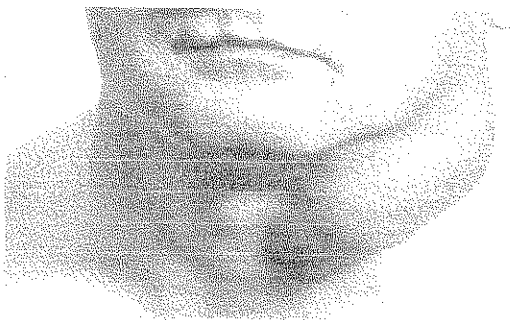


## Zeldzame erfelijke tumoren sleutel tot nieuw mechanisme voor tumorvorming

Paragangliomen van het hoofd-halsgebied (HH) zijn zeldzame, overwegend goedaardige tumoren die vaak in familiair verband voorkomen. In Nederland krijgt slechts 1 op de 625.000 personen een HH-paraganglioom. Waarom dan onderzoek aan zo'n zeldzame ziekte? Dat is eigenlijk begonnen om een verklaring te vinden voor het bijzondere overervingspatroon van de ziekte. Hoewel zowel mannen als vrouwen de ziekte kunnen krijgen, viel op dat de ziekte uitsluitend via de vader (paternaal) wordt overgedragen. Een dochter die zelf de ziekte heeft draagt de erfelijke aanleg over zonder dat haar kinderen ziek worden. De ziekte lijkt dus een generatie over te slaan en openbaart zich in de volgende generatie bij de kinderen van haar zonen die drager zijn van de aanleg. Het lijkt alsof het ziekte veroorzakende gen wanneer het via de eicellen wordt doorgegeven van een stempel (imprint) is voorzien. Deze stempel zou er dan in de zaadcellen worden afgehaald. Om welk gen(en) gaat het en hoe zit het nu precies met die genetische imprinting? Dat waren de vragen die een groep Leidse onderzoekers indertijd wilde beantwoorden. Tot hun verassing kwamen zij een nieuw mechanisme voor tumorvorming op het spoor dat mogelijk ook bij algemeen voorkomende vormen van kanker een rol zou kunnen spelen.

Paragangliomen van het hoofd-hals gebied zijn zeldzame, vaatrijke tumoren van het parasymphatische zenuwstelsel. Deze tumoren kunnen op verschillende plaatsen in het hoofd-halsgebied voorkomen (zie figuur 1). De meest voorkomende tumor is de glomus caroticum tumor (zie figuur 2). In 1742 beschreef de Zwitser Albrecht van Haller als eerste de glomus caroticum. Dit is een roodbruine rijstkorrel naast de splitsing van de grote halsslagader, de arteria carotis. De glomus caroticum is onderdeel van een uitgebreid systeem van vergelijkbare lichaampjes, doorgaans te vinden naast zenuwknopen (ganglia) en daarom het "paraganglion-systeem" genoemd. HH-paragangliomen komen vaker voor bij hooggebergtebewoners. Dat komt omdat de glomus onder andere de zuurstofconcentratie in arterieel bloed bewaakt. Bij een tekort aan zuurstof wordt er een hijgreflex in werking gezet. Leef je in de bergen waar permanent weinig zuurstof is, dan kan het aantal glomuscellen toenemen en kennelijk vergroot dit de kans dat er ongecontroleerde groei optreedt wat een HH-paraganglioom oplevert. Maar je hoeft niet noodzakelijk in de bergen te leven om een HH-paraganglioom op te lopen. Het is uitzonderlijk, maar sommige families zijn drager van een genetische mutatie die ertoe bijdraagt dat uit een ontspoorde glomuscel een tumor groeit. De incidentie van hoofd-hals-paragangliomen in Nederland wordt op 0.16 per 100.000 (1 op 625.000) personen geschat. Deze ontwikkelt zich meestal tussen het twintigste en veertigste levensjaar. Dit geldt zowel voor mannen als voor vrouwen.



Figuur 2: Glomus Caroticum Tumor

### Klinische verschijnselen:

HH-Paragangliomen groeien over het algemeen langzaam, waardoor de prognose vaak gunstig is en de patiënt weinig of geen klachten ondervindt. Meestal is er sprake van een langzaam groter wordende zwelling in de hals of zijn er klachten van gehoorvermindering met kloppend oorsuizen. Bij sommige patiënten kunnen zenuwen in de knel komen, met als gevolg heesheid, slikklachten of aangezichtsverlamming.

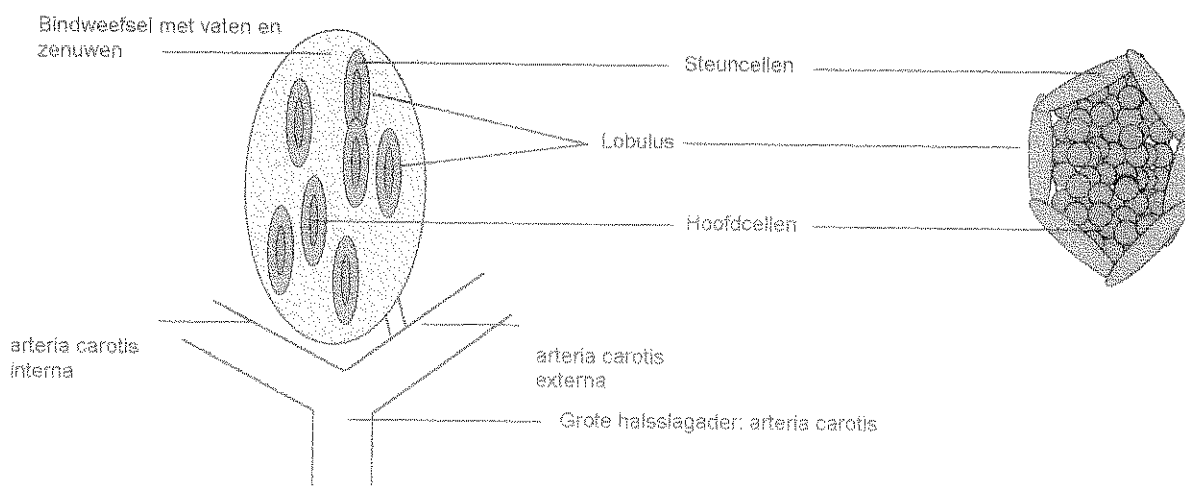
Door de sterke doorbloeding en de nauwe relatie met bloedvaten en zenuwen is het vrij eenvoudig om een diagnose te stellen. HH-Paragangliomen kunnen gedetecteerd worden door middel van een CT-scan en MRI. De chirurgische behandeling is gecompliceerd door de concentratie van belangrijke zenuwen en bloedvaten in het gebied rondom de tumor.

Wanneer de tumor vroegtijdig wordt behandeld zijn de resultaten vaak beter dan wanneer de tumor al lange tijd aanwezig is. Maar de behandeling kan leiden tot ernstige klachten en in het verleden zelfs resulteren tot het overlijden van de patiënt. Tegenwoordig komt dat gelukkig maar zelden meer voor maar wel kunnen bij de operatie bepaalde hersenzenuwen, die o.a. de stembanden laten bewegen, beschadigd worden met kans op blijvende uitval. Daarom wordt de behandeling regelmatig uitgesteld. Vooral bij mensen die nauwelijks klachten ondervinden.

### Normale structuur van de glomus caroticum:

De diameter van een normale glomus caroticum is 3-5 mm. Bij mensen die op grote hoogte leven is deze meestal groter. De histologie van een glomus caroticum is identiek aan andere paraganglia. Deze bestaat uit lobuli van glomusweefsel, van elkaar gescheiden door bindweefsel waarin de zenuwen en vaten lopen. Een lobulus bestaat weer uit clusters van cellen van  $\pm 100\mu\text{m}$  in diameter die twee celltypen bevatten. Dit zijn de "hoofdcellen" (chief cells) en "steuncellen" (sustentacular cells). De hoofdcellen hebben een druiventrosachtig vorm (de zogenaamde "Zelballen") die zijn omgeven door de veel smallere steuncellen, die voor een scheiding zorgen met het vaatrijke bindweefsel (zie figuur 3).

De histologie van paragangliomen is vergelijkbaar aan die van de normale glomus caroticum, behalve dat het aantal glomuscellen veel groter is (Zelballen formatie).



Figuur 3: Histologie van een Glomus Caroticum

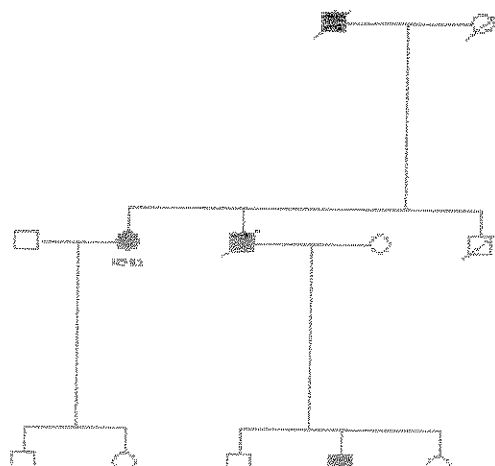


dehydrogenase. Elektronen die vrijkomen bij de oxidatie van  $FADH_2$  naar  $FAD$  worden door complex II heen, via ubiquinon, naar cytochroom b van complex III getransporteerd. In Nederland blijkt het merendeel van de HH-paragangliomafamilies door twee verschillende SDHD kiembaanmutaties verklaard te kunnen worden. Kennelijk zijn dit zogenaamde "founder" mutaties die eeuwen geleden ontstaan zijn en zich in de bevolking hebben verspreid. SDHD is een klassiek tumorsuppressorgen. Behalve de copie van het gen die door de kiembaanmutatie is uitgeschakeld hebben tumorcellen ook de normale copie (wild type allel) verloren (loss of heterozygosity, LOH) zodat er geen functioneel SDHD eiwit meer wordt gemaakt. Na de ontdekking van kiembaanmutaties in SDHD werden kort daarna ook kiembaanmutaties in SDHC (PGL3) en SDHB (PGL4) ontdekt in families met erfelijke paragangliomen waaronder paragangliomen van de bijnier (pheochromocytomen)(3: Niemann, 4: Astuti). Inmiddels is duidelijk geworden dat pheochromocytomen, tumoren die vaker metastaseren en ook tot een levensgevaarlijke stijging in de bloeddruk kunnen leiden eveneens deel uitmaken van het spectrum van SDHD geassocieerde tumoren (10: Neumann, 11: Dannenberg). De identiteit van PGL2, een gen dat door Nijmeegse onderzoekers eveneens op chromosoom 11 (11q13) werd gelocaliseerd (5: Mariman) is echter nog steeds niet opgehelderd. Er zijn geen aanwijzingen dat in dit gebied genen liggen die bij complex II betrokken zijn.

De meeste tumor suppressorgenen die bij erfelijke vormen van kanker betrokken zijn hebben een functie bij signalering en herstel van DNA schade, regulatie van de celcyclus, apoptose etc. Hoe kunnen mutaties die de functie van complex II van de ademhalingsketen compromitteren tot tumorgroei leiden. Een tipje van de sluier lijkt te zijn opgelicht door een Amerikaans-Britse onderzoeksgroep die onlangs publiceerden dat dysfunctie van het SDH complex leidt tot stabilisering van HIF-1 $\alpha$ , een hypoxie-gevoelige transcriptiefactor. Onder normale omstandigheden wordt HIF-1 $\alpha$  afgebroken maar bij lage zuurstofspanning (hypoxie) wordt HIF-1 $\alpha$  gestabiliseerd en zijn rol als transcriptiefactor vervullen en o.a. vaatgroei induceren (angiogeneses). Ook speelt HIF-1 $\alpha$  een rol bij uitzaaiing van kanker. Het lijkt er dus op dat mutatie van SDH subunits leidt tot een "oncogeen" signaal hoewel hierover nog veel verder onderzoek noodzakelijk is. Dat moet dan ook antwoord geven op de vraag waarom dit juist tot de vorming van paragangliomen leidt. Echter er zijn ook aanwijzingen dat de expressie van het SDH complex in maag-en darmcarcinomen verlaagd is met name bij de overgang naar een meer gevorderd stadium. Dit zou dus kunnen betekenen dat de 'succinaat signaal pathway' mogelijk een meer algemene rol speelt bij (de progressie) van kanker.

### Is SDHD een geïmprint gen?

De identificatie van SDHD, SDHB en SDHC als respectievelijk PGL1, PGL4 en PGL3 blijkt belangrijke consequenties te hebben voor het antwoord op de vraag hoe we het afwijkende overervingspatroon in de PGL1- (SDHD) en PGL2-gekoppelde families moeten verklaren. In tegenstelling tot SDHD- en PGL2-gekoppelde families, blijkt het overervingspatroon van paragangliomen in families met SDHB en SDHC mutaties wel het klassieke "autosomaal dominante" model. Dat betekent dat een foutieve copie van een gen van slechts één ouder doorgegeven hoeft te worden om te resulteren in een erfelijke stoomis. Daarentegen is het overervingspatroon van paragangliomen in families met

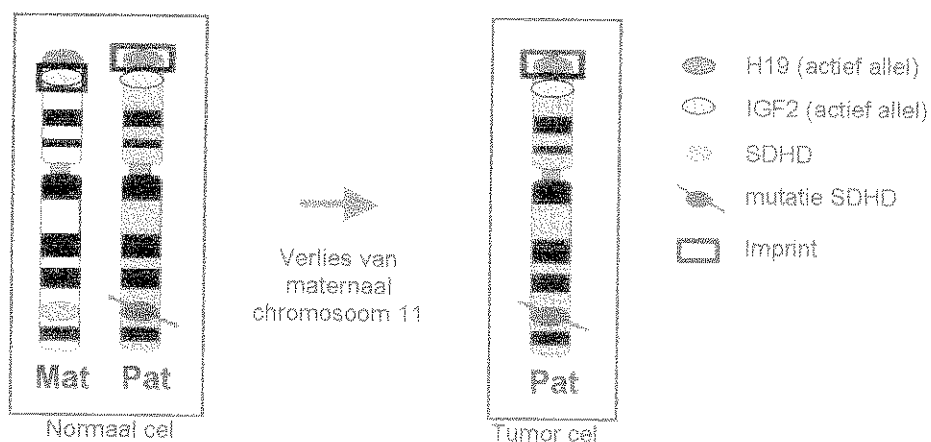


mutaties van SDHD en PGL2 heel bijzonder. Ook deze overerving is autosomaal dominant, maar alleen als de mutatie van de vader afkomt. (Mariman 5, van der mey 6) Wordt de mutatie door de moeder doorgegeven dan wordt er geen fenotype (ziekteverschijnselen) ontwikkeld (zie figuur 5). Dit lijkt overeen te komen met het fenomeen "imprinting". Imprinting is een mechanisme waarbij slechts één van de twee aanwezige ouderlijke kopieën (allelen) van een gen tot expressie komt. Bij paragangliomen is er echter nooit definitief bewijs gevonden voor imprinting van SDHD. Er zijn zelfs resultaten bevonden die het hele fenomeen "imprinting" tegenspreken (hensen7, mergetts8). Op dit moment is het nog steeds niet geheel duidelijk of de overerving van SDHD- en PGL2-gekoppelde families met HH-paragangliomen onderhevig is aan imprinting. Als dit het geval is valt dit moeilijk te rijmen met het feit dat SDHD een tumor suppressor gen is waarvan beide allelen geïnactiveerd zijn in tumoren. n.l. door de kiembaanmutatie en LOH. Dus imprinting speelt geen rol bij het inactiveren van SDHD.

Daarom is er een nieuwe hypothese ontwikkeld die het overervingspatroon mogelijk kan verklaren. Door het feit dat zowel SDHD en PGL2 op chromosoom 11 gelegen zijn kwamen we op het idee dat mogelijk, ook twee andere genen, welke wel onderhevig zijn aan imprinting, betrokken zijn bij de tumorvorming.

IGF2 is een gen, waarvan bekend is dat het betrokken is bij tumorgroei van andere soorten tumoren, en komt alleen tot expressie op het allel van de vader. Een tweede gen H19 komt alleen tot expressie op het allel van de moeder. Dit gen reguleert IGF2. Hoe meer H19, hoe minder IGF2.

Het mechanisme van tumorvorming zou kunnen zijn dat het verlies van H19, de "rem" op IGF2, leidt tot een overmaat aan IGF2. Dit kan alleen gebeuren als het allel afkomstig van de moeder verloren gaat. Daarnaast is een mutatie in SDHD nodig voor tumorgroei. Als deze mutatie via de moeder is doorgegeven, en samen met H19 verloren gaat in de tumor, blijft er een normaal of "gezond gen" aanwezig op het allel van de vader, wat niet zal leiden tot tumorgroei. Daarentegen, als de mutatie via de vader is doorgegeven, en het enige "gezond gen", die van de moeder, samen met H19 verloren gaat, ontstaat een situatie waarin een cel geen werkzaam SDHD of H19 meer heeft. Dus een overmaat aan IGF2 en gebrek aan SDHD kan leiden tot een situatie waarin tumorformatie kan plaatsvinden. Dit model voorspelt volledig verlies van de maternale (van de moeder afkomstige) kopie van chromosoom 11 in SDHD gekoppelde paragangliomen (zie figuur 6). Inderdaad hebben we dit met fluorescentie in situ hybridisatie op interfasekernen kunnen aantonen en deze resultaten zijn inmiddels ook door een andere groep is bevestigd (12:Riemann K)



Figuur 5: Nieuwe hypothese voor het overervingspatroon in paragangliomen

## **Diagnostiek:**

In de voorgaande delen van dit verhaal hebben we het gehad over het wetenschappelijk onderzoek dat nodig is om kennis te verkrijgen over deze ziekte. Op een bepaald moment zullen de successen in het lab zich naar de patiënt toe verhalen. Op zo'n moment wordt de klinisch-geneticus de belangrijkste schakel tussen fundamentele onderzoeksresultaten en de betekenis voor de patiënt. In de eerste contacten met een patiënt kijkt de klinisch-geneticus naar de familiegeschiedenis. Aan de hand daarvan wordt besloten of er pre-symptomatische DNA-diagnostiek wordt aangeboden, waarin een mutatiescreening plaatsvindt.

Al enkele jaren wordt in Leiden aan familieleden van HH paragangliomen patiënten de mogelijkheid geboden om zich te laten screenen op mutaties in SDHD, SDHB en SDHC. De afgelopen twee jaar is het duidelijk geworden dat mutaties in deze genen niet alleen tot HH paragangliomen kunnen leiden, maar ook een aanzienlijk deel van de gevallen van de verwante tumor pheochromocytoom kunnen verklaren. Het gevolg is dat nu een veel grotere groep patiënten in aanmerking komt voor SDH DNA-diagnostiek.

Als besloten wordt om over te gaan tot een mutatie-analyse worden er twee buizen bloed afgenomen en opgestuurd naar het DNA-diagnostisch laboratorium. Vervolgens vindt daar door middel van DNA sequencing een analyse van de SDH genen plaats. Zodra een mutatie wordt gevonden, zal dit worden bevestigd en zal de klinisch-geneticus hierover worden ingelicht.

Wanneer de patiënt lid is van een familie waar reeds een mutatie in is gevonden, dan zal er meteen een sequentie-analyse plaatsvinden op het desbetreffende gen.

Alle resultaten worden gecontroleerd door een klinisch-moleculair geneticus en vervolgens zal een uitslagbrief worden opgestuurd naar de behandelend arts. Meestal zal dit een klinisch-geneticus in het ziekenhuis zijn, die de uitslag vervolgens uitvoerig met de patiënt zal bespreken.

Met het toenemen van het aantal gevonden mutaties in de SDH genen is het belangrijk geworden om een overzicht te hebben van de aanwezige kennis, zowel voor de klinisch geneticus als voor fundamentele onderzoeker. Door middel van een nieuwe, via internet toegankelijke database die in Leiden is ontwikkeld, is het nu mogelijk geworden om alle mutaties in deze genen online te bekijken. Dit systematische overzicht heeft al geleid tot nieuwe inzichten in het mutatiepatroon van de SDH genen en zal in de toekomst een steeds belangrijker rol gaan spelen in dit onderzoeksveld.

## **Conclusies:**

In de afgelopen jaren zijn belangrijke successen geboekt in het onderzoek naar HH-paragangliomen, zowel qua inzicht in de genen en processen die kunnen leiden tot het ontstaan van deze tumor, als in de mogelijkheid tot het aanbieden van DNA-diagnostiek aan patiënten. Ondanks deze vooruitgang zijn er veel vragen die nog beantwoord moeten worden.

Het fenomeen van imprinting waaraan SDHD en PGL2 onderhevig zijn, roept veel vragen op en kan mogelijk leiden tot nieuwe inzichten in het samenspel tussen genen die gezamenlijk kunnen leiden tot het ontwikkelen van een tumor. Dit thema wordt steeds belangrijker in de hedendaagse genetica, en kan nieuw inzicht en kennis verschaffen binnen de genetica en mogelijk ver daarbuiten.

Daarnaast is de specifieke rol van SDH eiwitten in het proces van tumorvorming nog altijd niet ongehelderd. Al een halve eeuw heeft een aantal van de belangrijkste wetenschappers het vermoeden gehad dat het metabolisme de sleutel tot het begrijpen van kanker zou kunnen zijn. In 2000 werd duidelijk dat dit vermoeden gegrond was, maar er liggen nog altijd veel vragen die mogelijk ook inzicht zullen verschaffen over tumorvorming in het algemeen.

Uiteindelijk kunnen we concluderen dat ondanks het ogenschijnlijk exotische en zeldzame karakter van deze tumoren, de genetische en functionele kennis die de afgelopen jaren is bereikt, ook betekenis kan hebben buiten het directe onderzoeksveld en nieuw inzicht kan geven in een volkomen nieuwe en tot voor kort niet vermoede weg naar het ontstaan van kanker.

#### Dankbetuiging:

Graag wil ik Dr.JP. Bayley, Dr. P. Taschner, Prof. P. Devilee en Prof. C. Cornelisse bedanken voor voor de vorm die dit project door hun inzicht en inzet gekregen heeft. Ook wil ik allen bedanken voor de adviezen bij het schrijven van dit artikel.

#### Literatuur:

1. Scheffer IE: Molecular genetics of succinate: quinone oxidoreductase in eukaryotes. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol* 1998, 60, 267-315
2. Baysal BE ea.: Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 2000, 287, 848-851
3. Niemann S ea: Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nature Genet* 2000, 26, 268-270
4. Astuti D ea: Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet* 2001, 69, 49-54
5. Mariman E ea: Fine mapping of a putatively imprinted gene for familial non-chromaffin paragangliomas to chromosome 11q13.1: Evidence for genetic heterogeneity. *Hum Genet* 1995, 95, 56-62
6. Van der Mey A ea: Genomic imprinting in hereditary glomus tumors: evidence for new genetic theory. *The Lancet* 1989, 2, 1291-1294
7. Hensen EF ea: Somatic loss of maternal chromosome 11 causes parent-of-origin-dependent inheritance in SDHD-linked paraganglioma and pheochromocytoma families. *Oncogene* 2004, 23, 4076-83
8. Margetts CD ea: Epigenetic analysis of HIC1, CASP8, FLIP, TSP1, DCR1, DCR2, DR4, DR5, KvDMR1, H19 and preferential 11p15.5 maternal-allele loss in von Hippel-Lindau and sporadic pheochromocytomas. *Endocr Relat Cancer* 2005, 12, 161-72.
9. Heutink P ea: A gene subject to genomic imprinting and responsible for hereditary paragangliomas maps to chromosome 11q23-qter. *Hum Mol Genet.* 1992, 1, 7-10.
10. Neumann HP ea: Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA.* 2004, 292:943-951

11. Dannenberg H ea: Clinical characteristics of pheochromocytoma patients with germline mutations in SDHD. J Clin Oncol. 2005, 23, 1894-1901.
12. Riemann K ea: Chromosome 11 monosomy in conjunction with a mutated SDHD initiation codon in nonfamilial paraganglioma cases. Cancer Genet Cytogenet. 2004, 150, 128-135

#### **De auteur**

Ivonne van Minderhout is research analist en is werkzaam op de afdeling Humane en Klinische Genetica in het Leids Universitair Medisch Centrum. Zij is nu 6 jaar met het onderzoek voor hoofd-hals-paragangliomen bezig.