



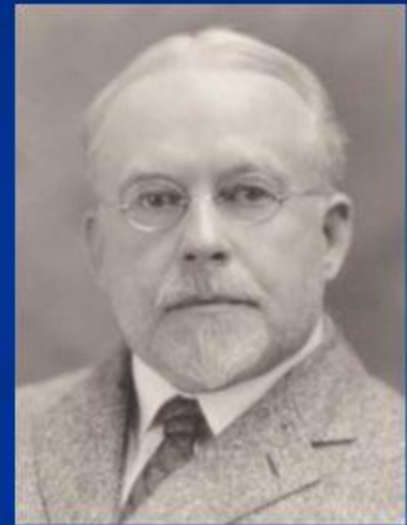
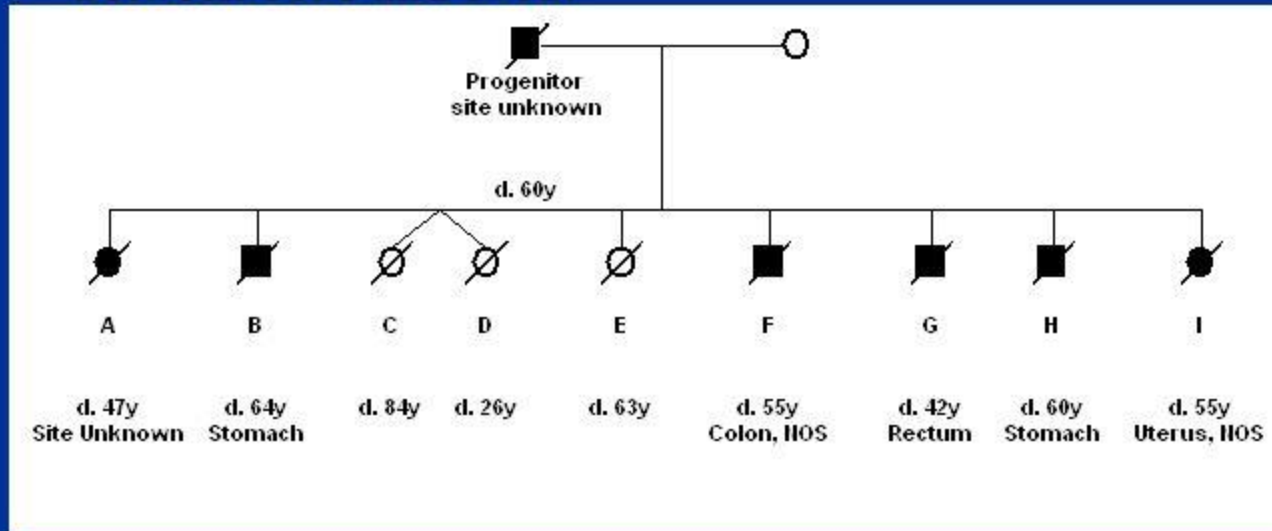
# Speuren naar LYNCH

MMr eiwitten op  
endometriumcarcinomen

- Wat is Lynch, hoe kan de diagnose gesteld worden?
- Wat kunnen we aan bevindingen verwachten als we MMr uitvoeren op alle endometriumcarcinomen <70?
- Overwegingen. Waarom? Hoe?

# Lynch Syndrome in Family “G”

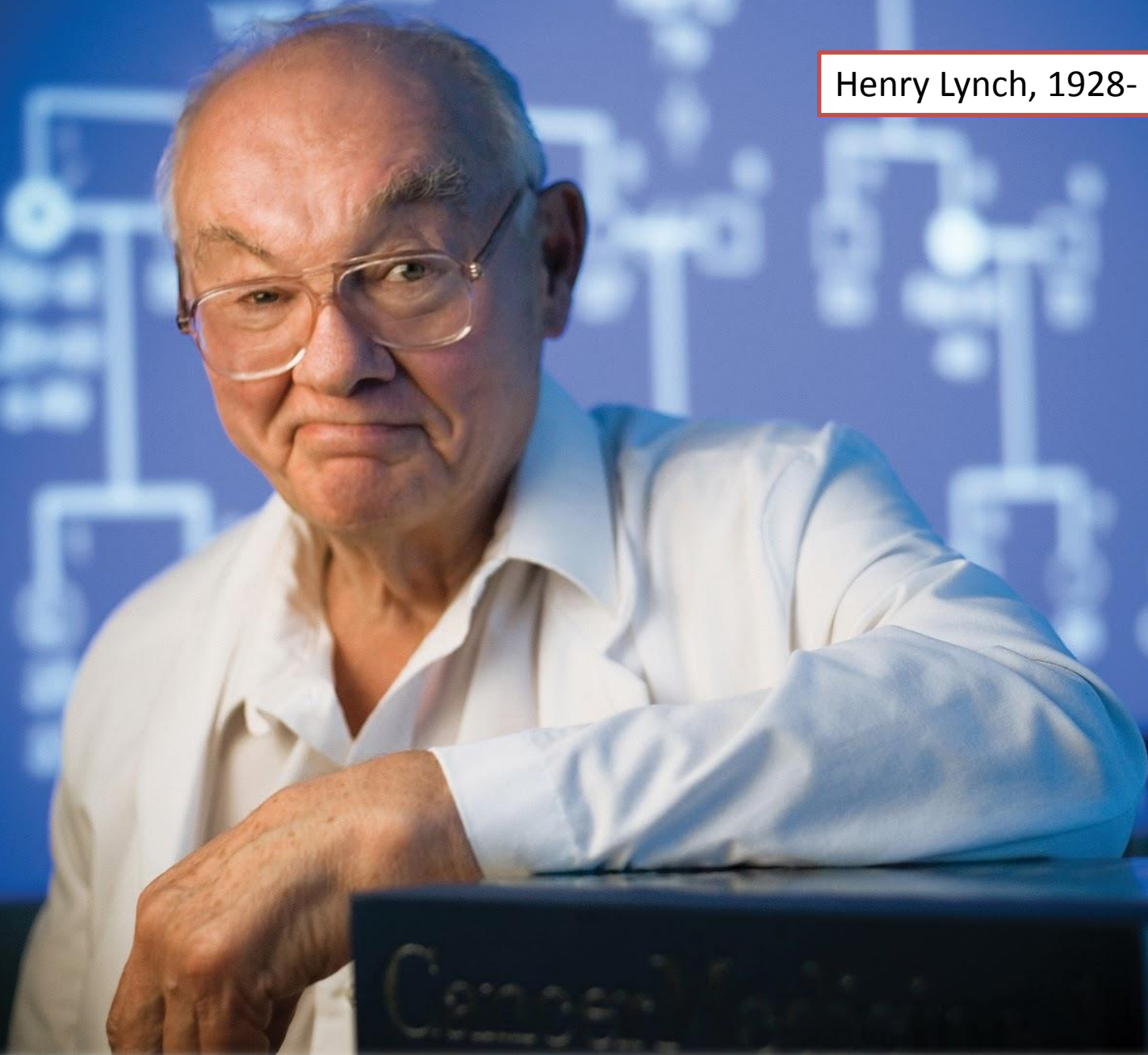
- Dr. Aldred Scott Warthin, MD, PhD described “Family G” in a 1913 publication based on records ascertained from the University of Michigan hospitals between 1895 and 1913.



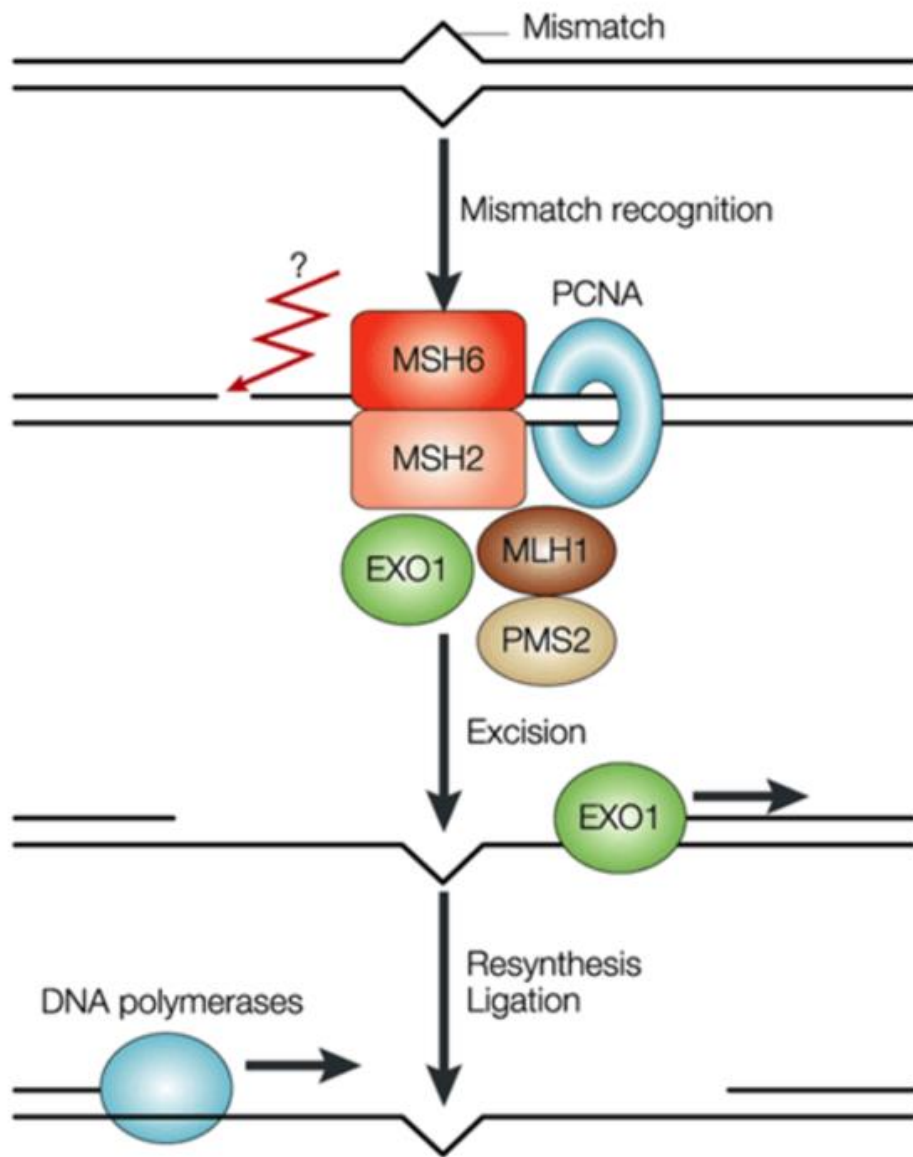
Douglas et al. (2005) History of Molecular Genetics of Lynch Syndrome in Family G; JAMA; Vol. 294 (17), 2195-2202

“Of the 48 descendants of the cancerous grandfather, 17 have died or been operated on for cancer. The preponderance of carcinoma of the uterus (ten cases) and of the stomach (seven cases) is very striking in the family history” Dr. Warthin, 1913.

Henry Lynch, 1928-



- HNPCC (HEREDITARY NON-POLYPOSIS COLORECTAL CANCER)
- LYNCH
- In 1990's MMr pathway vastgesteld
- NU: Aanwezigheid van een kiemlijndefect voorwaarde voor diagnose Lynch!



# MMR eiwitten/genen betrokken bij LYNCH

- MLH1 mutL homologue 1
- MSH2 mut S homologue 2
- MSH6 mutS homologue 6
- PMS2 postmeiotic segregation increased 2
- (EPCAM epithelial cell adhesion molecule): epigenetische silencing MSH2
  
- MLH1 en MSH2 mutaties in ongeveer 85 % Lynch patienten (US)
- MSH6 10% (relatief vaker bij endometriumcarcinoom patientes)
- PMS2 5%

# MMr kiemlijnmutatie

- Een allel in alle lichaamscellen gemuteerd, MMr functioneert nog door gezond tweede allel
- Bij mutatie of de-activatie andere allel uitval MMr-eiwit(ten)
- Dit leidt tot verhoogde kans optreden nieuwe mutaties en het ontstaan van maligniteit.



# Sporadische MMr uitval

- Sporadische uitval van MMr mechanisme door hypermethylering van het promotorgen van MLH1.
- MLH1 en PMS2 negatief bij immunohistochemie
- In dit geval dus abnormale expressie van MMr eiwitten maar GEEN Lynch
- Vast te stellen door hypermethyleringstest (UMCG).

- Zowel bij sporadische MMr uitval als bij Lynch microsatellietinstabiliteit, vast te stellen met MSI test (MSI-high)

# Risico's bij lynch

- Kans op CRC voor 70<sup>e</sup> levensjaar 25-70 % (mogelijk hoger bij mannen dan vrouwen)
- Kans op EC voor 70<sup>e</sup> levensjaar 15-55 %
- Geschatte risico's onzeker, penetrantie verschilt per familie
- Andere Lynch geassocieerde tumoren: dunne darm, maag, ovarium, nierbekken, ureter, CZS, 1-15%, afhankelijk van tumortype
- (Muir Torre: talgkliertumoren en keratoacanthomen)

# Frequentie van LYNCH bij CRC en EC

- Lynch verantwoordelijk voor ongeveer 3 % van colonkanker en 3 % van endometriumkanker

# Gemiddelde leeftijd

- MLH1 mutatie: CRC 41-47 EC 59
- MSH2 mutatie: CRC 50-54 EC 59
- MSH6 mutatie: CRC 50-54 EC 54

# “Testen”

- Clinicopathologische criteria (Revised Bethesda Guidelines). Weinig sensitief, mist waarschijnlijk 50 %
- MSI. Sensitief, maar mist soms MSH 6 mutaties. Bovendien is hypermethylatietest nodig om sporadische gevallen op te sporen, en geeft de test geen informatie over in welk gen de mutatie moet worden gezocht.
- MMr eitwitexpressie, zonodig aangevuld met hypermethylatie test. (bij MLH1/PMS2 negatieve aankleuring) Sensitief 90% (?). Positief voorspellende waarde?
- DNA onderzoek op kiemlijnmutaties. Duur!!

# revised Bethesda

Tumors from individuals should be tested for MSI in the following situations:

1. Colorectal cancer diagnosed in a patient who is less than 50 years of age
2. Presence of synchronous, metachronous colorectal or other HNPCC-associated tumors,\* regardless of age
3. Colorectal cancer with the MSI-high histology‡ diagnosed in a patient who is less than 60 years of age
4. Colorectal cancer diagnosed in one or more first-degree relatives with an HNPCC-related tumor,\* with one of the cancers being diagnosed under age 50 years
5. Colorectal cancer diagnosed in two or more first- or second-degree relatives with HNPCC-related tumors, regardless of age

\* HNPCC-related tumors include colorectal, endometrial, gastric, ovarian, pancreatic, ureter/ renal pelvis, biliary tract and brain (usually glioblastoma as seen in Turcot syndrome) tumors, sebaceous gland adenomas and keratoacanthomas in Muir-Torre syndrome, and carcinoma of the small bowel.

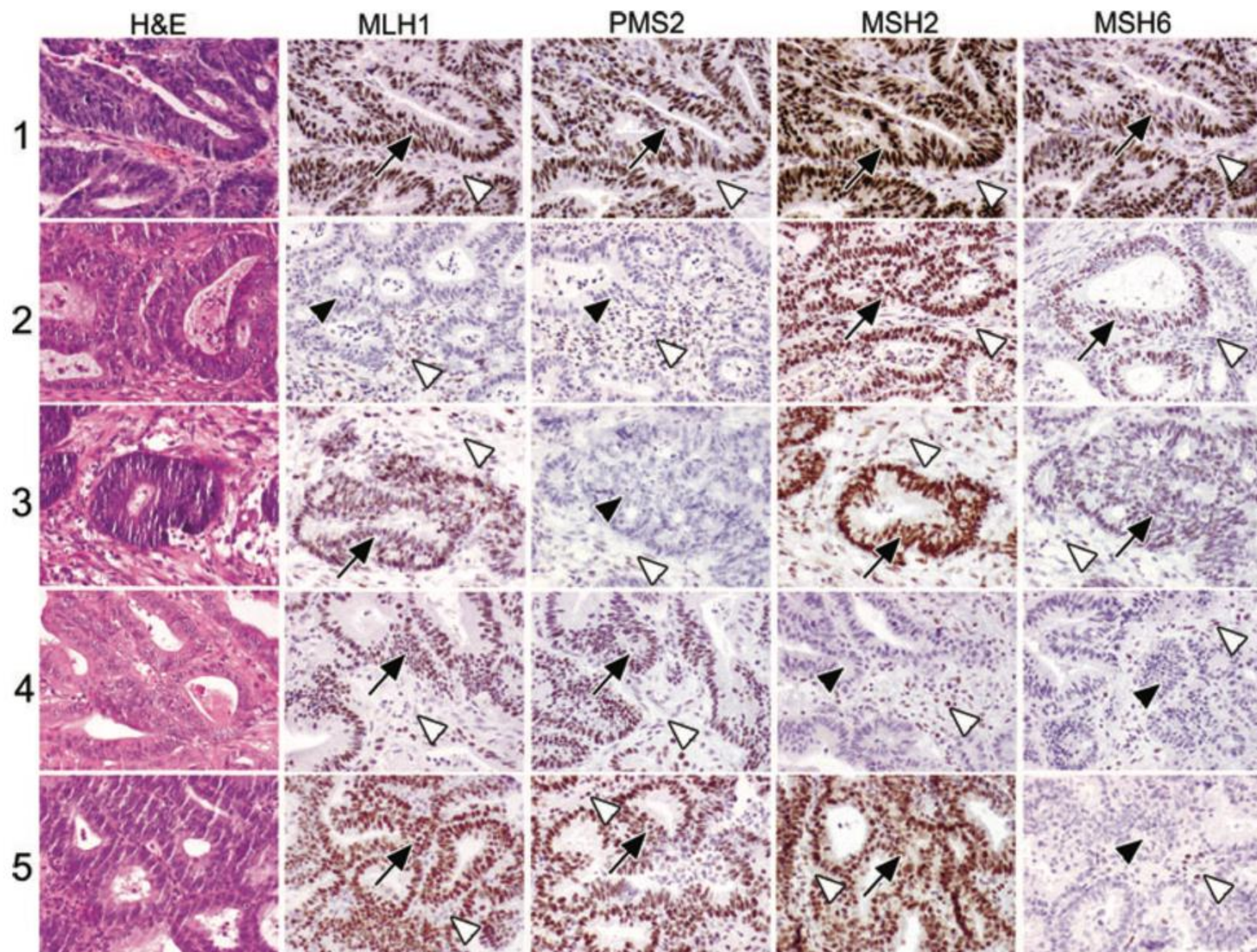
‡Presence of tumor infiltrating lymphocytes, Crohn's-like lymphocytic reaction, mucinous/signet-ring differentiation or medullary growth pattern.

Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P., Syngal, S., de la Chapelle, A., Ruschoff, J., et al. (2004). Revised Bethesda Guidelines for

# Microscopische kenmerken

- Colon:
- Crohn's like lymfocyttaire reactie, medullair groei patroon, mucineuze of zegelringdifferentiatie
- Endometrium:
- Zowel type 1 (alle graden) als type 2
- Gemengde tumorhistologie, gededifferentieerde component in de tumor, tumor infiltrating lymphocytes, Crohn's like features
- Involvement LUS (lower uterine segment)
- Diepe myometriuminvasie bij goed gedifferentieerde tumor
- Ovarium: met name endometroïde tumoren en clearcell carcinomen





**Fig. 3** Five CRC cases; haematoxylin and eosin staining and MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6 immunohistochemistry (IHC) results. Case 1: normal IHC in the tumour cells. Case 2: absence of MLH1 and PMS2 in the tumour cells. Case 3: absence of PMS2 in the tumour cells. Case 4: absence of MSH2 and MSH6 in the tumour cells. Case 5: absence of MSH6 in the tumour cells. Arrows point to IHC<sup>+</sup> tumour cells, filled arrow heads point to IHC<sup>-</sup> tumour cells and open arrow heads point to IHC<sup>+</sup> stromal cells.

# Positief? Negatief?

- Positieve test betekent geen kernaankleuring
- Negatieve test betekent wel kernaankleuring
- Vals positieve test betekent ten onrechte geen kernaankleuring
- Vals negatieve test betekent kernaankleuring terwijl er wel sprake is van Lynch

# Beoordeling mmr immuno

- Goede fixatie belangrijk
- Niet beoordelen in precursorlaesies
- Interne controle nodig (normaal epitheel, stroma)
- Normaal: kernaankleuring in in ieder geval een deel van de tumorkernen
- Afwijkend: geen kernaankleuring of dotlike aankleuring of alleen aankleuring langs kernmembraan of cytoplasmatische aankleuring
- Dubieus: aankleuring zwak, lichter dan in interne controle



Wat kunnen we verwachten van de  
MMr immunohistochemie bij  
universele testing  
endometriumcarcinomen?



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Gynecologic Oncology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ygyno](http://www.elsevier.com/locate/ygyno)



### Prospective evaluation of molecular screening for Lynch syndrome in patients with endometrial cancer $\leq 70$ years <sup>☆, ☆, ☆, ☆</sup>

Celine H.M. Leenen <sup>a,\*</sup>, Margot G.F. van Lier <sup>a,1</sup>, Helena C. van Doorn <sup>b,1</sup>, Monique E. van Leerdam <sup>a,1</sup>, Sjarlot G. Kooi <sup>c,1</sup>, Judith de Waard <sup>d,1</sup>, Robert F. Hoedemaeker <sup>e,1</sup>, Ans M.W. van den Ouweland <sup>f,1</sup>, Sanne M. Hulspas <sup>g,1</sup>, Hendrikus J. Dubbink <sup>g,1</sup>, Ernst J. Kuipers <sup>a,h,1</sup>, Anja Wagner <sup>f,1</sup>, Winand N.M. Dinjens <sup>g,1,2</sup>, Ewout W. Steyerberg <sup>i,1,2</sup>

<sup>a</sup> Department of Gastroenterology and Hepatology, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

<sup>b</sup> Department of Gynaecology, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

<sup>c</sup> Department of Gynaecology, Albert Schweitzer Ziekenhuis, Dordrecht, The Netherlands

<sup>d</sup> Department of Gynaecology, Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam, The Netherlands

<sup>e</sup> Pathology Laboratory Pathan, Rotterdam, The Netherlands

<sup>f</sup> Department of Clinical Genetics, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

<sup>g</sup> Department of Pathology, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

<sup>h</sup> Department of Internal Medicine, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

<sup>i</sup> Department of Public Health, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 9 November 2011

Accepted 25 January 2012

Available online 1 February 2012

##### Keywords:

Microsatellite instability

Immunohistochemistry

Lynch syndrome

Endometrial cancer

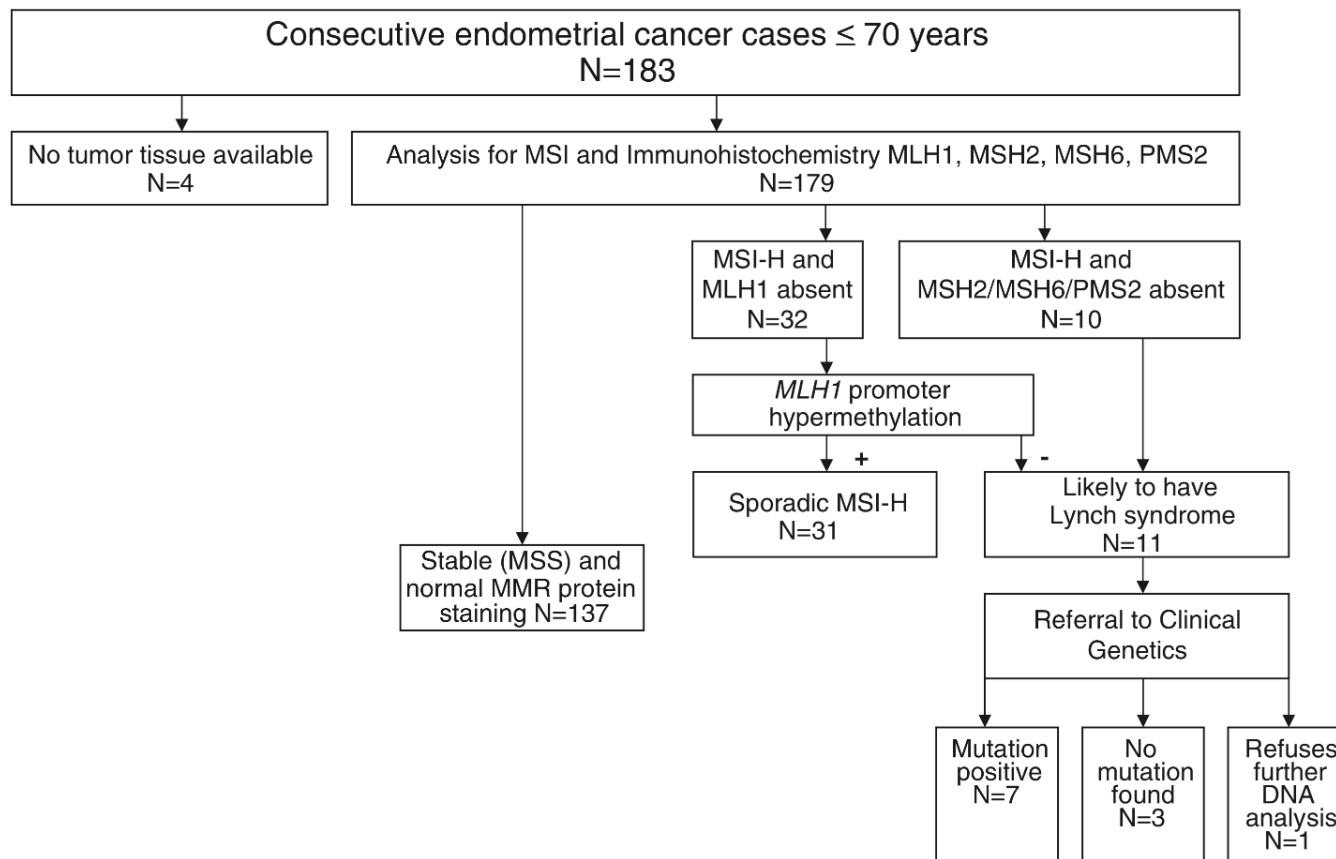
Hereditary cancer

#### ABSTRACT

**Objective.** Lynch syndrome (LS) is a hereditary syndrome that predisposes to multiple malignancies including endometrial cancer (EC). We aimed to evaluate a diagnostic strategy for LS based on routine analysis of microsatellite instability (MSI) and immunohistochemical (IHC) staining for mismatch repair (MMR) proteins in tumour tissue of all newly diagnosed EC patients  $\leq 70$  years.

**Methods.** Consecutive EC patients  $\leq 70$  years were included prospectively in eight Dutch centres. EC specimens were analysed for MSI, IHC of four MMR proteins, MMR gene methylation status and *BRAF*-mutations. tumours were classified as; 1) likely to be caused by LS, 2) sporadic MSI-H, or 3) microsatellite stable (MSS).

**Results.** Tumour specimens of 179 patients (median age 61 years, IQR 57–66) were analysed. In our study 92% of included patients were over 50 years of age. Eleven EC patients were found likely to have LS (6%; 95% CI 3–11%), including 1 patient suspected of an *MLH1*, 2 of an *MSH2*, 6 of an *MSH6* and 2 of a *PMS2* gene defect. Germline mutation analyses revealed 7 MMR gene germline mutations. Ten patients likely to have LS (92%)



**Fig. 1.** Flow diagram of the diagnostic strategy and results of molecular analyses. MSI = microsatellite instability, MSI-H = MSI-high, IHC = immunohistochemistry.

performed by bi-directional cycle-sequencing of PCR-amplified fragments, using a previously described method [18].

#### Germline mutation analysis

Analyses of MSI in combination with IHC revealed patients likely

tumour tissues were found to be grade 1 (73 patients, 41%). Histology showed tumour confined to the uterus in 126 tumour specimens (70%, i.e. T1) (Table 1).

#### Molecular analyses

the department of clinical genetics and ten patients underwent germline analyses. One patient refused germline DNA mutation analysis, due to religious considerations.

Germline mutation analyses revealed in six patients an *MSH6* mutation and in one patient a *PMS2* mutation. Of these, two families were already known to have LS and were blindly included for the molecular analyses. In both cases the MMR protein of the known involved MMR gene mutation was absent in IHC. In three patients whose tumour tissues showed MSI and absence of one or more MMR proteins, DNA mutation analysis of the corresponding genes in these patients was negative.

Nine of eleven referred patients (82%) did not fulfil the Amsterdam II criteria. Three patients (27%) did fulfil the revised Bethesda guidelines (Table 2).

tion of LS in EC patients is of great importance since these patients are at high risk for synchronous carcinomas, especially CRC. Moreover, the diagnosis of LS is of importance to relatives. EC patients with LS and their family members harbouring an MMR gene mutation can enter surveillance programmes which have been proven to reduce CRC morbidity and mortality by 65–70% [11–13]. For female LS carriers gynaecologic surveillance programmes, including endometrial biopsy and transvaginal ultrasound, are available. However, gynaecological surveillance is currently based on expert opinion since no controlled trials have been published on the effectiveness of surveillance [20]. Instead of surveillance, prophylactic surgery can be considered after childbearing has been completed, as this may prevent endometrial and ovarian carcinoma effectively [21].

**Table 2**  
Characteristics of the eleven EC patients likely to have LS.

Patient no.	Age at diagnosis	Histology	Grade	Criteria		MSI No. of positive markers	IHC Absent MMR protein	Germline analysis	Mutation
				AC	rBC				
1	58	Endometrioid adenocarcinoma	2	No	No	5/5	MSH2/MSH6	Yes	No mutation in <i>MSH2</i> and <i>MSH6</i>
2	53	Endometrioid adenocarcinoma	3	No	No	5/5	MSH2/MSH6	Yes	No mutation in <i>MSH2</i> and <i>MSH6</i>
3	62	Endometrioid adenocarcinoma	2	No	No	5/5	MSH6	Yes	c.3173-2A>C p.? ( <i>MSH6</i> , exon 5)
4	59	Endometrioid adenocarcinoma	NA	No	Yes	5/5	MSH6	Yes	Known LS family: c.467 C>G p.Ser156X ( <i>MSH6</i> exon 3)
5	62	Endometrioid adenocarcinoma	3	No	No	5/5	MSH6	Yes	c.467 C>G p.Ser156X ( <i>MSH6</i> exon 3)
6	69	Mixed adenocarcinoma	3	No	No	3/5	PMS2	Yes	No mutation in <i>PMS2</i>
7	52	Endometrioid adenocarcinoma	1	No	No	3/5	MSH6	Yes	c.3173-452_3556 + 209del2269 ( <i>MSH6</i> exon 5–6)
8	53	Endometrioid adenocarcinoma	2	Yes	Yes	4/5	MSH6	Yes	c.467 C>G p.Ser156X ( <i>MSH6</i> )
9	66	Endometrioid adenocarcinoma	1	No	No	3/5	MLH1/PMS2 <sup>a</sup>	ND: declines DNA analysis	NA
10	69	Endometrioid adenocarcinoma	2	No	No	5/5	PMS2	Yes	c.219_220dup, p.Gly74ValfsX3 ( <i>PMS2</i> )
11	48	Clear cell adenocarcinoma	3	Yes	Yes	4/5	MSH6	Yes	Known LS family: c.1784delT p.Leu595fs ( <i>MSH6</i> , exon 4)

rBC = revised Bethesda Guidelines, AC = Amsterdam Criteria II, MSI = Analysis of microsatellite instability, IHC = Immunohistochemistry, NA = not available, ND = not done.

<sup>a</sup> Additional analysis showed absence of *MLH1* promoter hypermethylation.

7 van de 10 Lynch (6MSH6, 1PMS2)  
3 van de 7 voldeed aan rBC



# Cost effectiveness of routine screening for Lynch syndrome in endometrial cancer patients up to 70 years of age, Spaander et al., Gyn. Onc. December 2016

## METHODS

Consecutive EC patients  $\leq 70$  years of age were screened for LS by analysis of microsatellite instability, immunohistochemistry and *MLH1* hypermethylation. Costs and health benefit in life years gained (LYG) included surveillance for LS carriers among EC patients and relatives. We calculated incremental cost-effectiveness ratios (ICERs) comparing LS screening among EC patients  $\leq 70$  years with  $\leq 50$  years and the revised Bethesda guidelines.

## Results

Screening for LS in 179 EC patients identified 7 LS carriers; 1 was  $\leq 50$  and 6 were 51-70 years. Per age category 18 and 9 relatives were identified as LS carrier. Screening resulted in 74,7 LYG (45,4 and 29,3 LYG per age category). The ICER for LS screening in EC patients  $\leq 70$  compared with  $\leq 50$  years was €5,252/LYG. The revised Bethesda guidelines missed 4/7 (57%) LS carriers among EC patients. The ICER for LS screening in EC patients  $\leq 70$  years of age compared with the revised Bethesda guidelines was €6,668/LYG. Both ICERs remained  $< €16,000$ /LYG in sensitivity analyses.

## Conclusion

Routine LS screening in EC patients  $\leq 70$  years is a cost-effective strategy, allowing colorectal cancer prevention in EC patients and their relatives.



# Richtlijn erfelijke darmkanker december 2015

- Advies:
- Bepaling MMr met evt aanvullend hypermethyleringstest bij ALLE CRC en EC <70 jaar.
- Indien afwijkende MMr eiwitten advies tot verwijzing naar klinisch geneticus voor onderzoek op kiemlijnmutaties.
- Standaardadviezen aan verslag toevoegen

# Surveillance bij diagnose LYNCH

- Coloscopie 1 x per 2 jaar, te starten vanaf 25 jaar
- Bij colona uitgebreidere chirurgie
- Transvaginale echoscopie en afname endometriumsample 1 x per jaar van 40-60 jaar.
- Eventueel >40 jr prophylactische hysterosalpingoophorectomie
- Eenmalige test op aanwezigheid helicobacter

# OVERWEGINGEN mbt universeel (<70) MMr testen

- Het staat in de richtlijnen erfelijke darmkanker (Is dit voor ons bindend?)
- Wat is het doel: ten bate van patiente? Ten bate van familie?

# Voor patiënte zelf?

- (geschat door Magda)
- 15% afwijkende eiwitten
- 6% afwijkende eiwitten zonder hypermethylering MLH1 promotor: advies verwijzing klinische genetica
- 5% besluit zich te laten verwijzen naar klinisch geneticus
- 2,5% heeft kiembaanmutatie
- 1 % had ook al doorverwezen kunnen worden op basis van familieanamnese/leeftijd
- 1,5% extra gevonden op basis van screening op mmr
- 0,3% overlijdt sowieso aan zijn/haar EC
- 1,2% kan baat hebben bij surveillance voor CRC
- 0,4% ontwikkelt een maligniteit in het colon, deels zullen deze tussen de surveillanceronden ontstaan (intervalkankers), deels zouden deze ook vroegtijdig ontdekt zijn door BVO darmkanker
- 0,2% wordt eerder ontdekt of voorkomen door de surveillance
- 0,1% zou echter ook overleven indien het carcinoom buiten de surveillance was ontstaan.
- 0,1 % gered door screening op MMr eiwitten
- 1 op 1000 patientes gered, 1000 patientes screenen om 1 te redden
- Bij 50 endometriumcarcinomen <70 per jaar dus 20 jaar screenen

# VOOR FAMILIELEDEN?

- Incidentie van Lynch (Hampell, la Chapelle 2011), US
- 2,8 % van de CRC zijn gevolg van Lynch
- Life time risk CRC in gehele populatie 5 %
- 50% van Lynch patienten krijgt CRC
  
- Incidentie is  $0,028 \times 0,05 \times 2 = 0,0028$  (1:370)
- In Amerika zou het gaan om 829000 mensen
  
- (In Nederland zou het gaan om 45000 mensen)

Lynch Syndrome is  
not a rare condition  
but rather an  
extremely  
under diagnosed  
one.





# Practische overwegingen

- Doen we de kleuringen op curettement of op hysterectomiepreparaat?
- Hoe verslaan we onze bevindingen?
- Wie doet de beoordelingen?
- Wat doen we bij moeilijk te interpreteren resultaten?

# Curettement/biopt of resectie ??

- Bij voorkeur op biopt/curettement (fixatie!)
- Echter alleen tumor beoordelen, geen voorstadia
- Indien hypermethyleringstest nodig: ook niet tumoreus controleweefsel nodig!

# VERSLAAN VAN DE BEVINDINGEN

- Adviezen conform colonca toevoegen
- (Kan nog niet protocolair op biopten/curettementen)

de mismatch repair eiwit immunohistochemie uitslag door de patholoog wordt geadviseerd onderstaande teksten te gebruiken in de conclusie:

#### Normale kernkleuring van MLH1, PMS2, MSH2 en MSH6

##### *CRC of endometriumcarcinoom <40 jaar*

De aanwezigheid van MLH1, PMS2, MSH2 en MSH6 in de tumorcelkernen maakt de kans op Lynch syndroom (de meest voorkomende vorm van erfelijke darmkanker) klein. Desondanks is de jonge diagnoseleeftijd reden om nader onderzoek naar aanleg voor erfelijke darmkanker en daarmee verwijzing naar een klinisch geneticus te overwegen.

##### *CRC of endometriumcarcinoom >40 jaar; <70 jaar*

De aanwezigheid van MLH1, PMS2, MSH2 en MSH6 in de tumorcelkernen maakt de kans op Lynch syndroom (de meest voorkomende vorm van erfelijke darmkanker) klein. Desondanks kan er reden zijn verwijzing naar een klinisch geneticus te overwegen wanneer de familieanamnese hier aanleiding toe geeft of wanneer er sprake is van polyposis.

#### Afwezigheid kernkleuring MSH2 en MSH6, alleen MSH6 of alleen PMS2

##### *CRC of endometriumcarcinoom <70 jaar*

De afwezigheid van MSH6 / PMS2 / MSH2 en MSH6\* in de tumorcelkernen maakt het ontstaan van de tumor als gevolg van een defect in de DNA mismatch repair waarschijnlijk en is reden om nader onderzoek naar aanleg voor erfelijke darmkanker en daarmee verwijzing naar een klinisch geneticus te overwegen.

#### Afwezigheid kernkleuring MLH1 en PMS2

##### *CRC of endometriumcarcinoom <40 jaar*

De afwezigheid van MLH1 en PMS2 in de tumorcelkernen maakt het ontstaan van de tumor als gevolg van een defect in de DNA mismatch repair waarschijnlijk en is reden om nader onderzoek naar aanleg voor erfelijke darmkanker en daarmee verwijzing naar een klinisch geneticus te overwegen.

##### *CRC of endometriumcarcinoom >40 jaar; <70 jaar*

De afwezigheid van MLH1 en PMS2 in de tumorcelkernen maakt het ontstaan van de tumor als gevolg van een defect in de DNA mismatch repair waarschijnlijk. De tumor zal worden onderzocht op hypermethylering van de *MLH1* promotor. De uitslag van deze analyse volgt.

##### *Hypermethylering afwezig*

# Wie beoordeelt de MMr

Aandachtspathologen.

# Wat te doen bij moeilijke interpretatie?

- Herhalen op hysterectomiepreparaat , evt.
- consult UMCG met MSI ?

# MZH

- Schatting;
- 60 x MMr per jaar op EC
- 10 x afwijkend profiel
- 7 x hypermethyleringstest nodig
- 4 x advies tot doorverwijzing

join us





