



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Translational molecular pathology of myxoid liposarcoma and leiomyosarcoma of soft tissue

Graaff, M.A. de

Citation

Graaff, M. A. de. (2017, February 7). *Translational molecular pathology of myxoid liposarcoma and leiomyosarcoma of soft tissue*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/45811>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/45811>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/45811> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Graaff, M.A. de

Title: Translational molecular pathology of myxoid liposarcoma and leiomyosarcoma of soft tissue

Issue Date: 2017-02-07

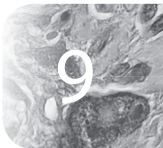
Chapter 9

Nederlandse samenvatting

Nederlandse samenvatting

Sarcomen vormen een heterogene groep maligne tumoren die uit gaan van mesenchymale of neuroectodermale weefsels, zoals bot, kraakbeen, glad en dwarsgestreept spierweefsel, vet, endotheel en zenuwweefsel. Ondanks dat sarcomen verantwoordelijk zijn voor minder dan 1% van alle maligniteiten, zijn er inmiddels meer dan 50 verschillende histologische subtypes beschreven. De verschillende sarcomen worden gekenmerkt door hun verschillen in klinische presentatie, hun sterk uiteenlopende biologische gedrag en prognose. Een correcte diagnose is dan ook uiterst belangrijk voor het kiezen van de optimale behandelstrategie. Het stellen van de juiste diagnose wordt door veel pathologen als lastig ervaren omdat sarcomen zeldzaam zijn en door het grote aantal verschillende subtypes. Daarnaast hebben sommige tumoren meerdere overlappende histopathologische kenmerken. De World Health Organisation (WHO) heeft een internationale consensus richtlijn opgesteld voor de classificatie van bot- en wekedelentumoren die handvaten biedt bij het stellen van de juiste diagnose. Geadviseerd wordt om patiënten met (verdenking op) een mesenchymale tumor te verwijzen naar een gespecialiseerd centrum waar een multidisciplinair team betrokken is bij de diagnostiek en behandeling van deze patiënten. Hier werken gespecialiseerde oncologisch chirurgen, orthopeden, radiologen, oncologen, radiotherapeuten en pathologen nauw samen. Sarcomen zijn bij uitstek tumoren waarbij niet alleen de histologie en moleculaire diagnostiek van belang zijn, maar ook het klinisch beeld, zoals de leeftijd van presentatie en het radiologisch beeld van de verschillende tumoren dienen bij het maken van de differentiaal diagnose meegenomen te worden in de overweging.

De groep van bot- en wekedelentumoren kan op basis van hun biologisch gedrag worden onderverdeeld in vier subgroepen, namelijk benigne, lokaal agressief, zelden metastaserend en maligne. Een bekend voorbeeld van een benigne tumor is een lipoom, een goedaardige vettumor, histologisch opgebouwd uit mature adipocyten. Dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP) is een wekedelentumor die op de plaats waar deze ontstaat vooral schade veroorzaakt door zijn lokaal destructieve groei waardoor chirurgische resectie met tumorvrije marges moeilijk te bereiken kan zijn. Tijdige herkenning, diagnose en instellen van de goede behandeling is van groot belang bij sarcomen, omdat sommige subtypen een slechte prognose hebben. Bij de

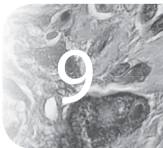


diagnostiek is de histomorfologie van de tumor van belang, daarnaast kan immuunhistochemisch onderzoek bij met name de wekedelentumoren bijdragend zijn, omdat hiermee de differentiatielijns van de tumor vaak kan worden aangetoond. Zo zijn er bijvoorbeeld markers voor zenuw-, vaat- en spierdifferentiatie. Daarnaast is moleculair genetisch onderzoek in sommige gevallen van groot belang omdat van de 117 verschillende benigne en maligne wekedelentumoren die zijn beschreven in de WHO er 49% een unieke/specifieke genetische of moleculaire afwijking heeft.

Op basis van de genetische achtergrond kunnen sarcomen ingedeeld worden in drie hoofdgroepen, te weten tumoren met een specifieke genetische verandering op het niveau van één gen, zoals *KIT* mutaties in gastro-intestinale stromaceltumoren, tumoren met een karakteristieke chromosomale translocatie en een verder normaal karyotype, zoals de *FUS-DDIT3* translocatie in myxoid liposarcomen en de laatste groep bestaat uit tumoren met een complex karyotype zonder een terugkerende specifieke afwijking, zoals leiomyosarcomen. De ontdekking van specifieke afwijkingen in tumoren op niveau van het DNA heeft in sommige gevallen bijgedragen tot een begrip van het pathologische mechanisme wat leidt tot ongeremde celdeling en dus tumorgroei. Ook draagt het bij aan de diagnostiek van deze tumoren omdat met verscheidene moleculaire technieken de pathognomonische DNA afwijking vastgesteld kan worden. Zo kunnen mutaties in hot-spot gebieden met verschillende sequencetechnieken snel in kaart gebracht worden en fusieproducten van translocaties kunnen aangetoond worden door middel van fluorescentie *in situ* hybridisatie (FISH) of q-PCR van het fusieproduct. Ook is er onderzoek gaande naar het ontwikkelen van medicijnen die speciaal gericht zijn tegen de genetische afwijking in sommige tumoren en op die wijze mogelijk kunnen leiden tot een nieuwe therapeutische optie die bij de behandeling van patiënten toegepast kan worden.

Dit proefschrift richt zich op twee verschillende wekedelensarcomen, het myxoid liposarcoom en het leiomyosarcoom van de wekedelen. Wekedelen leiomyosarcomen tonen gladde spierceldifferentiatie en zijn verantwoordelijk voor ongeveer 10 tot 20% van de wekedelensarcomen. De tumoren komen het vaakst voor in de 5^{de} en 6^{de} decade en zijn iets frequenter bij vrouwen dan bij mannen. Op basis van de locatie kunnen deze tumoren verder worden verdeeld in vijf groepen, te weten gladde spierceltumoren van de diepe wekedelen, het retroperitoneum, de uterus, de bloedvaten en de superficiële

dermis. In dit proefschrift worden de leiomyosarcomen van de wekedelen en het retroperitoneum onderzocht. Aangezien deze tumoren in de diepe wekedelen ontstaan zijn ze vaak al groot op het moment dat ze ontdekt worden. De tumoren bestaan uit spoelvormige cellen met eosinofiel cytoplasma en langgerekte kernen die in elkaar kriskras kruisende bundels gelegen zijn. Hooggradige tumoren worden gekenmerkt door uitgesproken cytonucleaire atypie en necrose. De tumoren hebben een wisselende mate van gladde spierceldifferentiatie die kan worden aangetoond met immunohistochemisch onderzoek waarbij er minimaal enige desmine of h-caldesmon expressie aanwezig moet zijn. Leiomyosarcomen hebben een instabiel, complex karyotype en tot op heden is er geen genetische afwijking bekend die in al deze tumoren voorkomt. Mutaties in *TP53*, verlies van de tumor suppressorgenen *PTEN* en *RB1* en veranderingen in *MYOCD*, *ATRX* en *ROR2* komen in een substantieel deel van de tumoren voor en zijn soms gecorreleerd met de prognose. Leiomyosarcomen worden behandeld met chirurgie en daarnaast met conventionele chemotherapie zoals doxorubicine en dacarbazine. Naast de maligne gladde spierceltumor bestaat er ook een benigne gladde spierceltumor, het leiomyoom. Een veelvoorkomende variant van deze tumor is het leiomyoom van de uterus, welke bij ongeveer 70% van de vrouwen in de reproductieve leeftijd voorkomt. Benigne gladde spierceltumoren kunnen ook elders in het lichaam voorkomen, zo zijn er bijvoorbeeld de piloleiomyomen die in de huid ontstaan. De leiomyomen van de uterus kunnen genetisch in vier hoofdgroepen verdeeld worden, waarbij tussen de 50-70% van deze tumoren een mediator complex subunit 12 (*MED12*) mutatie heeft. In **hoofdstuk 2** wordt het voorkomen van *MED12* mutaties in leiomyomen van de uterus en wekedelen onderzocht. In overeenstemming met de literatuur wordt in 58% van de uterine leiomyomen een *MED12* mutatie aangetroffen. In de onderzochte angioleiomyomen, piloleiomyomen en abdominale leiomyomen wordt in slechts één abdominale tumor een *MED12* mutatie aangetroffen. Deze specifieke tumor toont ook oestrogenreceptor expressie wat er op duidt dat deze laesie mogelijk afkomstig is van een leiomyoom van de uterus. *MED12* mutaties zijn meer recent ook aangetroffen in fibroadenomen van de borst en phyllodestumoren wat suggereert dat *MED12* mogelijk vooral van belang is in hormoongevoelige tumoren. De afwezigheid van *MED12* mutaties in extra-uteriene leiomyomen duidt op een andere pathogenese van deze laesies. In deze studie was er één leiomyosarcoom van de uterus met een *MED12* mutatie,



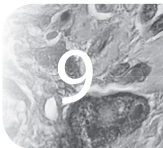
wat overeenkomt met het lage percentage (2 tot 30%) leiomyosarcomen met *MED12* mutaties wat is beschreven in de literatuur. Dit ondersteunt de hypothese dat het merendeel van de leiomyosarcomen van de uterus *de novo* ontstaat in plaats van dat ze zich ontwikkelen in een leiomyoom. Het is wel mogelijk dat leiomyomen een omgeving creëren waarin wild-type gladde spiercellen verschillende genetische veranderingen kunnen opbouwen die uiteindelijk resulteren in de ontwikkeling van een leiomyosarcoom, dit mechanisme is bekend van *EXT*-gemuteerde osteochondromen. De helft van de leiomyomen van de uterus met een *MED12* mutatie toont nucleaire β -catenine expressie. Normaal komt β -catenine in het cytoplasma voor, maar als de afbraak wordt voorkomen kan het naar de celkern gaan en daar binden aan *MED12* wat resulteert in stimulatie van de Wnt-signalpathway. In deze serie tumoren is ook gekeken naar fumaratehydratase (FH) deficiëntie, wat 'mutually exclusive' is met *MED12* mutaties. Een leiomyoom van de uterus en een cutaan leiomyoom van dezelfde patiënt, met mogelijk het HLRCC (hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma) syndroom, waren sterk positief voor S-(2-succinyl) cysteïne (2SC) immuunhistochemie. 2SC is een robuuste biomarker voor FH mutaties omdat de afwezigheid van functioneel FH leidt tot hoge levels van eiwitsuccinatie. Daarnaast werden nog twee leiomyosarcomen met hoge 2SC expressie gevonden, deze tumoren vertonen een toegenomen H3K9me3 methylering in vergelijking met FH-wild type tumoren, dit is te verklaren doordat mutaties in genen van de citroenzuurcyclus een effect hebben op histon demethylasen.

Zoals hierboven beschreven worden leiomyosarcomen gekenmerkt door hun complexe genetische profiel en chromosomale instabiliteit. Om de pathogenese van leiomyosarcomen beter te proberen te begrijpen en om mogelijke kandidaat genen te identificeren zijn in **hoofdstuk 3** tumorcellen van enkele tumoren gekaryotypeerd met COBRA-FISH. Twee tumoren hebben een translocatie tussen de chromosomen 6 en 14 (t(6;14)). Interessant is dat één van de tumoren rearrangements toonde van de genen *HMGA1* en *RAD51L1*, die ook bij een deel van de leiomyomen betrokken zijn. De exacte breekpunten van de translocaties zijn in kaart gebracht met FISH en array-CGH. Hierbij bleek dat de twee tumoren met de t(6;14) verschillende breekpunten in de chromosomen hadden. Dit illustreert weer het complexe en heterogene genetische profiel van leiomyosarcomen. In deze studie werd ook een tumor aangetroffen met een relatief simpel karyotype en in de literatuur is beschreven

dat een minderheid van de tumoren een vrij simpel karyotype heeft. Recent onderzoek naar een grote groep leiomyosarcomen laat zien dat de tumoren op basis van hun differentiatie in verschillende subgroepen onderverdeeld kunnen worden. Zo is er een groep waarbij relatief veel genen tot expressie komen die betrokken zijn bij spieraanleg en –differentiatie. Een hoge expressie van LMOD1 in deze groep is geassocieerd met een betere ziekte specifieke overleving. Aanvullend onderzoek is nodig om te onderzoeken of de genen met een veranderde expressie als target voor therapie gebruikt kunnen gaan worden.

Leiomyosarcomen worden behandeld met sommige varianten van conventionele chemotherapie, helaas zijn sommige tumoren echter resistent voor deze medicijnen. Daarom wordt in **hoofdstuk 4** gefocuseerd op de mechanismen die betrokken zijn bij chemoresistentie. Bcl2 speelt een belangrijke rol in dit proces in, omdat dit eiwit een lid is van een familie van anti-apoptotische eiwitten, net als Bcl-xL en Bcl-w. Bcl2 komt hoog tot expressie in leiomyosarcomen wat er op duidt dat in de tumorcellen het mechanisme van cellen om in apoptose te gaan geremd wordt, waardoor de tumorcel dus kan overleven. Behandeling van tumorcellen met een BH3-mimeticum (een remmer van eiwitten van de Bcl2 familie) resulteerde slechts in een kleine reductie van de overleving van tumorcellen *in vitro*. Daarentegen resulteerde de combinatiebehandeling van de tumorcellen met een BH3-mimeticum en het conventionele chemotherapeutikum doxorubicine tot synergie waarbij er apoptose van de tumorcellen optreedt. De inhibitie van Bcl2 door een BH3-mimeticum maakt de tumorcellen gevoelig voor de chemotherapie. Dit zijn veelbelovende resultaten waarbij de volgende stap zou zijn om de combinatie van deze twee geneesmiddelen in *in vivo* modellen te testen. In de toekomst kan deze combinatie misschien gebruikt worden bij de behandeling van patiënten met Bcl2 positieve tumoren.

Het myxoid liposarcoom is verantwoordelijk voor ongeveer 5% van alle wekedelensarcomen. De tumor gaat uit van het vetweefsel en komt het vaakst voor bij patiënten in het 4^e of 5^e decade. Deze tumor is in tweederde van de gevallen in de wekedelen van het bovenbeen gelokaliseerd. Histologisch zijn het tumoren met een myxoïde matrix met korte spoelvormige cellen met beperkte cytonucleaire atypie en tussen de tumorcellen een delicaat patroon van kleine bloedvatjes. Als de tumor voor meer dan 5% bestaat uit een component van monomorfe, kleine cellen met weinig cytoplasma en



donker chromatinepatroon die dicht opeen gepakt liggen, de zogenaamde 'small blue round cells' dan wordt de tumor als hooggradig beschouwd. Het myxoid liposarcoom heeft een translocatie t(12;16)(q13;p11), wat betekent dat de lange arm van chromosoom 12 fuseert met de korte arm van chromosoom 16, resulterend in een fusieproduct van de genen *FUS* en *DDIT3*. Het exacte mechanisme waarbij het fusieproduct resulteert in ongeremde tumorgroei is niet compleet opgehelderd, waarschijnlijk werkt het fusieproduct als een aberrante transcriptiefactor en zet het andere genen aan tot proliferatie terwijl tegelijkertijd de lipogene differentiatie wordt geremd.

In **hoofdstuk 5** wordt de expressie van NY-ESO-1 onderzocht in verschillende benigne en maligne wekedelentumoren. NY-ESO-1 is een eiwit wat normaal alleen in de testis tot expressie wordt gebracht en behoort tot de groep van 'cancer testis antigenen'. Het immuunsysteem van de patiënt kan tegen een dergelijk eiwit een immuunreactie opwekken waardoor de cellen die dit eiwit tot expressie brengen worden vernietigd. In deze studie blijkt dat NY-ESO-1 in 88% van de myxoid liposarcomen tot expressie komt. Ook in sommige andere maligne tumoren, zoals synoviosarcomen en myxofibrosarcomen, komt dit eiwit in een deel van de gevallen voor. NY-ESO-1 expressie was niet aanwezig in de benigne mesenchymale tumoren. Aangezien het eiwit immunogeen is, is het mogelijk om een immuunrespons tegen de tumorcellen uit te lokken. Dit kan door patiënten een vaccin te geven tegen NY-ESO-1, waarbij het immuunsysteem van de patiënt wordt getraind om dit eiwit te herkennen en om de tumorcellen op te ruimen. Ook kan geselecteerd worden op T-cellen van de patiënt die gericht zijn tegen NY-ESO-1 of dendritische celtherapie waarbij monocytten uit het bloed van de patiënt worden gehaald en worden opgewerkt tot dendritische cellen die bijdragen aan een effectieve immuunrespons van het lichaam. Deze vormen van immuuntherapie worden in trial verband onderzocht. Een nieuwe therapie tegen myxoid liposarcomen is van groot belang omdat ondanks dat patiënten in eerste instantie vaak goed reageren op conventionele chemo- en/of radiotherapie, patiënten in een later stadium moeilijk te behandelen zijn mede omdat deze tumor zich diffuus kan uitbreiden naar andere wekedelen verspreid door het hele lichaam.

Om meer onderzoek naar myxoid liposarcomen mogelijk te maken is het van belang om voldoende tumormodellen te hebben. Myxoid liposarcomen zijn bij uitstek tumoren die moeilijk te kweken zijn in tweedimensionale kweekflesjes met medium. Daarom zijn er wereldwijd slechts twee cellijn

modellen beschikbaar. In **hoofdstuk 6** wordt de ontwikkeling van een nieuwe myxoid liposarcoomcellijn (DL-221) beschreven. De tumorcellen zijn geïsoleerd van de tumor van een patiënt en daarna in kweekmedium opgegroeid. Op veel momenten in het traject zijn de tumorcellen getest voor de aanwezigheid van het FUS-DDIT3 fusieproduct om te controleren of het daadwerkelijk tumorcellen zijn en geen andere celtypen zoals bindweefselcellen. De nieuwe cellijn is spontaan geïmmortaliseerd waarmee deze zich onderscheidt van de andere twee cellijnen (402-91 en 1765-92) die door middel van SV40 virus transformatie onsterfelijk zijn gemaakt. De DL-221 is uitgebreid gekarakteriseerd waarbij gekeken is naar de mutatie status van *PIK3CA*, *TERT* en *TP53* en de eiwitexpressie van NY-ESO-1. Ook is van zowel de cellijn als van het ontwikkelde xenograft model Next Generation Sequencing (NGS) verricht om de biologie en mogelijke kandidaat targets voor de behandeling van myxoid liposarcomen te bestuderen.

In **hoofdstuk 7** is een uitgebreide 'drug screen' gedaan, waarbij in alle drie de beschikbare myxoid liposarcoomcellijnen is onderzocht hoe gevoelig de tumorcellen zijn voor de behandeling met verschillende medicijnen. Er zijn in totaal 273 medicijnen getest, waarbij zowel reeds geregistreerde medicijnen alsook nieuwe stoffen en specifieke (tyrosine kinase) inhibitors zijn geïncubeerd. Hieruit bleek dat de tumorcellen, zoals verwacht, gevoelig zijn voor behandeling met conventionele chemotherapeutica zoals anthracyclines en taxanen. Daarnaast werd survivin (*BIRC5*) geïdentificeerd als nieuwe kandidaat target omdat de tumorcellen van twee cellijnen al bij lage concentratie een sterke afname van de viabiliteit liet zien. Intracellulair heeft survivin twee belangrijke functies, in de kern is het betrokken bij de regulering van de celcyclus en in het cytoplasma remt het de apoptose. Een hoge nucleaire survivin expressie werd gevonden in myxoid liposarcomen wat er op duidt dat dit eiwit een rol heeft in de regulatie van de celcyclus in myxoid liposarcomen. Verder onderzoek naar het effect van survivin inhibitie *in vivo* is nodig en dit kan in de toekomst mogelijk leiden tot een nieuwe behandelingsmogelijkheid voor myxoid liposarcomen.

