziektebeeld heeft een autosomaal dominante overerving.

Aan de start van het onderzoek hadden wij ons tot doel gesteld om het gen (de genen) te identificeren die betrokken is (zijn) bij CD en de rol die het speelt in tumorgenese en hersenontwikkeling. De eerste stap hiertoe was het vinden van de chromosomale lokalisatie van het CD gen. Eerdere onderzoeken, waaronder cytogenetische analyse, leverden niets op. Daarom werd besloten een koppelingsonderzoek te starten in 5 Nederlandse families. Gebruikmakend van deze strategie konden wij aantonen dat een gebied van chromosoom 10, q22-23, overerft met het CD fenotype (appendix 1). Het gebied van ongeveer 5cM werd gemarkeerd door de merkers D10S215 en D10S564. Er werden in deze studie geen aanwijzingen gevonden voor genetische heterogeniteit. De volgende stap was het verkleinen van het CD-gebied met behulp van positionele kloneringstechnieken en het testen van kandidaat-genen uit dit gebied. Drie andere groepen identificeerden echter een nieuw gen welke betrokken was bij verschillende soorten tumoren. Twee groepen maakten gebruik van het verlies van heterozygotie in tumoren om het PTEN-gen, zoals het nu genoemd wordt, te vinden. Het gen bevat een motief die gevonden wordt in de actieve site van “dual specificity” fosfatasen en was gevonden in het chromosomale gebied dat betrokken was bij CD en dus een duidelijk kandidaat-gen. Inderdaad werden er erfelijke mutaties gevonden in CD patiënten en hiermee werd aangetoond dat PTEN betrokken is bij CD (appendix 2). PTEN is het eerste fosfatase dat herkend is als een tumor suppressor gen en was hiermee het lang verwachte bewijs van de rol die fosfatasen spelen bij celgroei en tumorigenese. Biochemische studies hebben ondertussen aangetoond dat PTEN fosfatase activiteit specifiek is voor de 3'positie van het PtdINS-3,4,5-P₃, een membraangekoppelde second messenger. PTEN reguleert hiermee de activiteit van verschillende signaaleiwitten waarvan op dit moment PKB/Akt de meest belangrijke lijkt. Ongeveer 80% van de CD patiënten heeft een mutatie in het PTEN

gen. Echter, in 20% van de CD patiënten wordt geen PTEN mutatie gevonden. Deze patiënten hebben mogelijk een mutatie in een intron of de promotor van PTEN. Dit kan echter ook duiden op genetische heterogeniteit.

Twee grote studies hebben geprobeerd genotype-fenotype correlaties te vinden. De grote variatie in expressie van het ziektebeeld, zelfs binnen families, is waarschijnlijk de belangrijkste reden dat deze niet werden gevonden (appendix 3). Erfelijke PTEN mutaties werden ook gevonden in een gerelateerd ziektebeeld, nl. Banayan-Riley-Ruvalcaba (BRR). Er zijn ook families gevonden met PTEN mutaties waarin zowel CD als BRR gediagnostiseerd is. Het is dus waarschijnlijk dat beiden fenotypes tot hetzelfde ziektebeeld behoren. Een logische verklaring voor deze variatie in expressie is de invloed van “modificeer” genen. De verscheidenheid in expressie van PTEN mutaties is mogelijk nog breder. Om dit te bestuderen hebben we de resultaten van de PTEN mutatie analyse bij 23 Cowden-like patiënten gecombineerd met het klinisch beeld van de patiënten. De belangrijkste uitkomst van deze studie is dat het erg waarschijnlijk is dat het PTEN-fenotype beperkt is tot CD en BRR.

Een groot aantal verschillende somatische tumoren werden geanalyseerd op het al of niet aanwezig zijn van PTEN mutaties. En inderdaad werden er grote aantallen mutaties gevonden in deze tumoren. In sommige tumoren, zoals glioblastomas en prostaatkanker, zijn PTEN mutaties geassocieerd met tumorprogressie, terwijl in andere tumoren (bv. endometrium tumoren) verlies van PTEN-activiteit juist een vroege gebeurtenis in de tumorontwikkeling is. Wij hebben twee genetische subtypes van de oligodendrogiale tumoren (OT) bestudeerd, waarvan er 1 vaak een verlies van een (gedeelte)chromosoom 10 laat zien, en deze vergeleken met glioblastomas (GBM) op het hebben van PTEN mutaties. Mutaties werden niet gevonden in de laaggradige OT en maar één mutatie werd gevonden in de hooggradige OT. Echter, in GBM worden frequent mutaties gevonden en deze bevinding duidt erop dat hooggradige OT een herkenbaar subtype is en geen GBM (appendix 5). De grootschalige mutatie analyse van een groot aantal verschillende tumoren laat zien dat PTEN tot een van de meest gemuteerde genen behoort in humane kanker.

Als laatste hebben we geprobeerd meer inzicht te krijgen in de ontwikkelingsaspecten van PTEN door een gedetailleerde analyse van het RNA-expressie patroon van PTEN tijdens de embryogenese en de postnatale hersenontwikkeling in de muis. De resultaten bevestigden de algemene expressie van PTEN, eerder gevonden m.b.v. Northern blot analyse. Er zijn echter een aantal weefsels/organen die opvallen door de hoge expressie die gevonden wordt. De verhoogde expressie in bv. de follikels van de vibrissae, de huid en het darmepitheel correleert met de verschijnselen die in CD gevonden worden. Er zijn echter ook weefsels die

een hoge PTEN expressie hebben maar waaraan geen risico verbonden is bij de mens. De algemene expressie die gevonden wordt in de muis past bij de veelzijdige rol die PTEN speelt in verschillende celtypes.

Samenvattend, de identificatie en karakterisatie van het genetisch defect in CD heeft het mogelijk gemaakt om betrouwbare post- en prenatale diagnostiek toe te passen en heeft bijgedragen tot nieuwe inzichten in het proces van oncogene transformatie (hoofdstuk 2).