

De diagnostiek van het Lynch syndroom



29 mei 2008

C.E. van Kleef
1100398
Hogeschool Utrecht

ErasmusMC
Afdeling Josephine Nefkens Instituut
Unit Moleculaire Diagnostiek

Stagebegeleiders:
Dr. W.N.M. Dinjens
Dr. H.J. Dubbink
Ing. M.H.A. Oomen

Samenvatting:

In deze studie is vanuit het Erasmus Medische centrum (ErasmusMC) gekeken naar de mogelijkheid voor een betere diagnostiek van hereditair non-polyposis colorectaal carcinoom (HNPCC) oftewel het Lynch syndroom. Lynch syndroom is maar 3-4% van alle colorectaal kankers in de nederlandse populatie en wordt snel over het hoofd gezien. De overlevings kans is maar 50% en daarom is het belangrijk dat er een goede gevoelige diagnostiek is voor Lynch syndroom.

Het betreft een prospectieve studie naar de voorspellende waarde van moleculaire onderzoek zoals microsatelliet instabiliteit (MSI), immunohistochemische (IHC) kleuringen van mismatchrepair (MMR) genen en MLH1 hypermethylatie.

Deze experimenten zijn uitgevoerd op resectie preparaten en bipten van colorectaal carcinomen (CRC), adenomen van de colon en endometrium carcinomen (EC).

Microsatelliet instabiliteit geeft een verandering van de lengte van het desoxyribonucleïnezuur (DNA) wat aan te tonen is met behulp van een polymerase chain reaction (PCR).

Door amplificatie van vijf verschillende markers wordt er gezocht naar microsatellieten instabiliteit. De markers bestaan uit primer paren waarvan een, de forward, is gelabeld met fluorescentie en aantoonbaar met behulp van een ABI.

Naast de het aantonen van MSI word er ook gekeken naar de expressie van de mismatch repair genen, MLH1, MSH2, MSH6 en PMS2.

Deze vier genen zorgen ervoor dat tijdens DNA replicatie fouten hersteld worden. Ook de lengte van de microsatellieten worden constant gehouden met deze genen.

Mocht er een defect zijn in een van deze genen dan kan er MSI ontstaan.

Een defect in het MLH1 gen kan ook voorkomen bij sporadische vormen van dikke darmkanker.

Om toch onderscheid te maken of het defect veroorzaakt wordt door een mutatie van één van de MMR genen of door sporadische kanker kan er gekeken worden naar de hypermethylatie van de MLH1 promotor.

Als de promotor gemethyleerd is dan het MLH1 eiwit niet worden afgelezen en ontstaat er een defect in het herstellen van DNA schade. In het geval van Lynch syndroom zal het defect niet komen door promotor methylatie maar door een mutatie in één van de MMR genen zoals bijvoorbeeld een missense-mutatie.

Met behulp van de aangepaste Bethesda criteria die in het onderzoek zijn gebruikt, zijn er 213 patiënten gevonden die voldeden aan minimaal één van de regels. Van deze 213 patiënten zijn 227 weefsels onderzocht afkomstig uit het colon of rectum. Van de 213 onderzochte patiënten zijn er 9 (4,2%) patiënten met een verdenking voor Lynch syndroom.

Summary:

In this study from the Erasmus Medical Centre (ErasmusMC) it has been studied if a better diagnosis for Hereditair Non-PolyPosis Colorectal Carcinoma (HNPCC) or the Lynche syndrome is possible. Only 3-4% of the colorectal cancers in the dutch population are Lynch syndroom and because it is so low percentage it's easily been overlooked. The survival percentage is only 50% and that's why a better and sensitiver diagnostic for Lynch syndroom is needed.

It concerns a prospective study of the predictive value of molecular research methodes such as microsatellite instability (MSI), immunohistochemistry (IHC) of mismatch repair (MMR) genes and MLH1 hypermethylation. This methodes has been carried out on resection preparations and biopsies of colorectaal carcinomas (CRC), adenomen of the colon and endometrium carcinomas (EC).

MSI results in a change of the length of the desoxyribonucleic acid(DNA) which can be detected by using polymerase chain reaction (PCR).

Five different markers for MSI have been investigated. These markers are standing of primer pairs where one primer, usually the forward, have been labeled with fluorescence and perceptible using ABI. Beside the MSI method there is also looked at the expression of the mismatch repair genes, MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 with IHC.

These four genes ensure that during DNA replication errors are repaired. Also the length of the microsatellites is kept constant by these genes.

If there is a failure of one of these genes then MSI can arise there.

A failure of the MLH1 gene expression can also occur in sporadic forms of thick bowel cancer. To distinguish if the failure is caused by mutation in one of the MMR genes or by sporadic cancer there can be looked at the hypermethylation of the MLH1 gene promoter.

If the promoter has been methylated the gene can't be expressed and arises a failure in DNA repair during replication.

In the case of Lynch syndrome the defect is not caused by promoter methylation but by a mutation like for example missense-mutation.

Using the adapted Bethesda criteria which have been used in the research, 213 patients who satisfied to minimum of one of the rules, have been found. Of these 213 patients 227 tissues have been examined originating from colon or rectum. Of the 213 examined patients 9 (4.2%) patients has been found with a suspicion of Lynch syndrome.

AFKORTINGEN

ABI	-	AppliedBiosystems genetic analyzer
Bp	-	Basenparen
CRC	-	colorectaal carcinoom
DAB	-	diaminebenzidine
DNA	-	Desoxyribonucleïnezuur
EC	-	endometrium carcinoom
ErasmusMC	-	Erasmus Medisch Centrum
FAP	-	Familiaire adenomateuze polyposis
FFPE	-	Formaline-Fixed Paraffine-Embedded
HE	-	haematoxyline-eosine
HNPCC	-	hereditair non-polyposis colorectaal carcinoom
HRP	-	horse radish peroxide
IHC	-	Immunohistochemie
ISO	-	International Organization for Standardization
JNI	-	Josephine Nefkens Instituut
MDL	-	Maag, Darm-Lever
MLH1	-	MuL Homologous 1
MMR	-	Mismatch repair
MSH2	-	MutS Homologous 2
MSH6	-	MutS Homologous 6
MSI	-	Microsatelliet instabiliteit
MSS	-	Microsatelliet stabiliteit
PCR	-	Polymerase Chain Reaction
PMS2	-	Postmeiotische segregatie 1

Inhoud:

- Samenvatting/summary	2/3
- Afkortingen	4
- 1 Inleiding	
- 1.1 Het Lynch syndroom	6
- 1.2 Microsatellieten	12
- 1.3 Mismatch repair genen	14
- 1.4 Immunohistochemie	15
- 1.5 Hypermethylatie	18
- 2 Materialen en methoden	
- 2.1 Coupes prepareren	20
- 2.2 DNA isolatie	21
- 2.3 PCR	22
- 2.4 Multiplex PCR	23
- 2.5 ABI	24
- 2.6 Genemarker	25
- 2.7 Immunokleuring	26
- 2.8 Hypermethylatie	27
3 Resultaten	29
4 Conclusie/Discussie	38
- Literatuur	
- Bijlage	
- tabellen	

1 Inleiding:

1.1 HET LYNCH SYNDROOM

De moleculaire diagnostiek unit waar het onderzoek naar het Lynch syndroom wordt uitgevoerd is onderdeel van het Josephine Nefkens Instituut (JNI). Het JNI brengt een aantal onderzoeksgroepen samen die research doen naar de moleculaire pathologie van kanker in het Erasmus Medisch Centrum (ErasmusMC) te Rotterdam.

De pathologie afdeling is onder te verdelen in diagnostisch onderzoek en research.

Met moleculaire technieken wordt er routinematig onderzoek gedaan op verschillende soorten kanker zoals hersentumoren, darmkanker en slokdarmkanker.

Er zijn verschillende gradaties van darmkanker.

Poliepen zijn kleine uitstulpingen van het weefsel wat makkelijk weggehaald kan worden en niet kwaadaardig is.

Adenomen zijn grotere poliepen en moeten operatief verwijderd worden en kunnen uitgroeien tot carcinomen, kwaadaardige tumoren₍₆₎.

Kanker van de dikke darm en endeldarm, kortweg samengevat onder de naam colorectaal carcinoom, is de meest voorkomende vorm van kanker, met 10000 nieuwe gevallen per jaar in Nederland₍₅₎.

In het onderzoek is gekeken naar kanker in het colon en endometrium. De onderzochte soort darmkanker valt onder colorectaalcarcinoom (CRC) en dan specifiek erfelijke dikke darmkanker, 'hereditair non-polyposis colorectaal carcinoom' (HNPCC). Colorectaal kanker is een van de 3 meest voorkomende soorten van kanker met de hoogste sterf gevallen in de westelijke wereld.

Ondanks continue verbeteringen in de behandeling methoden blijft de overlevingskans van 5 jaar maar beperkt tot 5-6%₍₂₂₎.

Vijf tot dertien procent van CRC vallen onder het Lynch syndroom_(2,11).

Dit is een autosomale dominant erfelijke ziekte, die leidt tot dikke darmkanker op relatieve jonge leeftijd.

De ziekte is met name nauwkeurig in kaart gebracht door Lynch en om die reden wordt de ziekte ook wel aangeduid als het Lynch syndroom_(3,5,9).

Familiaire adenomateuze polyposis (FAP) is de andere meest voorkomende autosomale dominante ziekte die leidt tot dikke darmkanker.

Het verschil met het Lynch syndroom is dat FAP gekarakteriseerd wordt door honderd tot duizenden poliepen in de aangedane darm₍₉₎.

Indien onbehandeld ontwikkelt meer dan 70% van de dragers van Lynch syndroom-genmutaties colorectalkanker en 50% van de vrouwelijke draagsters baarmoederkanker, vaak al op jongere leeftijd₍₇₎.

Het is zeer belangrijk om vrouwen met endometrium carcinoom te identificeren omdat deze een hoog risico hebben tot ontwikkeling van colorectaal carcinoom. Lynch syndroom komt voor bij <10% van alle endometrium kanker₍₁₈₎.

Door onderzoek middels regelmatige coloscopie met verwijdering van adenomateuze colonpoliepen, het voorstadium van colonkanker, kan de ontwikkeling van colorectaalcarcinoom worden voorkomen bij dragers met Lynch syndroom mutaties₍₄₎.

Omdat mutatie screening duur is, zijn er klinische criteria opgesteld om te helpen met het opsporen van patiënten die zeker moeten worden gescreend omdat zij hoge kans hebben op het Lynch syndroom₍₂₀₎.

Opsporing van potentiële dragers van het Lynch syndroom mutatiegen gebeurt op basis van klinische gegevens die vallen onder de zogenaamde Amsterdam₍₉₎ of Bethesda_(1,2) criteria.

De Amsterdamse criteria zijn ontstaan door de internationaal samenwerkende groep voor Lynch syndroom en geldt als de gouden standaard gebaseerd alleen op een mutatie in een van de mismatch repair (MMR) genen.

De Bethesda criteria zijn later ontstaan en includeert de microsatellieten instabiliteit (MSI)₍₂₃₎.

Amsterdam criteria II: indien voldaan wordt aan de volgende criteria is er waarschijnlijk sprake van het Lynch syndroom:

1. Histologisch bewezen colorectaal carcinoom (CRC) of carcinoom van endometrium, dunne darm, ureter of nierbekken vastgesteld bij ten minste drie familieleden, waarvan één een eerstegraads familielid is van de andere twee, en
2. Bij ten minste één van de drie patiënten is de diagnose gesteld <50 jaar, en
3. Ten minste twee opeenvolgende generaties zijn aangedaan, en
4. Familiäre adenomateuze polyposis is uitgesloten

Gereviseerde Bethesda criteria: Indien voldaan wordt aan één van deze criteria bestaat er verdenking op het Lynch syndroom en is er een indicatie voor moleculair genetisch onderzoek van de tumor:

1. Patiënt met CRC <50 jaar
2. Patiënt met synchrone of metachrone het Lynch syndroom geassocieerde carcinomen, ongeacht leeftijd
3. Patiënt met CRC <60 jaar met MSI geassocieerde pathologie
4. Patiënt met CRC en een eerstegraads familielid met een Lynch syndroom geassocieerde tumor, een van beide gediagnosticeerd <50 jaar
5. Patiënt met CRC met twee of meer eerste- of tweedegraads familieleden met een het Lynch syndroom geassocieerde tumor, ongeacht leeftijd

Door de toevoeging van de Bethesda criteria is de specificiteit toegenomen vergeleken met de Amsterdamse criteria maar er worden wel grote aantallen families met het atypische Lynch syndroom gevonden₍₂₃₎.

Tijdens deze studie wordt gekeken of deze bestaande criteria aangepast kunnen worden om zo tot een betere opsporing van het Lynch syndroom te komen. De inclusiecriteria voor de studie zijn:

Patiënt met CRC < 70 jaar (geboren $\geq$ 01-01-1937)

Patiënt met 'advanced' adenoom < 45 jaar
(geboren $\geq$ 01-01-1962);

Hooggradige dysplasie, en/of
Villieuze component, en/of
Adenoom $\geq$ 10 mm, en/of
 $\geq$ 3 adenomen

Patiënt met endometrium carcinoom < 70 jaar
(geboren $\geq$ 01-01-1937);

Endometrium carcinoom alleen na resectie, geen biopsie
Ongeacht histologisch type van de tumor

Deze studie is een samenwerking van de afdelingen Pathologie, Maag-Darm en Lever (MDL) ziekten en Klinische genetica.

In het kader van deze studie zullen MSI bepaling, IHC kleuring en MLH1 promotor methylatie status systematisch worden uitgevoerd in ongeveer 800 nieuw gediagnosticeerde colorectaal- en endometriumcarcinomen van patiënten jonger dan 70 jaar⁽⁴⁾.

Bij het vaststellen van een hoog risico op het Lynch syndroom op basis van de tumor markers, zal de behandelde specialist geadviseerd worden de patiënt door te verwijzen naar de afdeling Klinische genetica voor counseling, DNA-onderzoek en eventueel familieonderzoek.

Het Lynch syndroom ontstaat door Knudson's "2 hit hypothese". Er wordt een kiembaanmutatie van een MMR gen geërfd van vader of moeder, first hit. En door een mutatie, 'second hit', in het normale allel leidt dit tot verlies van functie van het resterende allel wat leidt tot genetische instabiliteit met een sterk verhoogde kans op het ontstaan van kanker^(1,3,4,5).

De meest bekende aangetaste genen zijn MLH1, MSH2 en PMS2 en zij hebben een voorspellende waarde tot ontwikkeling van MSI.

In tegenstelling tot kankercellen die een mutatie hebben in het MSH6 gen, want deze behouden nog een kleine mismatch herstel functie, vanwege de mogelijkheid voor MSH2 om ook te binden aan MSH3⁽²²⁾.

Voor onderzoek naar erfelijkheid is DNA nodig.

Alle kernhoudende cellen in het menselijk lichaam bevatten chromosomen. Deze chromosomen bestaan uit lineaire DNA moleculen met lengtes van wel miljoenen nucleotiden lang.

Er zijn 4 verschillende nucleotiden, adenine (A), cytosine (C), guanine (G) en thymidine (T). Adenine bindt met thymidine en guanine bindt met cytosine. Zo ontstaat er een dubbelstrengs molecule waarvan de lengte wordt weergegeven in basenparen.

De volgorde van de 4 basen zijn specifiek voor een eiwit wat gemaakt kan worden.

Bij een verandering in deze volgorde, genaamd mutatie, wordt er niet het juiste eiwit afgelezen_(6,13).

Als dit gebeurt in de tumor supressor gen dan verdwijnt de remming in celdeling en ontstaan tumoren.

In een normale cel wordt de celdeling en celdood gereguleerd.

Tumorcellen onttrekken zich aan deze regulatie, doordat ze mutaties hebben in het DNA₍₅₎.

Voor het onderzoek is een grote hoeveelheid DNA nodig.

DNA wat geïsoleerd is kan worden vermenigvuldigd tot een grotere hoeveelheid met Polymerase Chain Reaction (PCR) zoals te zien is in figuur 1.

Er bestaan verschillende soorten PCR, in dit onderzoek is gebruik gemaakt van een controle PCR met PAP primers, een multiplex PCR en een methylatiespecifieke PCR voor aantoning van hypermethylatie van de MLH1 promotor.

De PCR producten kunnen worden gecontroleerd op kwaliteit en kwantiteit met behulp van een agarose gel. De dikte van het bandje en de hoeveelheid belichting die nodig is tot het zichtbaar maken van het bandje zeggen iets over de kwantiteit en kwaliteit van het geamplificeerd DNA.

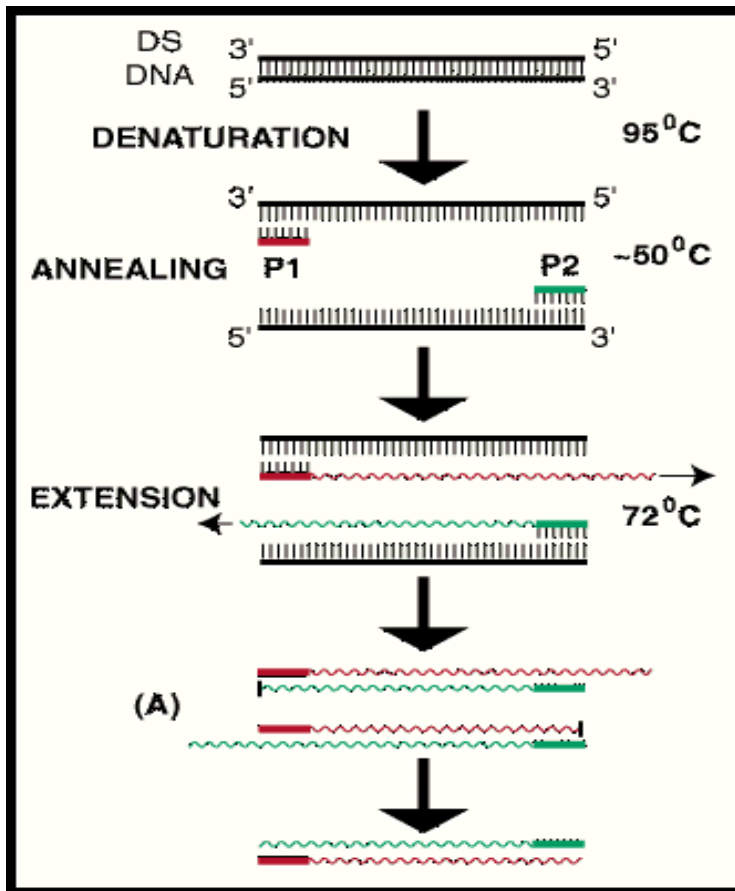


Fig.1 Deze figuur geeft systematisch weer hoe Polymerase Chain Reaction (PCR) werkt. PCR is een snelle manier om grote hoeveelheden van specifiek stukjes DNA te verkrijgen. Met behulp van een thermoblok wordt het DNA gedenuatureerd bij 95°C .

De primers hechten aan het enkelstrengs DNA bij een temperatuur van ongeveer 55°C en bij 72°C wordt het DNA door het polymerase enzym verlengd en tevens weer dubbelstrengs gemaakt. Na een cyclus heb je twee maal zoveel DNA en de cyclus kan herhaald worden tot het gewenste hoeveelheid DNA is gemaakt.

Voor het verkrijgen van patiënten materiaal worden de patiënt gegevens en weefselblokjes opgevraagd bij Pathan. Stichting Pathan staat voor Stichting Laboratorium Pathologie en Cytologie en verzorgt het pathologisch onderzoek voor vijf ziekenhuizen in Rotterdam. Als de gegevens binnenkomen worden ze bij het secretariaat ingevoerd in het ziekenhuis systeem genaamd Sympathy waarbij ze een eigen PA nummer krijgen wat bestaat uit de laatste twee cijfers van het desbetreffende jaar en een volgnummer. De patiëntgegevens en het bijbehorende blokje(s) wordt afgeleverd op het laboratorium 'Moleculaire Diagnostiek'. Hier worden de gegevens weer overgenomen in een eigen database aangemaakt voor het onderzoek. Elke nieuwe patiënt krijgt zijn eigen studie nummer, een MH-nummer. Deze begint ook met laatste 2 cijfers van het desbetreffende jaar en een volgnummer. Nu kan het materiaal, in vorm van een paraffine blokje met weefsel, gebruikt worden voor onderzoek.

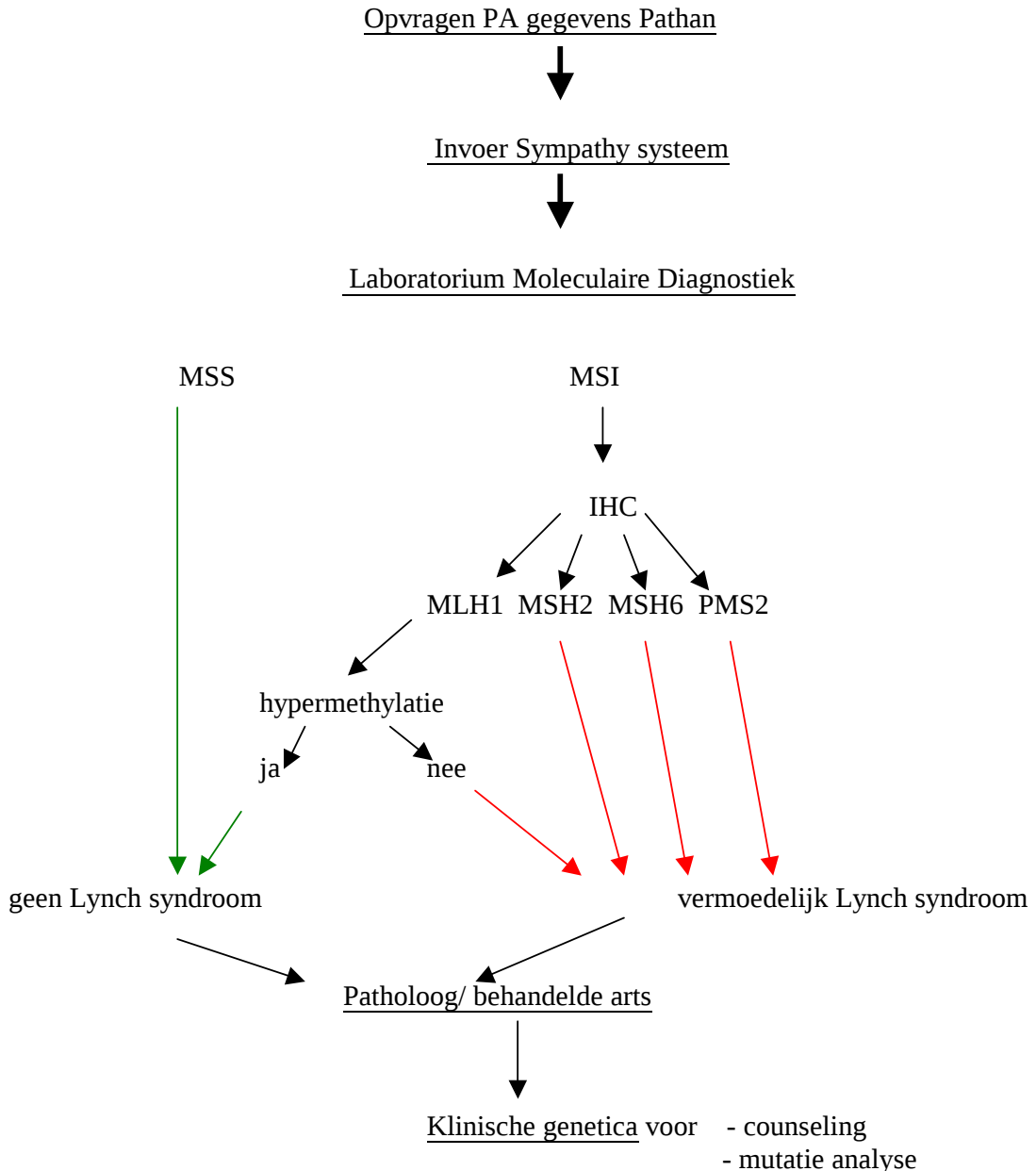


Fig. 2 Bij het onderzoek wordt eerst naar MSI gekeken en daarna naar de IHC van de 4 MMR genen.

Is er MSI en een de 4 MMR genen toont geen expressie, of de promotor van MLH1 MMR gen is niet gemethyleerd, dan is de patiënt verdacht op het hebben van Lynch syndroom en wordt het door verwezen naar Klinische genetica voor verdere mutatie analyse en bijbehorende counseling. Bij MSS of de promotor van MLH1 MMR gen is gemethyleerd dan is de patiënt niet verdacht op Lynch syndroom. De patholoog of behandelde arts van de patiënt wordt altijd op de hoogte gesteld van de uitslagen van het onderzoek.

1.2 Microsatellietten

De voorspellende waarde van DNAmarkers wordt geëvalueerd, met name instabiliteit van microsatellietten (MSI).

Microsatellietten zijn korte, repeterende DNA sequenties van twee tot vier nucleotiden, die erg gevoelig zijn voor het optreden van mutaties, die leiden tot een afwijkende lengte van het DNA_(1,3,4,5) zoals te zien is in figuur 3.

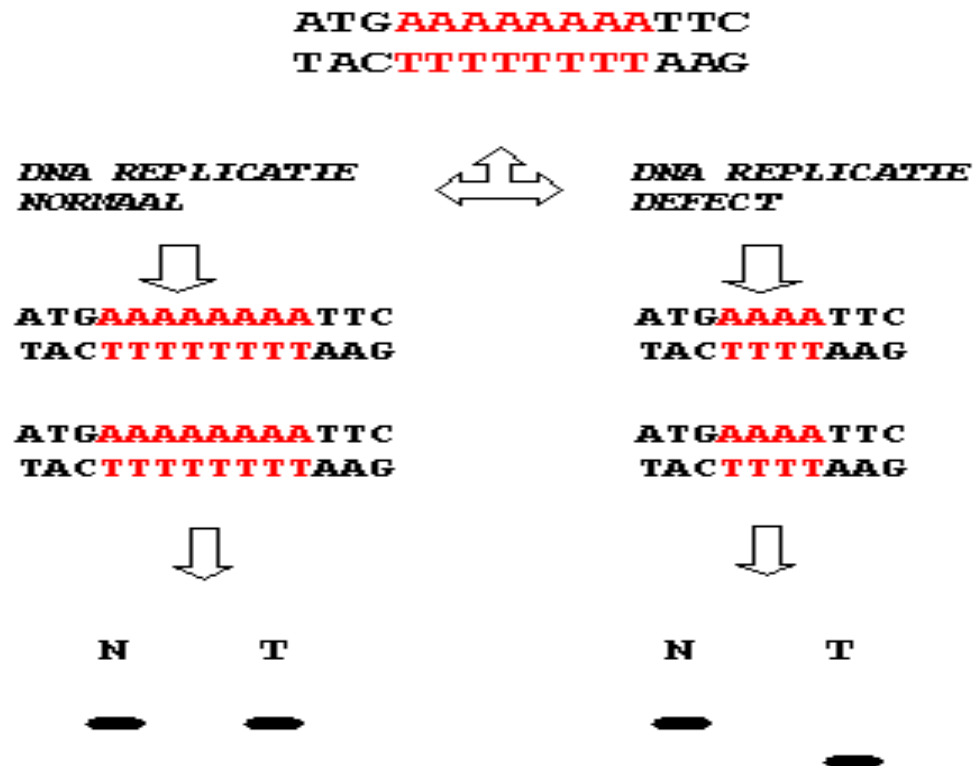


Fig.3 Microsatellietten instabiliteit wordt gedefinieerd als 'een verandering in lengte door of insertie of deletie mutatie van herhalende delen in een microsatelliet'₍₂₂₎.

MSI wordt veroorzaakt door polymerase loslating tijdens replicatie. Als deze fouten niet hersteld worden dan blijven ze aanwezig tijdens vele replicaties en veroorzaken toename of deletie van een of meer nucleotiden₍₁₇₎.

Vooral AC dinucleotide herhalingen lijken een hogere instabiliteit te hebben dan andere microsatellietten₍₁₁₎. Ook al schijnen deze repeterende DNA sequenties geen echt belang te hebben in het organisme, ze komen voornamelijk voor in het niet-coderende gedeelte van een chromosoom, het feit dat veranderingen in deze sequenties ziekten kunnen veroorzaken laat blijken dat ze toch een soort functie hebben₍₁₂₎.

Het is bekend dat colorectaal kanker kan ontstaan door verschillende moleculaire wegen. De klassieke weg is gekarakteriseerd door chromosomale instabiliteit en een van de alternatieve wegen is gekenmerkt door mismatch herstel disfunctie, wat leidt tot colorectaal kanker gekarakteriseerd door microsatelliet instabiliteit. Een duidelijke MSI is een kenmerk van het Lynch syndroom afkomstige colorectaal kankers₍₂₂₎.

MSI kan verdeeld worden in twee types, A en B. Type A veranderingen worden gedefinieerd bij een lengte verandering van ≤ 6 basenparen (bp). Type B veranderingen zijn meer drastisch en houden in veranderingen in lengtes van ≥ 8 bp.

Bij Lynch syndroom wordt voornamelijk type B gezien₍₁₇₎.

Meerdere studies hebben aangetoond dat bij Lynch syndroom in endometriumcarcinoom er een MSI type A wordt gezien wat gepaard gaat met een mutatie in het MSH6 gen₍₁₈₎.

MSI wordt bepaald met behulp van een multiplex PCR.

Het geïsoleerde DNA wordt vermenigvuldigd met een MSI Analysis System kit. Met deze multiplex PCR wordt met behulp van 7 met fluorescentie gelabelde primerparen een aantal microsatellieten onderzocht (NR-21, Bat-26, Bat-25, NR-24, MONO-27, Penta-C en Penta-D)_(1,2). De primers binden ieder op een bepaalde plaats op de chromosoom, de zogenaamde 'hotspots' voor MSI. De mononucleotiden zijn quasi monomorf wat er voor zorgt dat ze zeer gevoelig zijn voor MSI, maar wel allemaal op dezelfde plaats op het chromosoom voorkomen bij elke individu, hierdoor is het mogelijk om met één positieve controle alle patiënten hiermee te vergelijken.

Met de ABI 3130 genetic analyzer worden de producten, verkregen met de multiplex PCR, op grootte gescheiden met behulp van capillaire electroforese en wordt de fluorescentie gemeten wat afkomstig is van de verschillende markers. Er kunnen met de ABI 5 verschillende fluorescente stoffen onderscheiden worden.

De uitslag kan geïnterpreteerd worden door een programma zoals bijvoorbeeld Genemarker. Elke piek komt overeen met een geamplificeerd DNA fragment waar de primer aan heeft gebonden.

De stotter producten voor en na de hoge pieken zijn PCR artefacten die gegenereerd zijn door polymerase haperingen gedurende de amplificatie van korte repeterende sequenties.

Die verschillen van lengte met de normale lengte van het allel met een of meer zich herhalende units₍₂₎.

De pieken van normaal weefsel worden vergeleken met die van tumor weefsel. Een verschuiving van meer dan 3 pieken en dus basenparen wordt MSI genoemd, verschuiving van minder dan 3 pieken wordt beschouwd als natuurlijke lage level van polymorfisme in de marker₍₂₎.

Bij geen verschuiving is het microsatelliet stabiel_(1,9).

De markers Penta-C en Penta-D zijn uniek per patiënt en worden meegenomen als controle op verwisseling van het weefsel materiaal en om te zien of het allel homo- of heterozygoot voorkomt.

Een blanco controle wordt meegenomen om te controleren op contaminatie van de PCR reactie.

De positieve controle K562 uit de kit heeft een bekend pieken patroon en wordt meegenomen als normaal weefsel, hiermee worden de monsters vergeleken. MSI is een fenotypische indicator van defecte DNA MMR genen en is detecteerbaar in 90% van de tumoren van alle Lynch syndroom patiënten, maar ook in een lagere percentage (10-15%) van sporadische tumoren_(1,7,9,11).

1.3 Mismatch repair genen

Naast MSI bepaling wordt er ook Immunohistochemisch (IHC) onderzoek gedaan naar expressie van MLH1, MSH2, MSH6 en PMS2. Deze zogeheten "mismatch repair genen" (MMR genen) coderen voor eiwitten die betrokken zijn bij het herstel van DNA fouten die optreden tijdens DNA replicatie_(1,2,3,4). Vooral microsatellieten zijn gevoelig voor dit soort fouten. Van de zeven humane DNA MMR genen die zijn geïdentificeerd, zijn kiembaanmutatie aangetoond in maar vier van deze (MLH1, MSH2, MSH6 en PMS2)₍₉₎.

Het Lynch syndroom wordt veroorzaakt door kiembaanmutatie in de mismatch DNA repair genen MLH1, MSH2, MSH6 of PMS2.

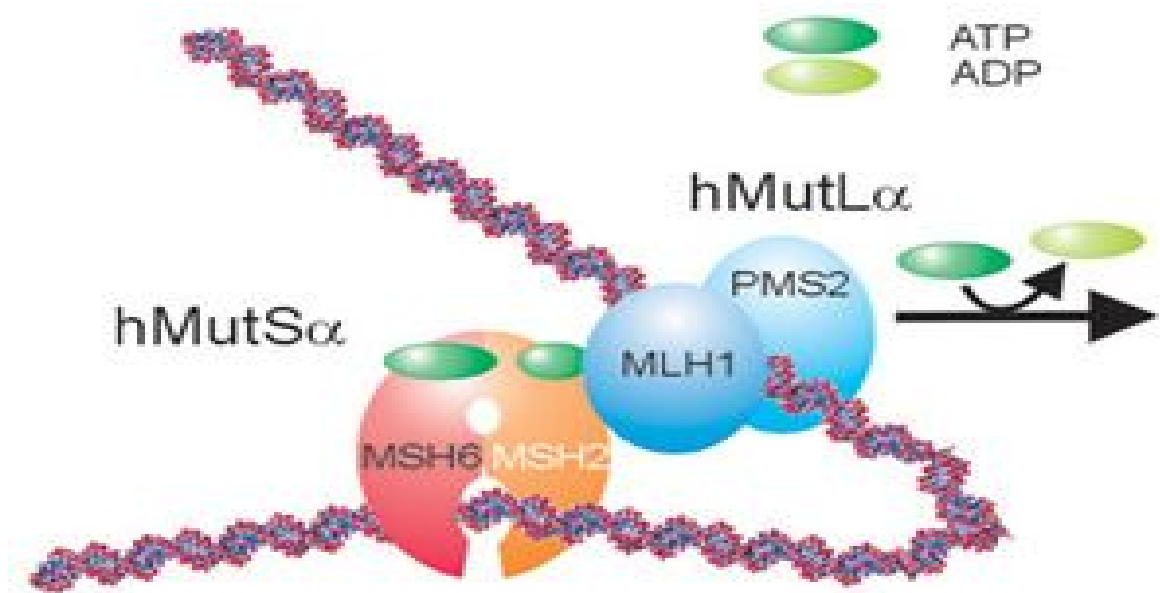


Fig.5 werking van 4 mismatch repair genen.

De MMR genen MSH2 en MSH6 vormen een heterodimeer genaamd MutS α , MLH1 en PMS2 vormen ook een heterodimeer genaamd MutL α . Deze 2 heterodimeren zijn afgeleid van de homodimerische MutS en MutL ontdekt in de bacterie E.coli.

De rol van het MutS eiwit is het detecteren van mismatch op het DNA. Het MutL eiwit repareert, na binding met MutS, het gemuteerde streng. Herstel is compleet door DNA hersynthese over het ontstane gat. Dus het eiwit complex van MutS en MutL starten en beheersen de mismatch herstel reactie₍₁₆₎, een samenvattend plaatje is te zien in figuur 5.

MSH2 ligt op chromosoom 2p16, MLH1 ligt op chromosoom 3p21, MSH6 ligt op 2p15 en PMS2 ligt op chromosoom 7p22₍₂₃₎.

70% van alle Lynch Syndroom patiënten hebben een kiembaanmutatie van het MLH1 of MSH2 MMR gen, klassieke syndroom. Slechts 5 tot 10% van Lynch syndroom families dragen een kiembaanmutatie in het MSH6 MMR gen, atypische syndroom, en zelden in PMS2_(21,23).

Het moleculaire mechanisme van de MMR disfunctie is verschillend in erfelijk en sporadische colorectaal kanker. Een positieve MSI test in familiair of op jonge leeftijd ontstane colorectaal kanker is hoog geassocieerd met Lynch Syndroom₍₁₉₎.

1.4 Immunohistochemie

Van het formaline fixed paraffine embedded (FFPE) weefsel blokje worden ongekleurde coupes gesneden en een laatste HE kleuring gedaan. Deze kleuring heet 'laatste' omdat het een kleuring is van de laatste coupe van het lintje.

Het aanwezige weefsel in deze coupe is meestal ook aanwezig in de coupes voorafgaand. De andere coupes worden gebruikt voor de immunohistochemie, met de Dako Chemmate envision detection kit.

Peroxidase/DAB rabbit/mouse is een tweestaps immunokleuring waarbij de incubatie met een specifiek primair antilichaam opgevolgd wordt door een incubatie met een geconjugeerd, gekoppeld aan horse radisch peroxidase (HRP), polymeer.

Dit detectiesysteem bestaat uit een dextraan backbone waaraan een groot aantal enzym moleculen van HRP en een groot aantal secundaire antilichamen zijn gekoppeld.

Het formaline gefixeerd materiaal kan epitopen bevatten die door crosslinking worden gemaskeerd waardoor ze onbereikbaar zijn voor het primaire antilichaam.

Door een voorbehandeling met enzymen of koken in een speciale buffer kan de crosslinking worden doorbroken, waardoor het epitoom voor het primaire antilichaam wel bereikbaar wordt.

Het zichtbaar maken van de binding gebeurt met een substraat systeem dat bestaat uit diaminebenzidine (DAB) chromogeenoplossing en een substraat buffer dat waterstofperoxide bevat. Het substraat systeem geeft een bruin neerslag op de plaats waar het specifieke antilichaam aan het epitoom is gebonden. Een verkort overzicht is te zien in figuur 6.

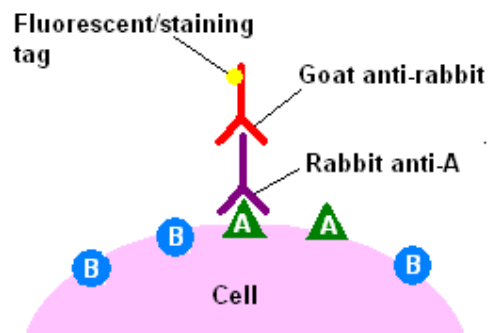


Fig 6. Het figuur laat de tweestaps kleurings methode zien met gebruik van een gelabeld antilichaam wat bindt aan een ander antilichaam.

4 coupes worden elk apart gekleurd voor MLH1, MSH2, MSH6 en PMS2 door middel van antilichamen gericht tegen deze verschillende specifieke MMR-genen⁽³⁾.

Bij expressie van deze eiwitten wordt er een bruinachtige kleur gevormd in de celkern^(3,4,5).

IHC is minder gevoelig voor het detecteren van een defect in de MMR genen, maar in combinatie met MSI kan een defect betrouwbaar worden

opgespoord^(1,2,4).

De beoordeling van de immunokleuringen kunnen verschillen per persoon.

Over het algemeen wordt aangenomen dat elke kernkleuring van de tumorcellen duidt op normale expressie van het gen, waar verlies van expressie alleen is wanneer de kernkleuring afwezig is in de tumorcellen⁽²⁰⁾.

Soms is de kleuring wel aanwezig, wat duidt op expressie, maar kan dan wel verlies van functie aanwezig zijn.

Het is ook minder betrouwbaar omdat er geen (inter)nationale gestandaardiseerde methode (ISO) is voor de fixatie en kleuring⁽²⁰⁾.

Als de ABI MSI laat zien wordt er verwacht dat bij IHC een van de eiwitten niet meer tot expressie komt. Er vindt aankleuring in het betreffende tumorweefsel voor een van de eiwitten niet plaats en is de kleuring in vergelijking met normale cellen dus afwezig⁽³⁾.

Bij het grootste deel van Lynch syndroom patiënten zijn er mutaties gevonden in MLH1 of MSH2 en minder vaak in de andere genen^(8,9,11). Meerdere studies hebben aangetoond dat er een hoog risico is voor endometrium kanker bij een mutatie in het MSH6 gen⁽¹⁸⁾.

	IHC MLH1	IHC MSH2	IHC MSH6	IHC PMS2
MLH1 mutatie	negatief	positief	positief	negatief
MSH2 mutatie	positief	negatief	negatief	positief
MSH6 mutatie	positief	positief	negatief	positief
PMS2 mutatie	positief	positief	positief	negatief

Fig. 7 In dit figuur is te zien bij welke mutatie wat voor soort IHC wordt verwacht. MLH1 is zelden alleen negatief, bijna altijd is dan tevens PMS2 negatief. Hetzelfde geldt voor MSH2 die is samen met MSH6 negatief. Daar tegenover is dat PMS2 wel alleen negatief voor kan komen net als MSH6.

1.5 Hypermethylatie

In cellen van zoogdieren vindt DNA methylatie plaats op de base cytosine in CpG eilanden.

Deze CpG eilanden zijn over het algemeen niet gemethyleerd.

Wanneer ze wel gemethyleerd zijn zorgt dat voor het stilleggen van gen expressie.

Er is een toename van rapporten over promotor methylatie in humane kankers₍₈₎.

MSI in colorectaal kanker wordt geassocieerd met promotor methylatie in de CpG eilanden van het MLH1 MMR gen.

MSI in sporadische CRC wordt vrijwel altijd veroorzaakt door een functionele afwezigheid van het mismatchrepair eiwit MLH1 als gevolg van hypermethylering van de MLH1 gen promotor.

Dit fenomeen staat bekend als MLH1 hypermethylering.

Met het bepalen van de MLH1 hypermethylering kan er dus onderscheid gemaakt worden tussen sporadische en Lynch syndroom -tumoren_(1,4,8,11).

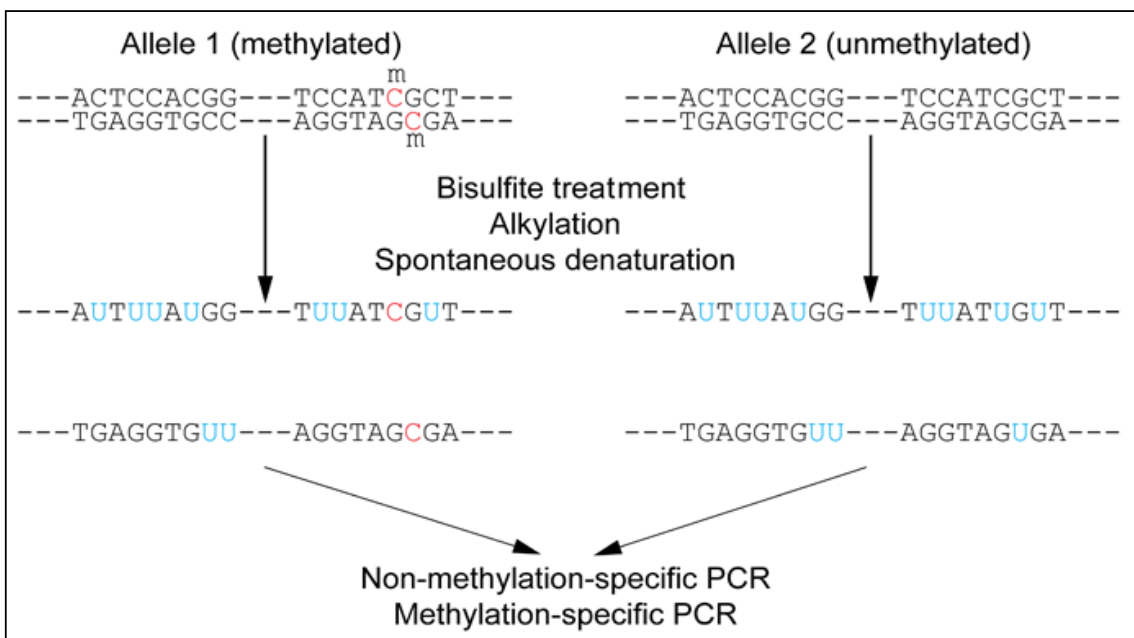


Fig.8 In de figuur is te zien hoe de bisulfiet behandeling te werk gaat. De gemethyleerde cytosines worden niet omgezet tot Uracils en de ongemethyleerd cytosines wel.

Het tumor weefsel verdacht voor MSI, wordt gemodificeerd met behulp van EZ DNA Methylation kit. Met deze kit worden cytosines omgezet in uracils, dit DNA kan vervolgens gebruikt worden voor aantoning van eventuele methylatie van het MLH1-gen op de ABI 3130 genetic analyzer systeem.

Het DNA wordt behandeld met CT-conversion reagens dat bij een bepaalde temperatuur en pH de cytosines met behulp van natriumbisulfiet sulfoneert. De gesulfoneerde oplossing wordt vervolgens geneutraliseerd met M-binding buffer, zodat het DNA kan binden aan de kolom.

Door behandeling van het DNA met M-DeSulphonation buffer worden de cytosines met de gesulfoneerde groep geconverteerd in uracils, dat in PCR reactie de eigenschap van thymidine heeft.

De methylgroep in gemethyleerd cytosine beschermt de cytosine tegen sulfoneren, zie figuur 8.

Hierdoor worden gemethyleerde cytosines veel langzamer gesulfoneerd.

De snelheid van reactie verschilt per monster.

Om inzicht te krijgen in de kinetiek van een monster worden twee incubatietijden gehanteerd in de sulfoneringsstap.

Het behandelde DNA wordt geïncubeerd bij 3 uur en een bij 6 uur, om er zeker van te zijn dat alle cytosines zijn omgezet tot uracils. Daarna wordt het DNA geamplificeerd met een niet-methylatiespecifieke PCR en geanalyseerd op de ABI.

De verhouding van de hoogte van de piek van het gemethyleerd DNA en de som van de hoogtes van beide pieken samen geeft het percentage van methylatie weer en wordt gecorrigeerd met het percentage tumorweefsel wat aanwezig is in het weefsel waar het DNA afkomstig van is.

2 Materiaal en methode:

2.1 coupes prepareren

In het histologie laboratorium worden de paraffine blokjes op een koelplaat gelegd van 4°C, met het weefsel naar beneden.

Hierdoor wordt de paraffine weefsel harder en daardoor makkelijker te snijden.

Na een paar minuten koelen is de paraffine hard genoeg om te snijden.

Eventueel worden er randen weggesneden van het blokje waarin geen weefsel zit, zodat er minder paraffine in de gesneden coupe zit.

Het Microtoom wordt aangezet en gecontroleerd of de draaihendel op slot zit.

Het snijblok moet op 10 graden staan.

Meest gebruikte instellingen zijn coupes van 4µm en 10 omwentelingen per draai.

Vervolgens wordt het gekoelde blokje in de houder gezet.

Een schoon mesje wordt uit een verzameldoosje geschoven en in het snijblok gezet, zorg dat het mes goed vast zit.

Het mesje kan eventueel worden afgeschermd door een klepje om te voorkomen dat bij het gebruik van het apparaat in de vingers gesneden kan worden.

Nu kan de hendel van slot af en kan het blokje langzaam naar het snijblok gestuurd worden. Dit kan met grote stappen (knop met grote pijl) of met kleine stappen (knop met 2 kleine pijltjes) totdat er weefsel van het blokje af komt.

De eerste paar coupes die eraf komen bevatten meer paraffine dan weefsel en worden niet gebruikt.

Bij duidelijk zien van weefsel in coupe wordt er langzaam gedraaid en een lintje gemaakt.

Om te voorkomen dat de paraffine coupes opkrullen wordt er zachtjes warme lucht geblazen op het mesje waar het lintje vanaf komt.

Lintjes van circa 10 coupes worden op een apart plank gelegd met een zwarte ondergrond.

Door deze zwarte ondergrond zijn de coupes goed te zien. Een of twee lintjes is genoeg.

Onthou welke coupe er het laatste vanaf gekomen is en gebruik die voor de Laatste HE kleuring.

Na gebruik wordt eerst de hendel weer op slot gezet, klepje over het mesje en blokhouder naar achteren gebracht en dan pas blokje uit houder halen en bij de bijbehorende lintjes leggen.

Nu kan het mesje eruit gehaald worden en vervangen worden door een nieuw en schoon mesje en van het volgende blokje kan weer een lintje worden gesneden.

Van het gesneden lintje worden coupes op glaasjes gelegd om vervolgens te kleuren met HE of immunohistochemie.

Leg 9 schone objectglaasjes klaar met daarop het pathologienummer en de gewilde kleuring met potlood geschreven.

Er wordt een glaasje gemaakt voor de HE kleuring en 8 blanco, coupes zonder kleuring die gebruikt kunnen worden voor de immunohistochemie.

Voor de HE kleuring wordt op het glaasje een hoeveelheid eiwitwater gedaan waarop de laatste coupe van het lintje wordt gelegd.

De andere acht glaasjes worden bedekt met gedestilleerd water en daarop worden de coupes gelegd genomen vanaf de laatste coupe.

Alle glaasjes worden op een plaat gelegd van 41°C zodat het water uitzet en de coupes mooi strak worden getrokken.

Na enkele seconden zijn de coupes mooi uitgestrekt en kan het overtollige water er onderuit worden gehaald door het glaasje met de korte zijde op een (hand)doek te leggen.

Als de coupes gedroogd zijn aan de lucht wordt het glaasje voor de HE in het kleurapparaat gezet. Zodra het bakje vol is worden deze automatisch gekleurd. De andere 8 blanco glaasjes worden samen met de coupe op een schone plank gelegd voor later onderzoek.

2.2 DNA isolatie

De coupe die gekleurd is met HE wordt gebruikt om te kijken waar de tumorcellen zich bevinden.

Onder een microscoop met de kleinste vergroting wordt de HE gekleurde coupe bekeken.

Spier en stroma zijn rood (eosine) gekleurd en celkernen zijn paars gekleurd. Vetcellen worden niet aangekleurd en daar wordt alleen de celwand van gezien. Tumorcellen hebben vergrote celkernen en meestal meer paarsgekleurde gebieden. Normale cellen zijn lichter gekleurd.

Op de coupe wordt aangegeven met 'A' waar normaal weefsel zich bevindt en met 'B' waar zich tumor weefsel bevindt.

De coupe kan dan op het blokje worden gelegd en zo kan het gebied bepaald worden waar gestanst moet worden.

Er worden 2 eppendorf cupjes voorgescreven met studienummer en of het om normaal (A) of tumor (B) weefsel gaat.

Met een stans worden er stukjes weefsels uit het blokje gehaald en in bijhorende cupjes gedaan.

Van tumorweefsel wordt direct DNA geïsoleerd, normaal weefsel wordt bewaard tot eventueel later onderzoek naar hypermethylering of bij een twijfel geval.

Bij het tumorweefsel wordt 300µl Xyleen toegevoegd en 5 minuten geschud op een schudapparaat. Xyleen wordt gebruikt om de paraffine op te laten lossen.

Toevoegen en pipetteren van vloeistoffen gebeurt in een zuurkast voor de veiligheid van eventuele schadelijk dampen.

Na 5 minuten op het schudapparaat wordt het cupje gecentrifugeerd bij 14000 toeren voor 3 minuten.

Deze stap wordt 3 keer gedaan. Tussendoor elke keer met een schoon puntje het supernatant afpipetteren en nieuwe toevoegen.

Na de laatste xyleen stap de pellet zo droog mogelijk maken, opletten dat er geen weefsel wordt weggezogen.

Nu wordt 2 keer een wasstap gedaan maar in plaats van xyleen wordt er 96% ethanol toegevoegd.

Na de 2^e en laatste wasstap de pellet goed droog maken door eventueel enkele minuten te laten drogen aan de lucht.

Na drogen wordt er 180µl lysisbuffer toegevoegd en 20µl Proteïnase K.

Proteïnase K zorgt voor het denatureren van eiwitten zodat de celwand denatureert en het DNA vrijkomt.
De lysis buffer zorgt er voor dat na de behandeling het DNA niet verder denatureert en langer bruikbaar is.

Goed mengen en plaatsen in een waterbad van 56°C voor minimaal 4 uur, overnacht mag.

Proteïnase K activiteit kan gestopt worden door te koken bij 100°C voor 10 minuten. Het DNA wordt gescheiden van de celresten door te centrifugeren bij 14000 toeren voor 2 minuten. Het supernatant met daarin het DNA kan bij 4°C bewaard worden tot gebruik.

2.3 PCR

Bij -20°C liggen de reagentia voor PCR.

Taq is een enzym wat op ijs bewaard moet worden tot gebruik, de rest mag bij kamertemperatuur ontdooid worden.

De mix wordt gemaakt in een aparte ruimte, het prePCR-lab, waar zich geen DNA of PCR apparaat bevindt. Alle bestandsdelen goed mengen voor gebruik, met behulp van een vortex.

Voor een PAP-PCR wordt voor elk monster een mix gemaakt van 50µl bestaande uit 28µl gesteriliseerd water, 10µl 5X Go Taq flexi buffer, 3µl 25mM MgCl₂, 1µl 10mM dNTP mix, 2µl (0,07µg/µl) forward primer en 2µl (0,05µg/µl) reverse primer en als laatste 3µl (1U/µl) Go Taq polymerase.

Er is ongeveer 15µl mix per monster nodig. Om te bepalen hoeveel er gemaakt moet worden van de mix, wordt het aantal monsters (+ een positieve controle en een negatieve controle) vermenigvuldigd met 15 en dan gedeeld door 50.

Het getal wat je dan krijgt, zoveel mix van 50µl moet er gemaakt worden.

De gemaakte mix goed mengen op een vortex en per monster een cupje vullen met 14µl mix.

Houd alles tot gebruik op ijs.

In een volgende aparte ruimte, het DNA-lab, waar geen PCR apparaat staat wordt er 1µl DNA van elk monster bij de mix toegevoegd in het cupje.

Zorg dat het DNA goed gemengd is voor pipetteren door onder tegen de cup aan te tikken, niet vortexen.

Dek de strip met mix en DNA goed af voor naar het PCR apparaat wordt gebracht.

Het PCR apparaat staat in een aparte ruimte waar alle PCR apparaten staan en de camera voor de gel. Het gewenste programma heeft een cyclus van 95°C voor 30 sec, dan 55°C voor 45 sec en als laatste 72°C voor 45 seconden.

Deze cyclus wordt 34 keer herhaald, zodat uiteindelijk 35 cycli gerund wordt. Op het einde wordt nog voor 10 minuten lang bij 72°C geïncubeerd om te zorgen dat alle DNA fragmenten weer dubbelstrengs zijn.

De verkregen PCR producten worden gecontroleerd op kwaliteit en kwantiteit door een gel-electroforese.

Een 1% gel wordt gemaakt door 1 gram agarose op te lossen in 100 ml 0,5X TBE buffer door ongeveer 3 minuten in een magnetron op maximaal vermogen te koken.

Na het oplossen van de agarose, de vloeistof zodanig afkoelen dat het nog vloeibaar is maar in de hand te houden is, dit komt overeen met circa 45°C. Voor het gieten van de gel moet er nog 3µl (10mg/ml) ethidiumbromide toegevoegd en goed gemengd worden.

Een gelbak wordt afgeplakt met tape en er worden kammetjes van gewenste hoeveelheid slotjes geplaatst, meestal 20 slotjes.

De opgeloste agar met ethidiumbromide wordt volledig in de bak gegoten en laat het met de slotjes erin stollen, verwijder eventuele luchtballen met een steriel pipetpuntje.

Na het stollen kan de tape verwijderd worden en de bak met gel in de grote elektroforese bak geplaatst worden.

Deze bak is gevuld met ook 0,5X TBE buffer en ethidiumbromide, zelfde verhouding als bij de gel, 3µl (10mg/ml) ethidiumbromide op 100ml buffer.

DNA is negatief geladen en zal zich bewegen naar de positieve zijde.

Om de DNA producten in de slotjes te laten blijven zitten worden deze verzaamd met van 5µl 5X loading buffer.

Deze buffer is oranje gekleurd zodat er gezien kan worden welk slotje gebruikt is en hoever het DNA gelopen heeft op de gel.

Om te bepalen of het DNA van de juiste grote is wordt er naast de monsters nog een 1Kb ladder meegenomen met bekende grote van bandjes.

Zorg dat de bak zo wordt aangesloten dat de negatieve pool aan de slotjes kant is en de positieve lading aan de andere kant van de gel.

Het beste is laten lopen bij 60mA voor 30 minuten.

Na 30 minuten wordt de bak losgekoppeld en de gel eruit gehaald.

Met een gel-camera kan er UV-licht op de gel geschijnen worden waardoor de bandjes zichtbaar worden.

Met verschillende lichtsterkte kunnen de bandjes zichtbaar gemaakt worden.

Hoe minder licht er nodig is om zichtbaar te worden hoe meer DNA product aanwezig is en als er strakke bandjes zijn in plaats van smeer dan is het verkregen DNA product zeer zuiver.

2.4 Multiplex PCR

Het geïsoleerde DNA wordt gebruikt voor de multiplex-PCR.

Dit is een PCR met 7 verschillende primerparen erin, voor elke marker een paar.

De ABI 3130 is een zeer gevoelig apparaat en er is maar 2ng DNA nodig als input voor de multiplex PCR. Hoe minder belichting nodig is bij het oplichten van de gel van de PCR, hoe meer DNA er aanwezig is.

Het beste is om dan 10 of 20 keer het DNA te verdunnen voordat het gebruikt wordt voor de multiplex PCR.

Voor de multiplex PCR is er een kit aanwezig in -20°C vriezer van Promega versie 1.2.

In deze kit zitten alle benodigdheden voor de PCR en ABI mix en tevens een positieve controle waarvan bekend is hoe groot de pieken zijn van de markers. Per monster moet er in een cupje 5,85µl gedestilleerd water, 1µl 10X GoldStar buffer, 1µl 10X MSI primerpair mix en 0,15µl (5U/µl) AmpliTaq gold polymerase gedaan worden.

In een 96 wells plaat worden de hoeveelheid cupjes uitgevuld met 8µl mix en 2µl (verdunde) DNA.

De 96 wells plaat wordt afgedekt met een rubberen nopjes matje tegen uitdroging en zodat het later weer makkelijk losgemaakt kan worden.

Het PCR programma is zo ingesteld dat er eerst een Hot start plaatsvindt van 11 minuten bij 95°C en dan nog 1 minuut bij 96°C.

Dit is nodig om de AmpliTaq te activeren.

Vervolgens begint de eerste cyclus van 94°C voor 30 seconden dan met een vertraging van 0,53°C/seconden naar 58°C wat dan blijft voor 30 seconden.

Daarna weer met vertraging van 0,24°C/seconden naar 70°C waar het blijft voor 1 minuut.

Deze cyclus wordt 9 keer herhaald, totaal van 10 cycli.

Vervolgens is er nog een cyclus met 30 seconden bij 90°C en dan met een vertraging van 0,53°C/seconden naar 58°C waar het blijft voor 30 seconden en dan met een vertraging weer naar 70°C gaat en daar blijft voor 1 minuut.

Deze cyclus wordt 19 keer herhaald, met een totaal van 20 cycli. Als laatste wordt er nog 30 minuten geïncubeerd bij 60°C en de plaat bij 4°C bewaard tot verdere gebruik.

2.5 ABI

Nu moet de ABI 3130 worden ingesteld door in te loggen in het systeem op de computer en het programma 'Data collection V3.0' te openen.

Onder 'plate manager' kan er een nieuwe plaat gemaakt worden. Geef aan in welk welletje welk monster wordt gedaan en eindig met positieve controle en blanco.

Helemaal rechts van het scherm kan worden aangegeven waar de uitslag bewaard moet worden op de PC.

Als laatste moet dan nog worden aangegeven met welk calibratieset gerund moet worden. In dit geval is dat met dyeset F.

Nu kan de plaat gevuld worden.

Dit is een andere plaat dan voor de PCR, deze plaat heeft wat diepere welletjes en een opstaande rand.

Er wordt eerst een mix gemaakt van Hi-Di Formamide en ILS600.

Dit laatste is een interne size standard waarmee de lengte van de PCR producten bepaald kan worden.

Per monster wordt 1µl ILS600 en 10µl Hi-Di Formamide gemixt waarvan dan 10µl in de plaat gaat. Hierbij wordt dan 1µl van de multiplex PCR product toegevoegd.

Het apparaat werkt altijd per 2 kolommen van 8, dus 16 monsters.

De lege welletjes die overblijven moeten gevuld worden met 10µl Hi-Di Formamide.

De plaat wordt afgedekt met speciale grijze rubberen mat met langwerpige noppen erop.

De plaat wordt eerst 1 minuut bij 10000 toeren afgedraaid om het DNA en de mix samen onder in het cupje te laten zakken.

Daarna wordt het DNA gedenateerd bij 100°C voor 3 minuten en op ijs bewaard tot gebruik.

De plaat wordt in de ABI 3130xl gezet zodat kolom '1' bovenin is.

Op de computer wordt bij 'run viewer' de aangemaakte plaat gezocht en aangeklikt.

In het systeem kunnen 2 platen achter elkaar gerund worden, door ze naast elkaar in het apparaat te zetten.

Klik eerst de plaat naam aan en daarna de positie van de plaat waar het bij hoort, A of B. Als dat gedaan is kan er op de play knop gedrukt worden links bovenin.

Gemiddeld duurt een serie van 16 monsters 45 minuten.

2.6 Genemarker

Start Genemarker versie 1.70.

Het programma start gelijk met een scherm waarin wordt gevraagd of er data geopend moet worden of een project.

Om nieuwe data te analyseren moeten deze eerst geopend worden.

Bij open data files kunnen de files toegevoegd worden die gerund zijn op de ABI 3130.

Door 'Add...' kan er gezocht worden naar deze files op de harde schijf of op het netwerk.

Na toevoegen bevestigen door op 'OK' te klikken.

Hierna wordt gevraagd of de data gerund moeten worden en hoe. MSI monsters worden gerund met de template ABI-5-COLOR, panel is Promega_MSI, size standard is ILS600, standard color is Red en het analysis type is fragment (animal).

Door op 'next' te klikken kan er ingesteld worden op de grootte van de basenparen waarnaar gekeken wil worden, in dit geval 60 tot 200 bp. Local region wordt ingesteld op 15% van local max en het stutter peak filter op 90% links en rechts.

Nadat er weer op 'next' wordt geklikt kan de peak score worden ingesteld.

Reject onder 1 en pass onder 10, daarna kunnen de data geanalyseerd worden door op 'Ok' te klikken.

Er komt een scherm welke monsters gelukt zijn om geanalyseerd te worden en hoelang er over gedaan is.

Nu worden deze gegevens gezien als een project en kan het als een geheel worden opgeslagen op de harde schijf onder een eigen gekozen naam.

Op het scherm worden nu 2 delen gezien.

In het linker deel staan alle monsters onder elkaar op alfabetische volgorde.

Rechts staat de figuur met daarin de markers met elk een eigen kleur en de hoogste piek wordt aangegeven.

Het monster dat links als eerste wordt aangeklikt komt rechts bovenaan te staan.

Zo kan als eerste de positieve controle (K562) aangeklikt worden en vervolgens het monster dat ermee vergeleken moet worden.

De grafieken kunnen uitgeprint worden. Er kan gekozen worden om elke marker apart uit te draaien of als een mix van alle markers.

Het laatste is gewild.

Dit kan door onder printinstellingen te kiezen voor 'mix dyes' en print type 'chart overlay'.

Alleen de geselecteerde samples worden geprint.

Onder preview kan gezien worden hoe het er uit ziet op papier.

Het mooiste is om de papier instelling nog te zetten op 'landscape' zodat de grafiek er groter op staat.

Nu kan de onderste grafiek (monster) vergeleken worden met bovenste grafiek (controle) voor verschuivingen van de gekleurde pieken.

Bij meer dan 3 pieken verschuiving binnen een marker is dat MSI.

2.7 Immunokleuring

Het Dako Chemmate envision detection kit, peroxidase/DAB rabbit/mouse is bestemd voor toepassing bij immunohistochemisch onderzoek.

4 van de eerder gesneden 8 blanco coupes, zie §3.1, worden gebruikt voor de immunokleuring.

Per MMR gen één coupe.

De coupes worden een dag voor de kleuring overnacht gedroogd in een warme stoof van 37°C om er voor te zorgen dat al het vocht uit de coupe getrokken is.

Na overnachting worden de coupes gedeparafineerd in xyleen voor 15 minuten lang en 4 keer gewassen in 96% ethanol met 4% methanol.

Vervolgens wordt de endogene peroxidase geblokkeerd door het in 3% methanol en 0,1% waterstofperoxide oplossing voor 15 minuten te hangen.

Als laatste wordt de coupe gespoeld onder de kraan.

De retrieval buffer wordt voorverwarmd door een maatbeker met Tris/EDTA met pH van 9.0 in een magnetron op te warmen bij circa 100°C voor 4 minuten.

De heat induced epitooop retrieval wordt gedaan door de coupes in de voorverwarmde buffer te plaatsen en deze in de magnetron te laten koken voor een half uur lang.

Daarna de coupes afkoelen door de maatbeker in koud water te plaatsen voor 15 minuten en daarna water erin te laten lopen totdat de coupes zijn afgekoeld.

Klem de preparaten in rekken van het sequencebak en voorkom uitdroging door direct wasbuffer op te brengen.

Incubeer de preparaten met 100µl primair verdund antilichaam voor een half uur lang bij kamertemperatuur.

Voor MLH1 moet een substraatsysteem verdunning gemaakt worden van 1:100, voor MSH2 een verdunning van 1:300, voor MSH6 verdunning van 1:100 en voor PMS2 een verdunning van 1:200.

Na een half uur worden de preparaten gespoeld met wasbuffer voor 5 minuten en geïncubeerd met 3 druppels chemmate envision fles A (100 ml gebruiksklaar Dextraan gekoppeld met peroxidasemoleculen en secundaire geitenantilichaam moleculen tegen konijnen- en muizenimmunoglobulinen in een gebufferde oplossing die stabiliserend eiwit en conserveermiddel bevat) per coupe voor een half uur.

Hierna 2 keer wassen met wasbuffer voor 5 minuten en incubeer als laatste de coupes met 150 µl DAB oplossing voor 5 minuten en herhaal deze incubatie stap 1 maal.

Het laatste proces is het tegenkleuren van de immuno-histochemische preparaten door deze in afdekrekjes te plaatsen en te spoelen met stromend water voor 5 minuten.

Daarna worden de preparaten gekleurd met harris haematoxyline voor 2 minuten en blauwen met ammoniak bevattende water voor 20 seconden.

Vervolgens de preparaten goed spoelen in stromend water, 4 keer dehydreren in 96% ethanol. Ophelderen gebeurt door 2 keer in microclear en 1 keer in xyleen te spoelen.

Als laatste worden de preparaten afgedekt en resterende vloeistof afgevoerd. Onder de microscoop kunnen de preparaten bekeken worden en beoordeeld worden op wel of geen expressie van de 4 verschillende genen.

2.8 Hypermethylatie

EZ DNA methylation kit die hiervoor wordt gebruikt wordt bewaard bij kamer temperatuur. Voor de methylatie wordt het geïsoleerde DNA uit tumor gebruikt en die van, indien mogelijk, normaal weefsel.

Als controles worden meegenomen Tonsil en SW48, Tonsil is gemethyleerd en SW48 is niet gemethyleerd.

Maak van alle geïsoleerde DNA een verdunning van 500 ng in een eindvolume van 45 µl. dit kan door 10 µl DNA in 35 µl demi water op te lossen.

Alle DNA worden in tweevoud ingezet.

Voeg per verdunning nog 5 µl M-dilution buffer uit de kit toe.

Incubeer alle gemaakt verdunningen 15 minuten lang bij 37°C in hitteblok of waterbad.

Ondertussen kan de CT-conversion reagens gemaakt worden.

Één epje is voldoende voor 10 reacties.

Voeg aan een epje CT-conversion reagens 750µl demi water toe en 210µl M-dilution buffer.

Vortex deze mix voor 1 a 2 minuten op maximale stand.

De gemaakt oplossing is lichtgevoelig en moet tot gebruik in het donker bewaard worden.

Voeg na 15 minuten per reactie 100µl CT-conversion oplossing toe en meng door voorzichtig op en neer te pipetteren.

Incubeer parallel een serie van 3 uur en een tweede serie van 6 uur bij 50°C in een hitteblok of waterbad, in het donker.

Na incubatie worden de DNA oplossingen geplaatst voor 10 minuten op ijs (4°C). Voor de desulfonatie word per reactie 400µl M-binding buffer toe gevoegd en voorzichtig gemengd door op en neer te pipetteren.

Breng de gehele DNA oplossing over op een Zymo spin I kolom en zet deze kolom in een 2 ml collectievaasje.

Centrifugeer het geheel voor 15 tot 30 seconden bij het maximale toerental in een centrifuge.

Na centrifugeren kan het eluaat verwijderd worden en 200µl M-wash buffer op de kolom gebracht worden.

Centrifugeer weer het geheel voor 15 tot 30 seconden op maximale toeren.

Verwijder weer het eluaat en breng nu 200µl M-DeSulphonation buffer op de kolom en incubeer 15 minuten bij kamertemperatuur.

Na incubatie weer het geheel centrifugeren voor 15 a 30 seconden op maximale toeren.

Verwijder hierna weer het eluaat en breng nu 200µl M-wash buffer op het kolom. Centrifugeer 15 a 30 seconden bij maximale toeren en verwijder het eluaat. Herhaal deze laatste stap met M-wash buffer.

Plaats hierna de kolommen in schone nieuwe epjes en breng 7,5µl elutiebuffer op de kolom en incubeer voor 1 minuut bij kamertemperatuur.

Centrifugeer 1 minuut bij maar 8000 rpm en herhaal deze laatste stap met elutiebuffer.

Bewaar het eluaat tot gebruik bij -20°C , vergeet niet het studie nummer op het epje te noteren.

Nadat beide incubatie van 3 uur en 6 uur voorbij zijn en alle kolombehandelingen klaar zijn worden de verkregen eluaten gebruikt voor een specifieke PCR om de mate van methylatie van DNA-loci te bepalen.

Voor deze PCR wordt gebruik gemaakt van een MLH1 forward (F) primer die is gelabeld en een MLH1 reverse (R) primer die niet is gelabeld.

Per monster wordt een mix gemaakt van 10,92 μl gedestilleerd water, 1,5 μl 10X GoldStar buffer, 0,9 μl 25mM MgCl_2 , 0,6 μl van (0,112 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) met FAM-gelabelde forward primer en 0,6 μl van (0,075 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) reverse primer, 0,3 μl 10mM dNTP en als laatste 0,18 μl 5U/ μl AmpliTaq polymerase.

Er wordt een PCR gedaan met een hot start van 11 minuten bij 95°C en 45 cycli met de instellingen voor de cyclus van 94°C voor 30 sec, dan 56°C voor 30 sec en als laatste 72°C voor 30 seconden.

Vervolgens blijft het apparaat bij 72°C voor 20 minuten om alle producten weer dubbelstrengs te maken en daarna terug gekoeld tot 20°C .

Na de PCR wordt er 5 μl PCR product samen met 5 μl loading buffer op gel gebracht om te kijken of er product is ontstaan.

Het beste is laten lopen bij 60mA voor 30 minuten.

Na 30 minuten wordt de bak losgekoppeld en de gel eruit gehaald.

Met een gel-camera kan er UV-licht op de gel geschenen worden waardoor de bandjes zichtbaar worden. Met verschillende lichtsterkten kunnen de bandjes zichtbaar gemaakt worden.

Bij te sterke expressie van DNA op gel dan de rest van het PCR product eerst verdunnen voor het wordt gebruikt op de ABI 3130.

Nu kan de ABI 3130 worden ingesteld door in te loggen in het systeem op de computer.

Zie voor de instelling §3.5 ABI. Voor methylatie met Liz500 wordt de calibratieset voor LOH gebruikt met dyeset G5.

Er wordt eerst een mix gemaakt van Hi-Di Formamide en Liz500, dit laatste is een interne size standard waarmee de lengte van de PCR producten bepaald kunnen worden.

Per monster wordt 0,2 μl Liz500 en 9,8 μl Hi-Di Formamide gemixt waarvan dan 10 μl in de plaat gaat.

Hierbij wordt dan 1 μl van het PCR product toegevoegd. Het apparaat werkt altijd per 2 kolommen van 8, dus 16 monsters.

De lege welletjes die overblijven om tot 16 monsters uit te komen worden gevuld met 10 μl Hi-Di Formamide.

Voor aflezen met behulp van Genemarker zie §3.6 Genemarker.

Wordt er een piek gezien bij 186bp dan heeft er geen methylatie plaatsgevonden en is er verdenking op het Lynch syndroom.

Wordt er een piek gezien bij 183bp dan heeft er wel methylatie plaatsgevonden en is er geen sprake van Lynch syndroom.

Vind deze methylatie ook plaats in normaal weefsel dan is er waarschijnlijk sprake van een kiembaanmutatie.

3 Resultaten:

Voor beeld MSI uitslag van ABI: MSS

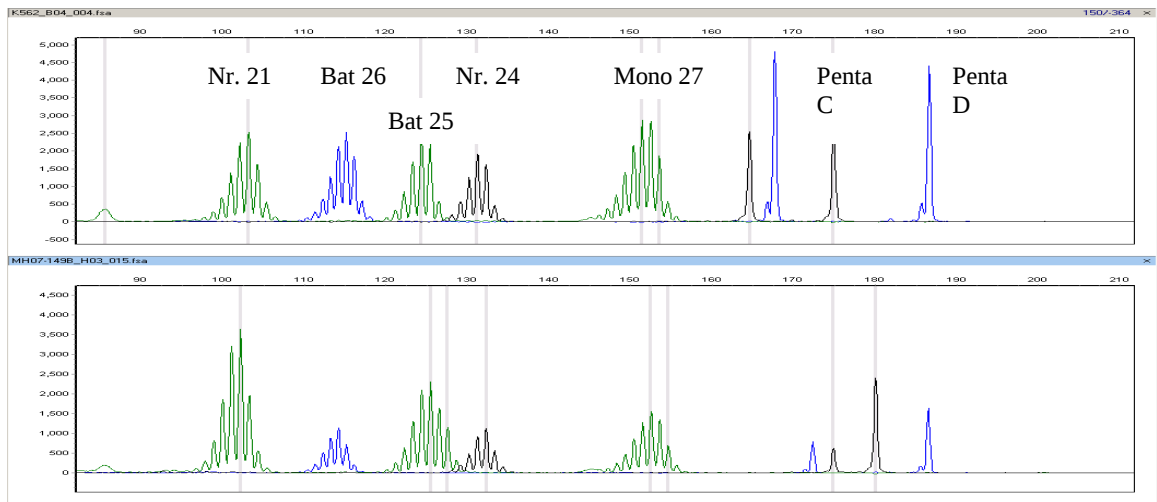


Fig. 9 In de bovenste rij is de positieve controle te zien, met de heterozygote penta C en D markers.

Op de onderste rij is patiënt MH07-149B te zien. De vijf MSI markers liggen allen op gelijke hoogte als de controle, dus geen verschuiving oftewel geen MSI. De penta C en D zijn beide heterozygoot aanwezig en liggen op een andere plaats dan het controle monster wat betekend dat het niet dezelfde patiënt is, wat ook niet waarschijnlijk is, en betekend dat er geen contaminatie heeft plaatsgevonden.

Van de 227 onderzochte weefsels laten 211 (93%) een MSS uitslag zien. Als voorbeeld is patiënt MH07-149 gebruikt. Hiervan is alleen tumor weefsel (B) onderzocht. Deze patiënt laat ook totale expressie zien van al de 4 MMR genen bij IHC.

MSI

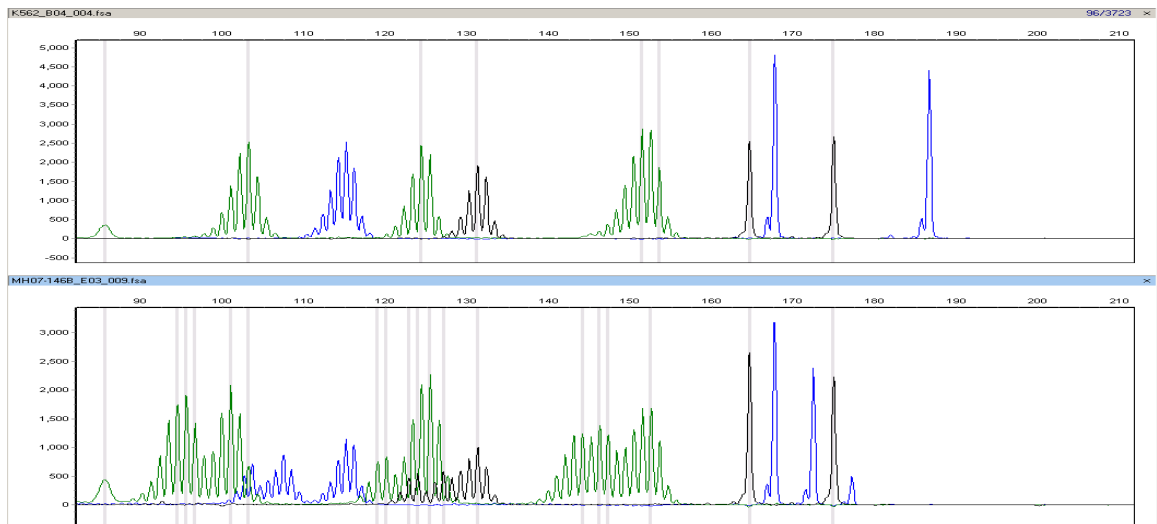
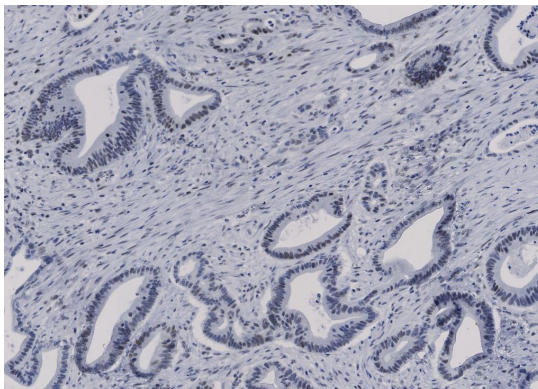


Fig. 10 In de bovenste rij is de positieve controle te zien, met de heterozygote penta C en D markers.

Op de onderste rij is patiënt MH07-146B te zien. Al de vijf MSI markers laten een verschuiving zien naar links ten opzichte van de controle, dit ziet eruit als een duidelijk MSI. Bij alle markers word nog een piekpatroon gezien op de normale hoogte, dit komt omdat er bijna altijd bijmenging is met normaal weefsel.

Van de 227 onderzochte weefsel laten 16 (7%) een duidelijke MSI zien. Als voorbeeld is patiënt MH07-146 gebruikt. Voor MSI is alleen tumor (B) weefsel gebruikt. De patiënt laat zo'n duidelijke MSI zien, dat normaal weefsel niet is getest. Alleen bij een kleine verschuiving van een van de markers wordt normaal (A) weefsel ook getest om te zien of het een MSI is wat veroorzaakt wordt door mutatie in de tumor.

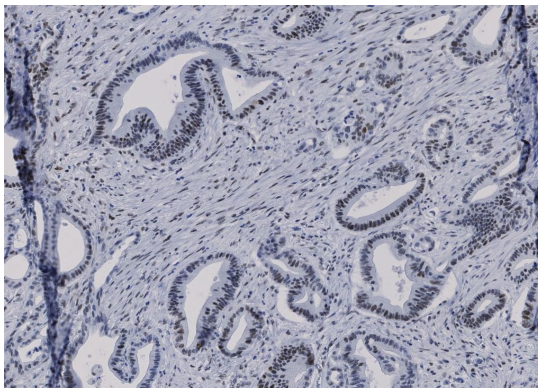
Deze patiënt lijkt een mutatie te hebben in de MLH1 MMR gen bij de IHC en daarom heeft er ook een methylatie test ondergaan.

Voorbeeld van IHC kleuringen:

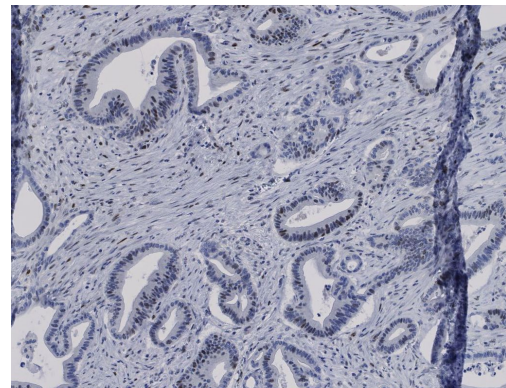
MLH1



MSH2



PMS2



MSH6

Fig. 11 In de figuur is te zien dat bij al de 4 IHC kleuringen de stroma cellen, normaal weefsel, en de tumor cellen expressie vertonen.

Van de 227 onderzochte weefsels laten 210 (92,5%) expressie zien van al de 4 MMR genen en hebben geen mutatie in een van de MMR genen.

Patiënt MH07-149 heeft ook geen mutatie in een van de 4 MMR genen, zoals te zien in figuur 11, wat kloppend is met de MSS uitslag.

Is er geen MSI en wel aankleuring bij de immunohistochemie dan is er geen verdenking van Lynch Syndroom. Is er wel MSI aangetoond en er is geen aankleuring te zien van een of meerdere Mismatchrepair genen dan is er verdenking op Lynch Syndroom₍₅₎.

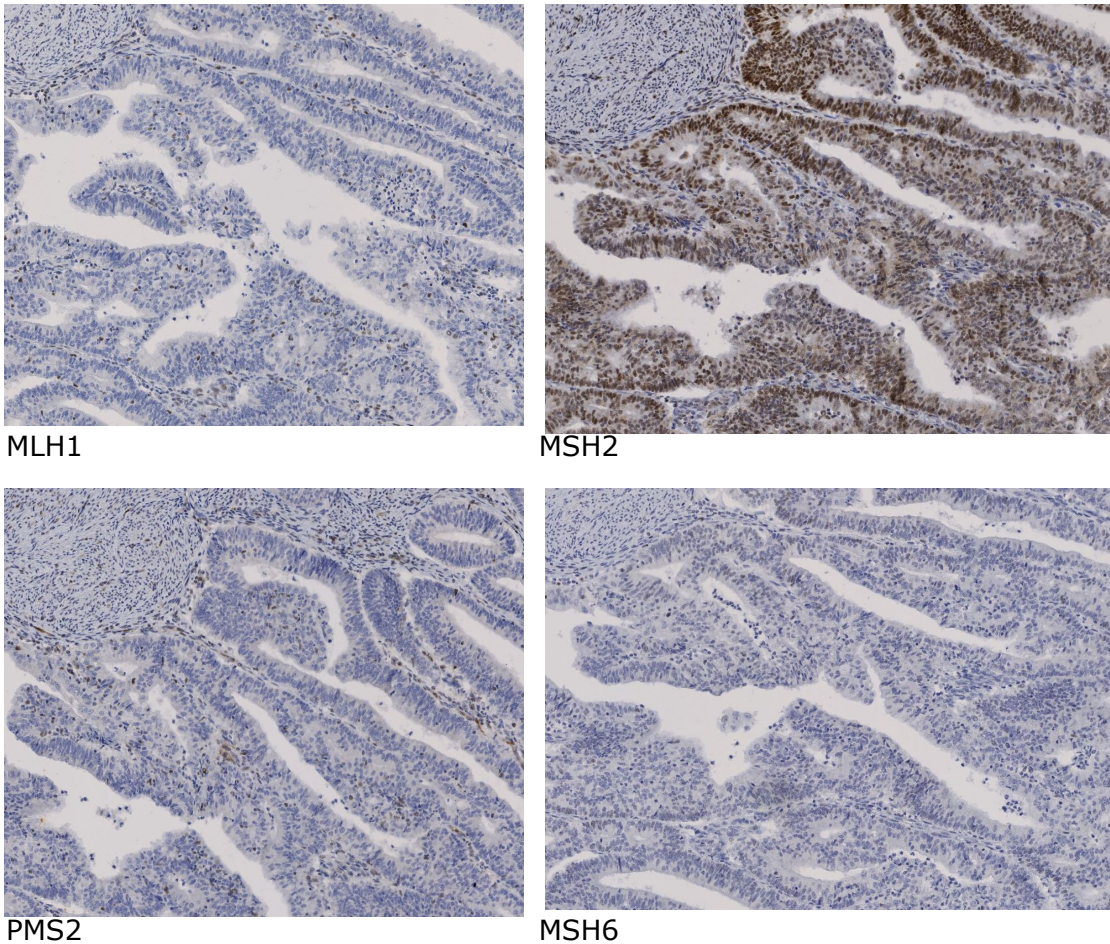
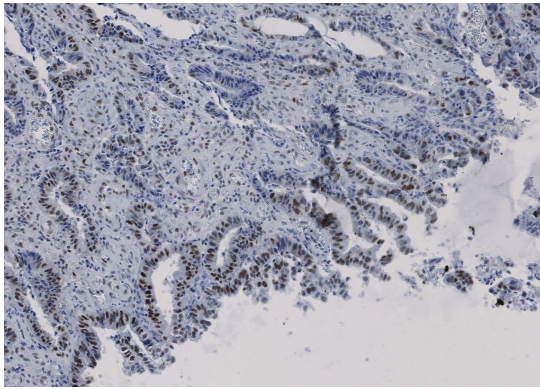


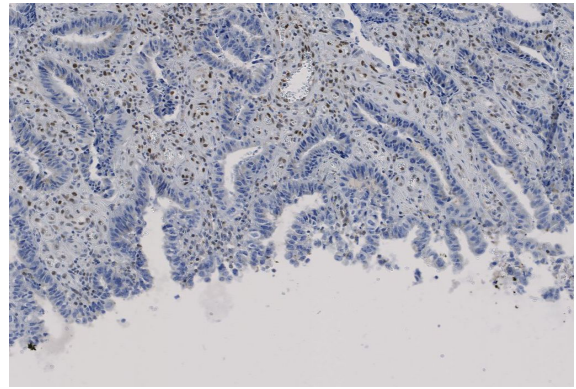
Fig. 12 Bij alle 4 de IHC kleuringen vertonen de stroma cellen expressie. Alleen bij MLH1 en PMS2 is te zien dat de tumorcellen geen expressie tonen en daardoor blauw gekleurd blijven.

Van de 227 onderzochte weefsels hebben 11 (4,8%) een afwijkende kleuring in de MLH1 en PMS2 MMR gen en lijken een mutatie te hebben in de MLH1 MMR gen.

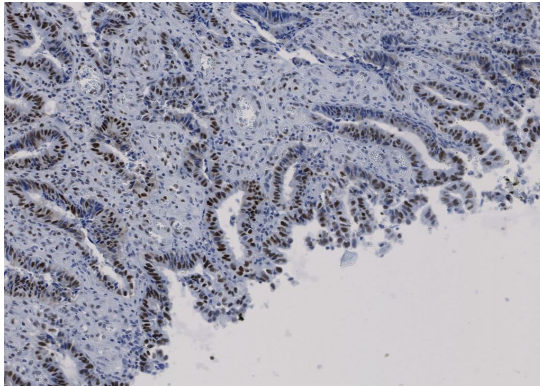
Ook patiënt MH07-146 heeft een mutatie in het MLH1 MMR gen zoals te zien in figuur 12.



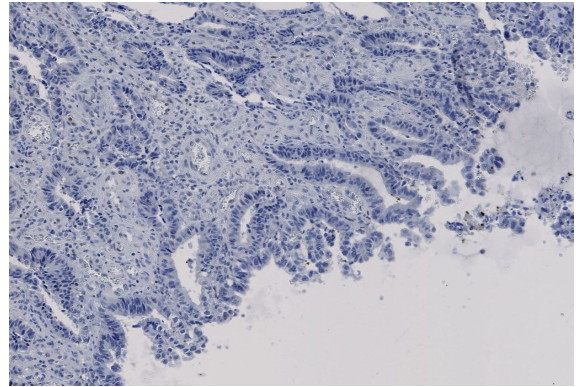
MLH1



MSH2



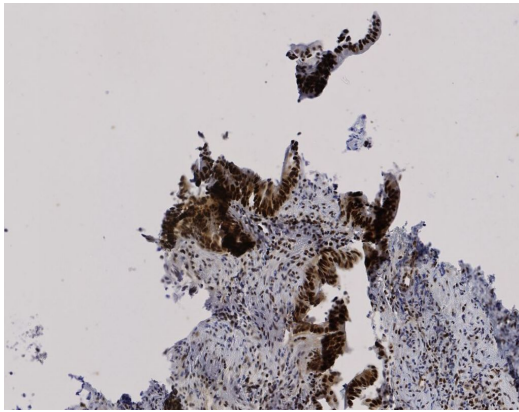
PMS2



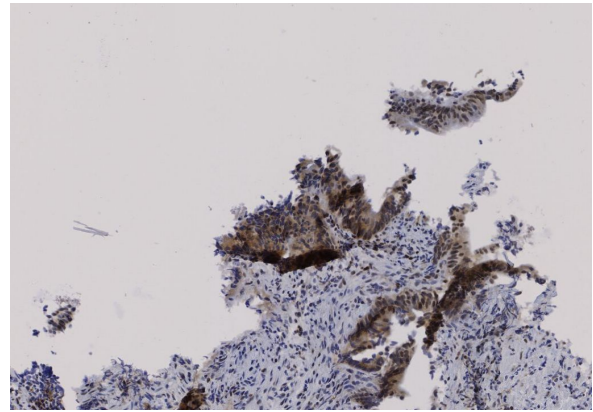
MSH6

Fig. 13 In dit figuur is te zien dat alle stroma cellen van al de 4 IHC kleuringen expressie vertonen. Alleen bij MSH2 en MSH6 vertonen de tumorcellen geen expressie en blijven blauw.

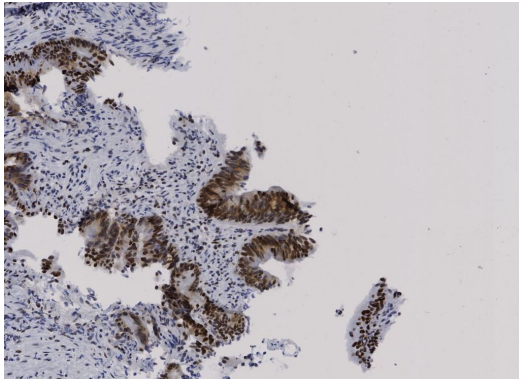
Van de 227 onderzochte weefsel hebben maar 2 (0,9%) een afwijkende IHC bij MSH2 en MSH6, zij lijken een mutatie te hebben in het MSH MMR gen.



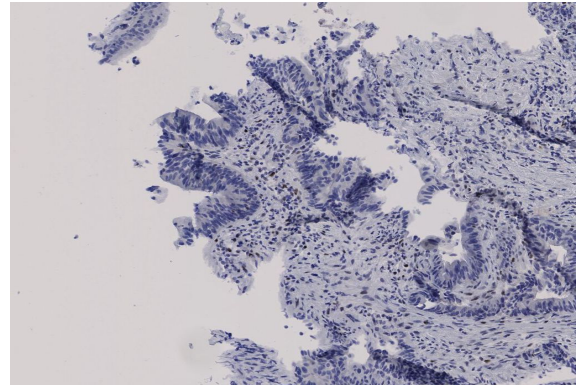
MLH1



MSH2



PMS2



MSH6

Fig. 14 De figuur laat expressie zien van al de 4 MMR genen in de stroma cellen. Alleen bij MSH6 vertonen de tumorcellen geen expressie.

Van de 227 onderzochte weefsel hebben 4 (1,8%) een afwijkende IHC van het MSH6 MMR gen. Omdat de tumorcellen in MSH2 wel expressie vertonen duidt dit op een mutatie in het MSH6 MMR gen.

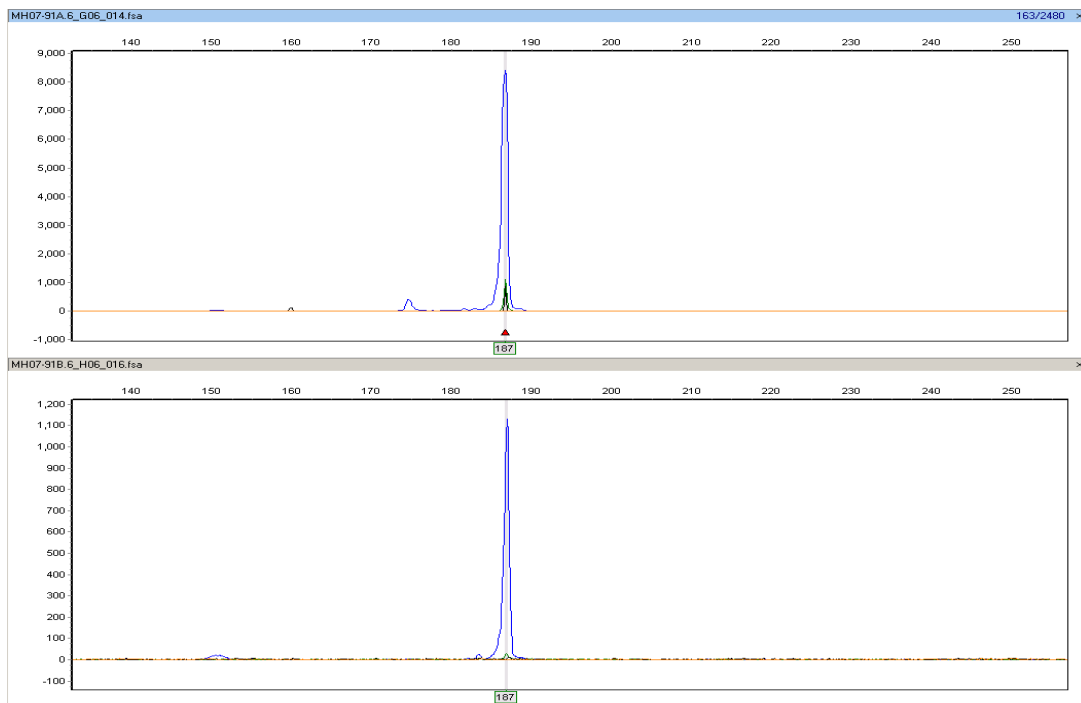
voorbeelden van *MLH1* promotor hyper methylatie:

Fig. 15 De figuur laat normaal (A) en tumor (B) weefsel zien van patiënt MH07-91. Beide weefsels geven een piekpatroon bij 186 bp en de tumor is niet gemethyleerd.

Van de 11 weefsel onderzocht op methylatie laten 4 (36,4%) geen methylatie zien en hebben vermoedelijk het Lynch syndroom.

Patiënt MH07-91 had een duidelijk MSI en een mutatie in het *MLH1* MMR gen. Er is gekeken of de promotor gemethyleerd was wat niet het geval is zoals te zien in figuur 15. Dit betekent dat deze patiënt vermoedelijk Lynch syndroom heeft en doorverwezen wordt naar de Klinische genetica voor counseling en verder mutatie onderzoek.

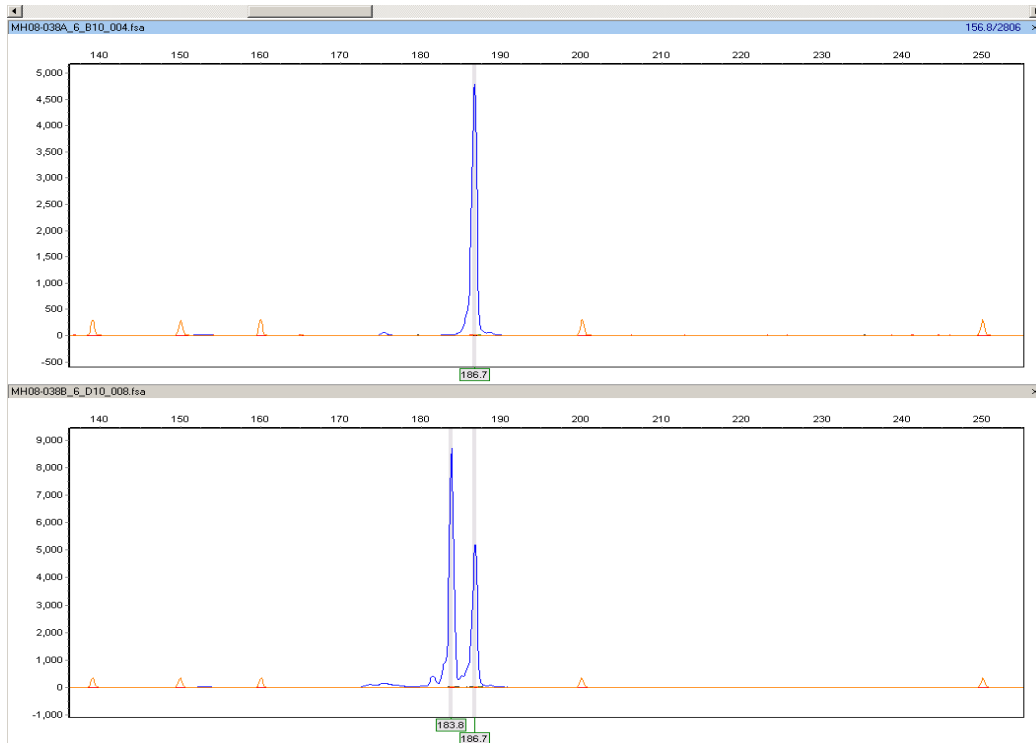


Fig. 16 De figuur laat methylatie zien van tumor (B) weefsel van patiënt MH08-038.

Het PCR product van het gemodificeerde gemethyleerd DNA loopt op een hoogte van 183bp en van het niet-gemodificeerde gemethyleerd DNA op 186bp. Van de 11 weefsel onderzocht op methylatie laten 7 (63,6%) een methylatie zien en hun tumor is waarschijnlijk van sporadische oorsprong. Patiënt MH08-038 had een duidelijke MSI en een mutatie in het MLH1 MMR gen. De MLH1 promotor is getest op methylatie en bleek gemethyleerd te zijn, wat figuur 16 laat zien.

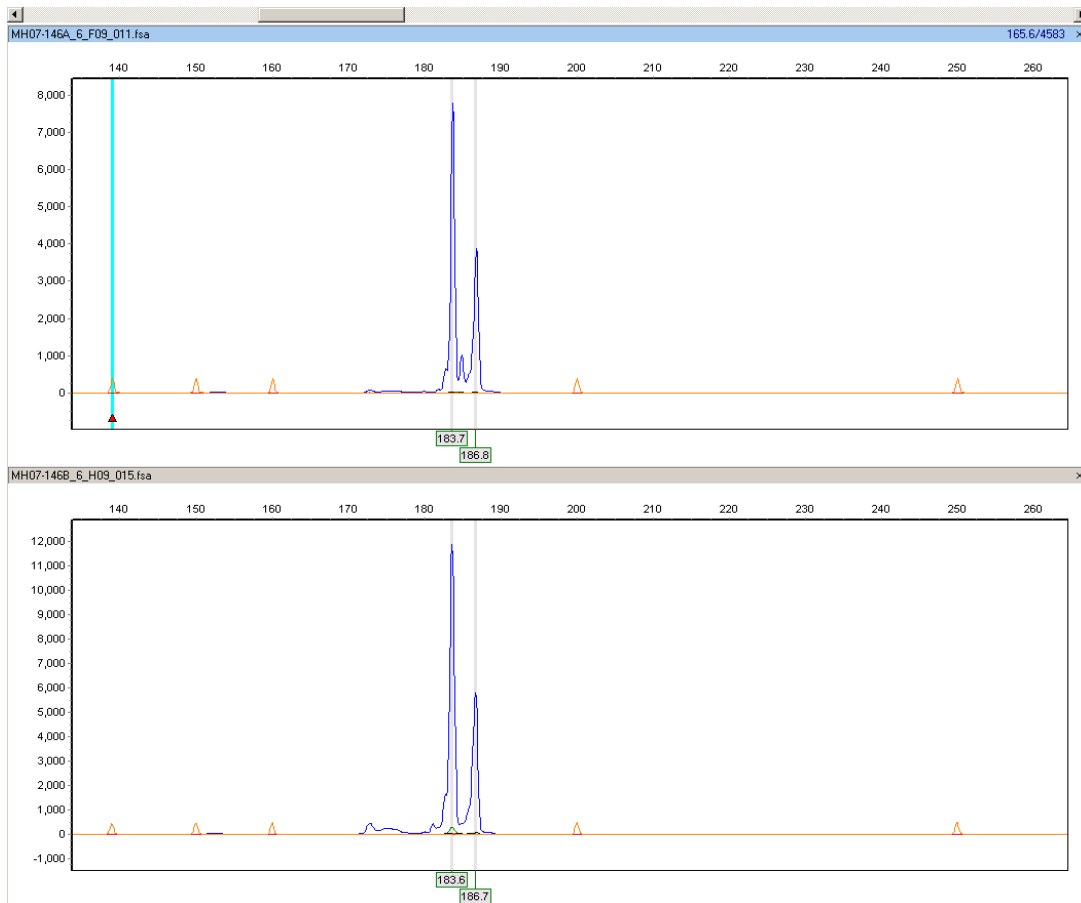


Fig. 17 De figuur is van patiënt MH07-146 en vertoond in normaal (A) en tumor (B) weefsel methylatie van de MLH1 promotor.

Van de 11 weefsel met een mutatie in het MLH1 MMR gen heeft maar één patiënt, MH07-146, ook methylatie in het normaal weefsel, te zien in figuur 17. Deze patiënt lijkt een kiembaanmutatie te hebben, deze mutatie valt niet onder Lynch syndroom maar kan wel erfelijk zijn.

5 Conclusie/discussie

Met behulp van de aangepaste Bethesda criteria die in het onderzoek zijn gebruikt, zijn er 213 patiënten gevonden die voldeden aan minimaal één van de regels. Van deze 213 patiënten zijn 227 weefsels onderzocht afkomstig uit het colon of rectum. Van de 213 onderzochte patiënten zijn er 9 (4,2%) patiënten met een verdenking voor Lynch syndroom.

Tabel 1 t/m 4 (zie bijlagen) laat zien hoeveel onderzochte weefsels per soort vermoedelijk het Lynch syndroom hebben.

Er is vermoedelijk Lynch syndroom aangetoond in 2 van de 32 preoperatieve biopsen uit het rectum. Bij biopsen is er maar weinig weefsel en dus DNA aanwezig. De ABI is zo gevoelig dat er maar weinig tumor DNA nodig is om eventueel aanwezige MSI te laten zien.

Er is wel Lynch syndroom aangetoond in 2 van de 26 adenomen. Meeste van deze adenomen zijn ontstaan op jonge leeftijd, tussen 31 en 46 jaar oud. De gemiddelde leeftijd per soort onderzochte weefsel is te zien in tabel 6 (zie bijlagen). Omdat adenomen ontstaan op vroege leeftijd en hierin Lynch syndroom kan worden aangetoond, betekent dat met de juiste screening patiënten vroegtijdig opgespoord en geholpen kunnen worden en de overlevingskans toeneemt.

Er is geen Lynch syndroom aangetoond in de 19 endometriumcarcinomen van de 213 onderzochte patiënten. Dat er nu geen Lynch syndroom is aangetoond in deze 19 endometriumcarcinomen komt waarschijnlijk omdat er nog te weinig van zijn onderzocht.

Deel van het onderzoek naar afwijkingen in de mismatchrepair genen MLH1, MSH2, MSH6 en PMS2, toont aan dat 11 (4,8%) van de 227 onderzochte weefsels geen expressie hebben van het MLH1 gen en maar 2 (0,9%) van de 227 onderzochte weefsels van het MSH2 gen. Geen expressie van het MSH6 gen is 2 keer zo hoog als van een MSH2 gen, namelijk 4 (1,8%) van de 227 onderzochte weefsels.

In tabel 5 (zie bijlagen) is te zien dat van de 227 onderzochte weefsels 16 (7,0%) een duidelijke MSI laten zien aangetoond met behulp van de ABI. Van deze 16 weefsels vertonen 11 (68,8%) geen expressie van het MLH1 gen en 2 (12,5%) van het MSH2 gen. Van de 4 weefsels die geen expressie van het MSH6 laten zien, hebben er maar 3 (18,8%) een duidelijk MSI. Dit laatste is een toename vergeleken met literatuur (5-10%).

Deze toename kan komen omdat voorheen voornamelijk werd gekeken naar immunohistochemische expressie van MLH1 en MSH2 gen en minder naar het MSH6 gen. Er is nog geen analyse om aan te tonen of de afwijking in het MSH6 gen sporadisch is of vermoedelijk Lynch. Dat kan tot nu toe alleen met mutatie analyse.

Wel is er in de literatuur bekend dat de marker Bat-40 sneller MSI bij een mutatie in het MSH6 gen. Deze marker wordt besteld en getest in de loop van de studie.

Van de 11 weefsels met een immunohistochemische afwijking in het MLH1 gen, vertonen 7 (63,6%) weefsels een hypermethylering van de MLH1 promotor. Dit zou betekenen dat 4 (36,4%) weefsels geen hypermethylering van de MLH1 promotor vertonen en vermoedelijk het Lynch syndroom mutatie gen hebben.

De onderzochte bipten die zijn preoperatief. Van de meeste bipten wordt later ook het resectie preparaat van het colorectaal carcinoom verwacht.

Dit is niet altijd het geval. Van de 213 onderzochte patiënten zijn er maar van 14 patiënten het bipt en vervolgens het resectie preparaat onderzocht. Van de rest van de patiënten zijn alleen het bipt, resectiepreparaat of adenoom onderzocht.

Van 13 patiënten komen de uitslagen van de MSI bepaling, immunohistochemische kleuring en van de eventuele geteste MLH1-hypermethylatie overeen. Van één patiënt was het preoperatief bipt verdacht op Lynch syndroom vanwege een duidelijke MSI en een immunohistochemische afwijking van het MLH1 en PMS2 gen. Daarnaast was de MLH1 promotor in het bipt niet gemethyleerd. Dit is een aanwijzing dat het geen sporadische kanker is, maar verdacht voor mutatie in het mismatch repair MLH1 gen en dus vermoedelijk Lynch syndroom. Na bipt name is de patiënt behandeld met chemotherapie en vervolgens is het resectie preparaat onderzocht. Het resectie preparaat was tevens verdacht op Lynch syndroom vanwege een duidelijke MSI en een immunohistochemische afwijking van het MLH1 en PMS2 gen. De Penta C en D markers kwamen overeen met het preoperatief bipt, wat bewijst dat het van dezelfde patiënt afkomstig is. Alleen bij het resectiepreparaat was de MLH1 promotor wel gemethyleerd en dus niet meer verdacht voor Lynch syndroom. Deze verandering zou kunnen komen door de behandeling met chemotherapie na bipt-name.

De aangepaste Bethesda criteria zorgen voor een grotere hoeveelheid nieuwe patiënten met een grote spreiding van leeftijd, 28 tot en met 72 jaar. Dat er patiënten zijn ouder dan 70, terwijl de aangepaste Bethesda criteria alleen kijken naar patiënten onder de 70 jaar, komt omdat er een langere tijd zit tussen de goedkeuring van de studie (december 2005) en de werkelijke start van het onderzoek (mei 2007). In deze tussentijd werden wel al patiënten geselecteerd maar pas na hun 70^{ste} onderzocht.

Bij 1 patiënt, MH07-0073, is een onduidelijke MSI met behulp van de ABI waarbij markers Nr-21 en Nr-24 een lichte verschuiving laten zien en dezelfde patiënt heeft een afwijkende immunohistochemische kleuring, waarbij tumor- en normale cellen geen expressie tonen van het antilichaam MSH6.

Tot nu toe wordt al het weefsel eerst gedeparaffineerd voor de werkelijke DNA isolatie. Dit is tijdrovend en komende tijd zullen de resultaten vergeleken worden met wel en niet gedeparaffineerd weefsel. Naar mijn mening zal er vermoedelijk op de ABI meer storende signaal gezien worden en zal het DNA uit niet gedeparaffineerd weefsel verder verdunt moeten worden om de storende signaal te vervagen.

De studie is nog gaande. Tot nu toe ziet het er naar uit dat de moleculaire methoden die nu gebruikt worden om Lynch syndroom op te sporen werken. De studie toont ook aan dat het mogelijk is om Lynch syndroom al in een vroeg stadium aan te tonen in adenomen.

6 Literatuur:

- Brief 'informatie ten behoeve van METC' van 30 augustus 2005.
 - Nieuwsbrief 'naar een betere diagnostiek van HNPCC' oktober 2007.
 - Nieuwsbrief 'naar een betere diagnostiek van HNPCC' maart 2008
 - Het HNPCC journaal, november 2007
 - Het HNPCC journaal, februari 2008
 - Presentatie 'CBO-richtlijn erfelijke darmkanker: betekenis voor de patholoog' UMC St Radboud, augustus 2007.
 - 'DNA isolatie uit humaan weefsel', protocol.
 - Handleiding MSI Analysis System, Version 1.2.
 - Werkvoorschrift 'Het aantonen van antigenen met specifieke antilichamen'
 - Werkvoorschrift 'EZ DNA Methylation kit'.
 - Werkvoorschrift 'Hypermethylering PCR MLH1 promotor'.
- 1 Murphy K.M., Zhang S., Geiger T., Hafez M.J., Bacher J., Berg K.D., Eshleman J.R.: Comparison of the Micro satellite Instability Analysis System and the Bethesda Panel for the determination of microsatellite instability in Colorectal Cancers. JMD, July 2006; 3:8 (305-311).
 - 2 Bacher J.W., Flanagan L.A., Smalley R.L., Nassif N.A., Burgart L.J., Halber R.B., Abdel Megid W.M., Thibodeau S.N.: Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-high tumors. Galley Proof, 3/02/2004; 9:19 (1-14).
 - 3 Morsink F.H.M., Ezendam C., Weger de R.A., Offerhaus G.J.A.: Moleculaire diagnostiek van erfelijke vormen van dikke darmkanker. NTVO, 2007; 4:6 (278-284).
 - 4 Dinjens W.N.M., Ramsoekh D., Leerdam M.E., Kuipers E.J., Wagner A., Steyerberg E.W.: Naar een betere diagnostiek van Hereditair Non Polyposis Colorectaal Carcinoom (HNPCC). IKR Bulletin, december 2006 (15-18).
 - 5 Velden van der A.W., Sleddens H.F.B.M., Abbou M., Ham van der F., Dinjens W.N.M.: Diagnostiek van HNPCC op een pathologie laboratorium. Histotechniek/Cyto-Visie, 2002; 4:10 (12-15).
 - 6 Weinber R.A.: The biology of Cancer, ISBN 0-8153-4076-1
 - 7 Halvarsson B., Lindblom A., Rambech E., Lagerstedt K., Nilbert M.: Microsatellite instability analysis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer? Virchows Arch 2004 444 (135-141).
 - 8 Capel E., Fléjou J-F., Hamelin R.: Assessment of MLH1 promoter methylation in relation to gene expression requires specific analysis. Oncogene 2007; 26 (7596-7600).
 - 9 Cunnigham J.M., Kim C-Y., Christensen E.R., Tester D.J et al.: The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. Am J Hum Genet, 2001; 69 (780-790).
 - 10 Müller A., Giuffre G., Bocker Edmonston T., Mathiak M. et al.: Challenges and pitfalls in HNPCC screening by microsatellite analysis and immunohistochemistry. JMD 2004; 4:6 (308-315)
 - 11 Wheeler J.M.D.: Epigenetics, mismatch repair genes and colorectal cancer. Ann R Coll Surg Engl 2005; 87 (15-20).
 - 12 Ramel C.: Mini- and microsatellites. Environ Health Perspect 1997; 4:105 (781-789).

- 13 Fraylin I.M.: Methods of molecular analysis: mutation detection in solid tumours. *Mol Pathol* 2002; 55 (73-79).
- 14 Qi Li W., Kawakami K., Ruskiewicz A., et al.: BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *BMC molecular cancer* 2006; 5:2
- 15 Laan van der R., Kooij van der A.: Geschreven volgens Exact communiceren : richtlijnen voor de communicatie over natuurwetenschappelijk onderzoek. 2e dr . Houten [etc.] : Bohn Stafleu Van Loghum, 2002. - ISBN: 90-313-3848-6
- 16 Plotz G., Welsch C., Giron-Monzon L., et al.: Mutations in the MutS α interaction interface of MLH1 can abolish DNA mismatch repair. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:2 (6574-86)
- 17 Oda S., Maehara Y., Ikeda Y., et al.: Two modes of microsatellite instability in human cancer: differential connection of defective DNA mismatch repair to dinucleotide repeat instability. *Nucleic Acids Res* 2006; 33:5 (1628-36)
- 18 Hampel H., Frankel W., Panescu J., et al.: Screening for Lynch syndrome among endometrial cancer patients. *Cancer res* 2006; 66:15 (7810-17)
- 19 Lagerstedt Robinson K., Liu T., Vandrovcova J., et al.: Lynch Syndrome Diagnostics. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:4 (291-9)
- 20 Watson N., Grieu F., Morris M., et al.: Heterogeneous staining for mismatch repair proteins during population-bases prescreening for hereditary non polyposis colorectal cancer. *JMD* September 2007; 9:4 (472-8)
- 21 Kunstmann E., Vieland J., Brasch F.E., et al.: HNPCC: six new pathogenic mutations. *BMC Med genet* 2004; 5:6
- 22 Banjera A., Bustin S.A. and Dorudi S.: The immunogenetic of colorectal cancers with high-degree microsatellite instability. *World J Surg onco* 2005; 3:26
- 23 Wagner A., Barrows A., Wijnen J. Th., et al.: Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States: High mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an american founder genomic deletion of the MSH2 gene. *Am J Hum Genet* 2003; 72 (1088-1100)
- 24 Jones P.A., Laird P.W.: Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* February 1999; 21 (163-167)
- 25 Sancar A.: Excision repair invades the territory of mismatch repair. *Nat Genet* March 1999; 21 (247-249)
- 26 Umar A., Risinger J.I., Hawk E.T., Barret J.C.: Testing guidelines for hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:2 (153-158)

Websites

- <http://www.umcn.nl/patient/> gezien op 21-12-2007
- [http://www.fdg.unimaas.nl/lod/7het Lynch syndroom.htm](http://www.fdg.unimaas.nl/lod/7het%20Lynch%20syndroom.htm) gezien op 21-12-2007
- <http://www.erasmusmc.nl/pathol/> gezien op 0-21-12-2007
- <http://www2.eur.nl/fgg/pathol/> gezien op 23-01-2008
- <http://www.oncoline.nl/> gezien op 23-01-2008
- [http://www.macgn.org/cc_het Lynch syndroom1.html](http://www.macgn.org/cc_het%20Lynch%20syndroom1.html) gezien op 28-01-2008
- <http://www.cancer.org/> gezien op 18-03-2008
- <http://www.kwfkankerbestrijding.nl/> gezien op 13-03-2008
- <http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html> gezien op 03-04-2008

Bijlage

Tabel 1 Onderzochte colorectaalcarcinomen

uitslag	Aantal gevallen	Percentage op onderzochte weefsel (%)
Sporadisch	3	2,01
Vermoedelijk lynch	5	3,36
Twijfel lynch	1	0,67
Geen MSI	141	94,63

n=150

Tabel 2 Onderzochte pre-operatieve bipten

Uitslag	Aantal gevallen	Percentage op onderzochte weefsel (%)
Sporadisch	0	0,00
Vermoedelijk lynch	2	6,25
Geen MSI	30	93,75

n= 32

Tabel 3 Onderzochte adenomen

Uitslag	Aantal gevallen	Percentage op onderzochte weefsel (%)
Sporadisch	1	3,85
Vermoedelijk lynch	2	7,69
Geen MSI	23	88,46

n= 26

Tabel 4 Onderzochte endometrium carcinomen

Uitslag	Aantal gevallen	Percentage op onderzochte weefsel (%)
Sporadisch	3	15,79
Vermoedelijk lynch	0	0,00
Geen MSI	16	84,21

n=19

Tabel 5 Totaal per afwijking

Soort afwijking	Aantal gevallen	Percentage op totaal (%)
MSI	16	7,0
MLH1	11	4,8
MSH2	2	0,9
MSH6	4	1,8
Methylatie	7	3,1

n=227

Tabel 6 Gemiddelde leeftijd van de patiënten per weefsel

Soort weefsel	Leeftijd (jr)
Colorectaalcarcinoom	61
Biopt	61
Adenoom	41
Endometriumcarcinoom	62