



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **The epiphyseal growth plate and peripheral cartilaginous tumours : the neighbours matter**

Andrea, C.E. de

### **Citation**

Andrea, C. E. de. (2012, May 30). *The epiphyseal growth plate and peripheral cartilaginous tumours : the neighbours matter*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/19035>

Version: Corrected Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/19035>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19035> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Andrea, Carlos Eduardo de

**Title:** The epiphyseal growth plate and peripheral cartilaginous tumours : the neighbours matter

**Issue Date:** 2012-05-30

## **Inhoud**

- I. De zebravis als een modelsysteem voor de studie van menselijke skelet aandoeningen
- II. Epifysaire groeischijf ontwikkelingsregulatie en de vorming van het osteochondroom
- III. De rol van EXT1 en EXT2 genen bij de vorming van een secundair perifere chondrosarcoom
- IV. Mogelijke oplossingen voor de mechanismen van neoplastische transformatie van osteochondromen naar perifere chondrosarcomen
- V. Conclusies

## **Nederlandse samenvatting**

## I. De zebravis als een modelsysteem voor de studie van menselijke skelet aandoeningen

Mutaties in de exostosin genen, dackel (dak/ext2) en boxer (box/ext3), leiden tot defecten in zebravis kraakbeen, die sterk lijken op de afwijkingen in patiënten met multiple osteochondromen. De **hoofdstukken 3, 4 en 5** hebben betrekking op het gebruik van de dak mutant zebravis als model voor de vorming van de menselijke osteochondroom.

Kraakbeen wordt gevormd door de verwevenheid van collageen vezels en proteoglycanen. Polyethyleenimine (PEI) is een goed gedefiniëerde kationische kleurstof voor toepassing in reflectiecontrast- en elektronenmicroscopie. PEI bindt aan anionische sites op proteoglycanen en maakt visualisatie en kwantificering van de negatief geladen sites op het ultrastructurele niveau mogelijk. Met behulp van PEI pre-embedding kleuring toonden we aan dat in wild-type zebravissen en in mutanten met een mild fenotype de proteoglycanen in een gradient gedistribueerd zijn over de gehele kraakbenige extracellulaire matrix (**hoofdstuk 5**). Een soortgelijk patroon van de distributie werd waargenomen in de normale humane groeischijf. Chondrocyten van de dak mutant vertoonden daarentegen geen gradueel verdeelde proteoglycanen (**hoofdstuk 5**). Dit was vergelijkbaar met het humane osteochondroom waarin de gradiënten ook afwezig waren. Interessant is dat slechts een deel van de osteochondroom cellen de extracellulaire gradiënten van proteoglycanen missen, wat doet vermoeden dat alleen die cellen homozygote inactivatie van *EXT1/EXT2* hebben. De homozygoot mutant cellen bleken gemengd te zijn met een populatie van cellen met een correcte verdeling van proteoglycanen in een gradiënt (**hoofdstuk 5**). Het lijkt er derhalve op dat de verschillende cellen die het osteochondroom vormen bestaan uit een mozaïek van *EXT1/EXT2* mutant en het wild-type cellen. De mozaïek celpopulatie van het osteochondroom is ook fraai gerapporteerd door Jones et al. met een conditioneel muismodel voor *Ext1*. Bovendien hebben we met deze mutant zebravis aangetoond dat heparansulfaat de mesenchymale differentiatie naar de osteoblastische lijn controleert (**hoofdstuk 4**). Onze gegevens suggereren dat heparansulfaat betrokken is bij de “bot-naar-vet”-schakelaar tijdens de mesenchymale differentiatie, zonder dat dit invloed heeft op de ontwikkeling van chondrocyten of spiercellen. De over-expressie van *PPAR-γ* signaaltransductie is mogelijk betrokken bij de inhibitie van osteoblast ontwikkeling in de zebravis. Er is nog niet precies vastgesteld hoe heparansulfaat de “bot-naar-vet” schakelaar controleert. Of dit verschijnsel een rol speelt in het humane osteochondroom is tot dusver onduidelijk.

## II. Epifysaire groeischijf ontwikkelingsregulatie en de vorming van het osteochondroom

De groei en structuur van de epifysaire groeischijf worden geregeld door korte en lange afstand signaalmoleculen. De diffusie van deze moleculen in de kraakbeenachtige extracellulaire matrix wordt gemedieerd door proteoglycanen. Proteoglycanen zijn verdeeld

over de kraakbenige extracellulaire matrix in een gegradeerd verloop, zoals bleek in **hoofdstuk 5**. Toch blijft de vraag hoe de gradiënten van proteoglycanen worden gevormd.

Proteoglycanen zijn polyanionische ketens van moleculen met negatief geladen gebieden bestaand uit de sulfaat en carboxylgroepen. In opgeloste vorm zorgt de onderlinge afstoting van de negatieve lading ervoor dat de geaggregeerde proteoglycaan moleculen uitspreiden en een groot volume innemen. Deze wederzijdse afstoting van negatieve ladingen kan deels de vorming van gradiënten van proteoglycanen in het kraakbeen extracellulaire matrix verklaren.

Osteochondromen worden geassocieerd met verlies-van-functie mutaties in *EXT1/EXT2*. De *EXT* genen coderen voor glycosyltransferases die betrokken zijn bij de heparansulfaat biosynthese. Het mechanisme hoe veranderingen in heparansulfaat biosynthese leiden tot het osteochondroom is niet volledig begrepen. Aangezien heparansulfaat werkt als een co-receptor voor fibroblast groeifactoren en BMP's, en het de diffusie van Ihh en leden van de Wnt-familie reguleert, kan een verkeerde verlenging van heparansulfaat ketens leiden tot verlies van extracellulaire proteoglycaan gradiënten. Dit resulteert dan in verschillende groeifactor signaleringsdefecten en verminderde cel-cel en cel-matrix interacties en uiteindelijk een osteochondroom.

Er wordt gedacht dat de gradiënten van signaalmoleculen rond cellen met homozygote inactivatie van *EXT1/EXT2* verstoord zijn, omdat daar de gradiënt distributie van proteoglycanen is aangetast (**hoofdstuk 2 en 5**). Aangezien heparansulfaat de vorming van gradiënten van IHH en Wnt moduleert, kunnen veranderingen in de gradiënten deze routes verstoren, en zo bijdragen aan het ontstaan van een osteochondroom. De diffusie van Ihh moleculen en hun ligand-receptor interactie toont aan dat zij worden beïnvloed door de dysfunctie van *Ext1* in chondrocyten tijdens de endochondrale ossificatie. Daarnaast geeft foute diffusie van Ihh een afwijking van de osteogenese bij het perichondrium. Het perichondrium kan dan geen bot kraag maken, wat bijdraagt aan de vorming van een osteochondroom. De gradiënten van Wnt signalering zijn betrokken bij "planar cell polarity", een proces wat zorgt voor positionering van de morfogenese. "Planar cell polarity" is gekoppeld aan een op een microtubulair gebaseerd subcellulair organel, het primaire cilium, wat uitsteekt aan de oppervlakte van de cel. Primaire cilia werken als een communicatie apparaat van de cel en ontvangen en transduceren mechanische en chemische signalen van de naburige cellen en van de extracellulaire matrix. In proliferende en hypertrofe chondrocyten van de epifyse groeischijf zijn de primaire cilia gepolariseerd en evenwijdig aan de lengteas van het bot (**hoofdstuk 6**). Kortere heparansulfaat ketens die worden geproduceerd door osteochondroom cellen kunnen de vorming van gradiënten voor Wnt signalering beïnvloeden. Hypothetisch zou het gebrek aan adequate positionele informatie afbreuk kunnen doen aan de polariteit functie van primaire cilia in osteochondroom cellen.

Het verlies van cel/weefsel polariteit kan zo bijdragen aan de vorming van een osteochondroom (**hoofdstukken 2 en 6**).

### **III. De rol van *EXT1* en *EXT2* genen bij de vorming van een secundair perifere chondrosarcoom**

Neoplastische transformatie van een osteochondroom komt voor bij minder dan 1% van de patiënten met sporadische osteochondromen en bij 1-3% van de patiënten met meerdere osteochondromen.

Een op maat gemaakte oligonucleotide-gebaseerde microarray met een overlappende dekking van *EXT1/EXT2* genen werd gebruikt om deleties in elk stukje van de *EXT1* of *EXT2* genen op te sporen. We toonden aan dat, anders dan in osteochondromen, homozygote deleties van *EXT1/EXT2* zelden voorkomen in sporadische perifere chondrosarcomen (**hoofdstuk 7**). FISH met een *EXT1* probe toonde aan dat cellen met behoud van één of beide kopieën van *EXT1* een grote populatie van cellen vormt in de tumor. Aangezien cellen met een homozygote deletie (die derhalve geen kopieën van de betrokken genomische regio meer hebben) niet in staat zijn om de verloren allelen tijdens neoplastische progressie terug te krijgen, moet de cellulaire oorsprong van perifere chondrosarcomen misschien wel te zoeken zijn in de wild-type cellen welke zich bevinden in de kap van het osteochondroom of in het naburige weefsel. De aanwezigheid van deze wild-type cellen in de kraakbeenkap van osteochondroom is eerder gesuggereerd door de PEI- en de primaire cilia studies (**hoofdstuk 5 en 6**) en ook in muizen met een conditioneel *Ext1* gen. Met behulp van FISH toonden we aan dat de wild-type cellen in de meerderheid zijn in de hypertrofische zone van osteochondromen (**hoofdstuk 7**). Daarom, terwijl de homozygote inactivatie van *EXT1/EXT2* essentieel is voor het osteochondroom, lijken *EXT1* en *EXT2* geen rol te spelen in de vorming van de meeste perifere chondrosarcomen (**hoofdstuk 7**).

### **IV. Mogelijke oplossingen voor de mechanismen van neoplastische transformatie van osteochondromen naar perifere chondrosarcomen**

We hebben aangetoond dat morfologische parameters alleen geen onderscheid maken tussen osteochondromen en laaggradige perifere chondrosarcomen (**hoofdstuk 8 en 9**). Het blijft heel moeilijk en afhankelijk van de waarnemer om vroege kwaadaardige progressie van een osteochondroom te identificeren. We konden het geen betrouwbare histologische criteria formuleren op basis van een grote multinationale studie (**hoofdstuk 8**). Echter, we hebben wel aangetoond dat kwaadaardige progressie van een osteochondroom geassocieerd is met verhoogde expressie van type X collageen en met verhoogde vascularisatie (**hoofdstuk 9**). De vorming van een collageen X-rijke matrix en een verhoogde vascularisatie kunnen bruikbare prognostische markers zijn van de neoplastische transformatie van een osteochondroom, maar verdere validatie is vereist voordat ze klinisch kunnen worden toegepast.

Kwaadaardige progressie van perifere chondrosarcomen wordt gekenmerkt door een hoog percentage van verlies van heterozygotie (bijvoorbeeld *CDKN2A/p16*, *TP53*, *RB1*) waarbij de ploïdie varieert van half tot tweemaal het normale DNA-gehalte. Daarom kunnen de *EXT* wild-type cellen in de meeste osteochondromen tijdens neoplastische transformatie genetische veranderingen oplopen in *p16*, *p53*, *RB1* of een nog niet geïdentificeerd gen, wat leidt tot de vorming van perifere chondrosarcomen. Terwijl de mutaties in *IDH1/IDH2* zijn geassocieerd met enchondromen en centrale chondrosarcomen, blijken deze genen niet betrokken bij de osteochondromen en perifere chondrosarcomen. Dit toont opnieuw de verschillende genetische make-up aan ten opzichte van centrale kraakbeen tumoren.

Eerder hebben wij beschreven dat signaaltransductie routes die afhankelijk zijn van heparansulfaat, zoals fibroblastgroefactor (FGF) en parathyroïde hormoon-gerelateerde eiwit (PTHrP), inactief zijn in osteochondromen en actief in perifere tumoren. We hebben aangetoond dat cellen met functionele *EXT1* en *EXT2* genen de belangrijkste kloon vormen in perifere chondrosarcomen (**hoofdstuk 7**). Waarschijnlijk synthetiseren deze *EXT1/EXT2* wild-type cellen heparansulfaat met een normale ketenlengte, die de activiteit van PTHrP en FGF in perifere tumoren (figuur 10.1) kunnen verklaren.

De bijdrage van FGF en PTHrP aan secundair perifeer chondrosarcoom formatie is nog onduidelijk. In de epifysaire groeischijf onderdrukt PTHrP chondrocyten differentiatie in hypertrofische chondrocyten en FGF regelt chondrocyten proliferatie en differentiatie.

## V. Conclusies

In de epifysaire groeischijf is geleidelijk onthuld hoe chondrocyten met elkaar en met de micro-omgeving communiceren via extracellulaire matrix. Deze interacties in de epifysaire groeischijf leiden tot de vorming van een gepolariseerde weefselstructuur. Cellen in de epifysaire groeischijf hebben homozygote mutaties in *EXT1/EXT2* wat de gradiënten en daardoor de signaaltransductie verstoort, en wat uiteindelijk leidt tot het verlies van celpolariteit. Dit kan dan bijdragen tot de vorming van een osteochondroom. Bovendien kan osteochondroom werken als een permissieve omgeving, waarin *EXT1/EXT2* wild-type cellen in de kraakbeenkap genetische veranderingen ondergaan en ontaarden in een perifeer chondrosarcoom.

