



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The role of EXT and growth signalling pathways in osteochondroma and its progression towards secondary peripheral chondrosarcoma

Hameetman, L.

Citation

Hameetman, L. (2007, April 26). *The role of EXT and growth signalling pathways in osteochondroma and its progression towards secondary peripheral chondrosarcoma*. Department Pathology, Faculty of Medicine / Leiden University Medical Center (LUMC), Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/11865>

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/1887/11865>

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

De rol van EXT en groeifactor
regelkringen in osteochondromen
en de progressie naar secundaire
perifere chondrosarcomen



INHOUD

- I.** Achtergrond
- II.** EXT in osteochondromen en perifere chondrosarcomen
- III.** Heparan sulfaat proteoglycanen
- IV.** Groeifactor regelkringen
- V.** De cel-van-origine van het osteochondroom
- VI.** Een meerstaps progressie model voor de ontwikkeling van secundaire perifere chondrosarcomen
- VII.** EXT-afhankelijke groeifactor regelkringen in andere kraakbeentumoren
- VIII.** De ontwikkeling van diagnostische markers voor perifere chondrosarcomen
- IX.** Conclusie

I. Achtergrond

Chondrosarcomen zijn zeldzame, overwegend langzaam groeiende, kwaadaardige kraakbeen-vormende tumoren. Na osteosarcomen vormen ze de meest frequent voorkomende primaire kwaadaardige bottumoren. Goed- en kwaadaardige kraakbeentumoren vormen samen de groep meest voorkomende primaire bottumoren.

Histologisch gezien worden verschillende subtypen chondrosarcomen onderscheiden, waarvan de meerderheid (80-85%) van het conventionele subtype is. Conventionele chondrosarcomen worden afhankelijk van het histologische beeld onderverdeeld in 3 gradaties van maligniteit. Deze gradering is een goede indicatie voor het klinische gedrag van de tumor. Hoe hoger de graad, des te groter de kans op uitzaaiing en dus een slechtere prognose. In de praktijk is de problematiek bij de diagnostiek echter gelegen in het onderscheid tussen goedaardig en laaggradig kwaadaardig.

Conventionele chondrosarcomen worden onderverdeeld in centrale chondrosarcomen (85%), welke gelegen zijn in het merg van het bot, en secundair perifere chondrosarcomen (15%). Deze laatste groep ontstaat in een goedaardige voorloper, het osteochondroom. Een osteochondroom bestaat uit een botsteel met een kraakbeenskap (figuur 2.1). De kraakbeenskap wordt bedekt door perichondrium, een dun laagje fibreus weefsel. Osteochondromen ontstaan aan de buitenzijde van de uiteinden van de lange pijpbeenderen, ter hoogte van de groeischijf. De organisatie van de cellen in de kraakbeenskap van een osteochondroom lijkt op die van de groeischijf. Net als het kraakbeen in de groeischijf, ondergaat de kraakbeenskap van een osteochondroom enchondrale verbening. Dit proces leidt in de normale groeischijf tot lengtegroei van de botten (**hoofdstuk 1, sectie III**). In slechts een klein percentage (< 3%) van de osteochondromen wordt de kraakbeenskap kwaadaardig en ontstaat een secundair perifeer chondrosarcoom.

Osteochondromen kunnen solitair voorkomen, maar ook multipel in het kader van een erfelijk syndroom, Multiple Osteochondromas (MO). Multiple Osteochondromas wordt veroorzaakt door een inactiverende kiembaanmutatie in het *EXT1*- of het *EXT2*-gen, waarbij de overgebleven wild type kopie is gedeleteerd in het osteochondroom. Dus beide kopieën van een *EXT*-gen moeten worden uitgeschakeld voor het ontstaan van een erfelijke osteochondroom. Voor niet-erfelijke osteochondromen was bij aanvang van de studies beschreven in dit proefschrift de exacte rol van de *EXT*-genen nog niet bekend.

De *EXT*-eiwitten zijn verantwoordelijk voor de polymerisatie van heparan sulfaat zijketens aan zogenaamde heparan sulfaat proteoglycaan (HSPG) eiwitten. HSPGs zijn onder andere betrokken bij de nauwkeurige regulatie van groei en differentiatie in de normale groeischijf.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek heeft als doel te bepalen of hetzelfde of een ander mechanisme betrokken is bij het ontstaan van erfelijke en niet-erfelijke osteochondromen en om te zien of de *EXT*-genen ook betrokken zijn bij vergelijkbare bot-uitwassen in andere aandoeningen zoals dysplasia epiphysealis hemimelica en metachondromatose. Daarnaast is onderzoek verricht naar het effect van een verstoorde *EXT*-functie op de HSPG productie in osteochondromen en perifere chondrosarcomen. Verder is het onderzoek gericht op het vinden van moleculair genetische of immunohistochemische markers die het onderscheid tussen osteochondromen en laaggradige perifere chondrosarcomen kunnen vergemakkelijken.

II. EXT in osteochondromen en perifere chondrosarcomen

Patiënten met Multiple Osteochondromas hebben een erfelijke mutatie in het *EXT1*- of *EXT2*-gen, welke leidt tot een niet-functioneel genproduct van het aangedane allel. In het DNA uit somatische en kiemcellen van deze patiënten is naast het gemuteerde gen, ook nog een kopie van het gezonde gen aanwezig. In één studie wordt in de kraakbeenkap van een aantal erfelijke osteochondromen naast de erfelijke mutatie in het *EXT1*-gen ook het verlies van de overgebleven gezonde kopie aangetoond. Deze resultaten duiden erop dat uitschakeling van beide kopieën van het *EXT1*-gen nodig is voor het ontstaan van een osteochondroom in dit erfelijke syndroom. Dit past bij een klassieke tumorsuppressor functie van het *EXT1*-gen, volgens Knudson's twee-hits-model. Echter in de meeste publicaties hierover wordt aangenomen dat haploïnsufficiëntie, dus één defect *EXT*-kopie, voldoende is voor het ontstaan van erfelijke osteochondromen.

De rol van de *EXT*-genen in niet-erfelijke, solitaire, osteochondromen was tot nu toe nog niet duidelijk. Somatische mutaties in de *EXT*-genen worden zelden waargenomen in sporadische osteochondromen, maar verlies van het stuk van chromosoom 8 (8q24) waar het *EXT1*-gen zich bevindt, is wel gevonden in cytogenetische studies. Dit suggereert dat het *EXT1*-gen, of een ander gen in de buurt van het *EXT1*-gen, een belangrijke rol speelt bij het ontstaan van sporadische osteochondromen.

In de studie beschreven in **hoofdstuk 3** is in een groep sporadische osteochondromen gekeken naar mogelijke afwijkingen in chromosoom 8, waar het *EXT1*-gen is gelokaliseerd. Hiervoor is gebruik gemaakt van array-based Comparative Genomic Hybridization (array-CGH) en Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). Dit zijn twee technieken waarmee verlies of vermeerdering van (zeer) kleine stukjes DNA kan worden aangetoond. In alle acht onderzochte sporadische osteochondromen werd aangetoond dat een groot deel van één kopie van chromosoom 8 ontbrak, inclusief het gebied waarin het *EXT1*-gen zich bevindt. Daarnaast werd in zeven van de acht osteochondromen geheel of gedeeltelijk verlies van het *EXT1*-gen op het andere chromosoom 8 gevonden. Er was dus sprake van een zogenaamde homozygote deletie van het *EXT1*-gen. Hiermee is aangetoond dat ook in sporadische osteochondromen beide kopieën van het *EXT1*-gen zijn uitgeschakeld. Dit betreft weliswaar een ander mechanisme dan bij het erfelijke syndroom, Multiple Osteochondromas. Deze resultaten bevestigen het belang van volledige uitschakeling van het *EXT1*-gen voor het ontstaan van niet alleen erfelijke- maar ook sporadische osteochondromen.

In **hoofdstuk 4** is aangetoond dat RNA expressie van het *EXT1* en het *EXT2*-gen in zowel erfelijke als sporadische osteochondromen en perifere chondrosarcomen was verlaagd, in vergelijking met de expressie van deze genen in de normale groeischijf. Voor de erfelijke osteochondromen correleerde de verlaagde RNA expressie met de erfelijke mutatie in het corresponderende gen. Voor sporadische tumoren bleek echter alleen de RNA expressie van het *EXT1*-gen verlaagd. Deze laatste resultaten passen goed bij de homozygote deletie van het *EXT1*-gen in sporadische osteochondromen (**hoofdstuk 3**).

Uit de resultaten van **hoofdstuk 3** en **4** kan worden geconcludeerd dat, hoewel de uitschakelingsmechanismen van de *EXT*-genen op DNA-niveau in erfelijke en solitaire tumoren verschillend zijn, beide resulteren in de verlaging van de RNA expressie van de *EXT*-genen.

Zoals verwacht was ook de expressie van de *EXT*-genen in de perifere chondrosarcomen verlaagd. Deze kwaadaardige tumoren ontstaan in de kraakbeenkap van een osteochondroom waarin beide kopieën van het *EXT*-gen al zijn uitgeschakeld.

III. Heparan sulfaat proteoglycanen

Inactivatie van de *EXT*-genen zal onvermijdelijk leiden tot afwezigheid van de expressie van functionele EXT eiwitten en zal daarmee de productie van heparan sulfaat proteoglycanen (HSPGs) beïnvloeden. Deze hypothese is getoetst aan de hand van een grote groep osteochondromen en perifere chondrosarcomen in **hoofdstuk 4**. Met behulp van immunohistochemie is gekeken naar de aan- of afwezigheid van verschillende HSPGs (syndecan-2 en CD44v3) en de HS zijketens die door het EXT1/2 complex worden gepolymeriseerd. Omdat de kraakbeenkap histologisch gezien lijkt op een groeischijf en bekend is dat de *EXT*-genen tot expressie komen in de groeischijf, zijn groeischijven meegenomen ter vergelijking van expressie.

In de groeischijf konden syndecan-2 en de HS zijketens aangetoond worden aan het celoppervlak en in de extracellulaire matrix van de hypertrofe en calcificerende chondrocyten. Deze extracellulaire expressie was afwezig in de osteochondromen en perifere chondrosarcomen. Het syndecan-2 eiwit kon echter wel aangetoond worden in het cytoplasma van de tumorcellen, maar de HS zijketens waren afwezig. Expressie van CD44v3 werd alleen gevonden in de tumoren en niet in de normale groeischijf. De expressie van CD44v3 was dus tumorspecifiek. In tegenstelling tot andere soorten tumoren, waar de expressie van CD44v3 aan het celoppervlak is gelokaliseerd, was de expressie in osteochondromen en chondrosarcomen beperkt tot het cytoplasma van de tumorcellen. Hierbij werd in de meeste gevallen een ophoping van het eiwit naast de kern gezien. Visualisatie met confocale microscopie toonde aan dat deze ophoping van CD44v3 zich in het Golgi apparaat bevindt. Dit is het celorganel waar het EXT1/2 complex in de normale situatie haar functie uitoefent.

Deze resultaten suggereren dat het verlies van één van de *EXT*-genen leidt tot een verstoorde HSPG-productie en dat dit vervolgens leidt tot een verstoorde distributie van deze eiwitten. De niet-volledig geproduceerde HSPGs worden niet meer naar de celmembraan en de extracellulaire matrix gebracht, maar hopen op in het cytoplasma en het Golgi apparaat. Vervolg studies, in het bijzonder in *in vitro* cel systemen, zullen nodig zijn om het precieze verband tussen het verlies van *EXT1* of *EXT2* en de verstoorde HSPG expressie aan te tonen.

IV. Groeifactor regelkringen

De IHH-, WNT- en TGF- β - signaaltransductie regelkringen spelen een belangrijke rol in de groei en differentiatie van kraakbeencellen in de groeischijf. Heparan sulfaat proteoglycanen reguleren de diffusie van liganden naar de receptoren en zijn dus essentieel voor signaaltransductie. Bij onderzoek met fruitvliegjes is gebleken dat vooral de IHH-regelkring wordt beïnvloed door het verlies van HSPGs aan het celoppervlak en in de extracellulaire matrix. De IHH-regelkring reguleert de proliferatie en differentiatie van chondrocyten in de normale groeischijf via de PTHLH-regelkring (figuur 1.4). Het verlies van HSPGs aan het celoppervlak in osteochondromen en chondrosarcomen zou dus zijn weerslag kunnen hebben op de IHH/PTHLH-regelkringen. Uit eerdere studies is gebleken dat eiwitten van de

PTHLH-regelkring afwezig zijn in osteochondromen. Deze eiwitten komen echter wel tot expressie in laaggradige perifere chondrosarcomen, en zijn dus mogelijk betrokken bij de maligne ontaarding van een osteochondroom.

Hoofdstuk 5 beschrijft een studie naar de RNA expressie van genen uit de IHH-regelkring in osteochondromen en perifere chondrosarcomen. In osteochondromen was de expressie van de IHH-regelkring componenten *PTCH*, *GLI1* en *GLI2*, niet veranderd in vergelijking met de normale groeischijf. Dit duidt er dus op dat de IHH-regelkring actief is in osteochondromen. Echter in de perifere chondrosarcomen, in het bijzonder in de hooggradige tumoren, was de expressie van deze genen sterk verminderd. Dit impliceert dat de IHH-regelkring minder actief wordt in chondrosarcomen. In de groeischijf is de IHH-regelkring belangrijk voor de strikte organisatie van de cellen in de extracellulaire matrix. Deze strikte organisatie kan in de kraakbeenkap van een osteochondroom nog steeds worden herkend. Het ontaarden van een osteochondroom in een laaggradig chondrosarcom en de verdere ontwikkeling naar een hooggradig chondrosarcom wordt gekarakteriseerd door verhoogde proliferatie, toename van de celrijkdom en vermindering van de extracellulaire matrix. Onze resultaten laten een duidelijk verband zien tussen de verlaging van de activiteit van de IHH-regelkring en het verlies van de cellulaire organisatie in perifere chondrosarcomen.

In de normale groeischijf wordt de activiteit van de PTHLH-regelkring aangestuurd door IHH. In tegenstelling tot de IHH-regelkring, is de PTHLH-regelkring aanvankelijk niet actief in osteochondromen, maar wordt gereactiveerd in perifere chondrosarcomen. Het is aannemelijk dat de kwaadaardige tumorcellen in het chondrosarcom de activiteit van de PTHLH-regelkring onafhankelijk van IHH reguleren. Dit kan door zelfregulatie van PTHLH, maar ook door activatie van de PTHLH-regelkring via andere factoren. Eén van deze mogelijke factoren is TGF- β . Uit de expressiestudies, beschreven in **hoofdstuk 5**, bleek dat de TGF- β -regelkring actief was in chondrosarcomen, aangezien verschillende genen tot expressie kwamen die gereguleerd worden door TGF- β . Van deze genen is bekend dat ze betrokken zijn bij tumorinvasie en het uitzaaien van de tumor. Daarnaast kan TGF- β de PTHLH-regelkring aanzetten. TGF- β zou daarom de activiteit van de PTHLH-regelkring kunnen regelen op het moment dat de activiteit van IHH afneemt. Echter ook in osteochondromen kon met behulp van immunohistochemie worden aangetoond dat de TGF- β -regelkring actief is. Vanuit de literatuur is bekend dat TGF- β een belangrijke rol speelt in de groeischijf. Maar ook dat TGF- β zowel een tumorbevorderende als een tumorbeschermd functie kan hebben. Het is dus aannemelijk dat het effect van de TGF- β regelkring afhankelijk is van stimuli uit de directe omgeving. In chondrosarcomen leidt dit mogelijk tot een tumorbevorderend effect, terwijl in groeischijven en osteochondromen de TGF- β -regelkring betrokken zou kunnen zijn bij de differentiatie van chondrocyten en de mineralisatie van de extracellulaire matrix.

Ook de WNT-regelkring is afhankelijk van heparan sulfaat proteoglycanen voor diffusie van het WNT-ligand door de extracellulaire matrix. Om deze reden is ook de activiteit van de WNT-regelkring in osteochondromen en chondrosarcomen bestudeerd in **hoofdstuk 5**. Er is gekeken naar nucleaire expressie van β -catenine, de boodschapper van de WNT-regelkring. In vergelijking met laaggradige chondrosarcomen nam de nucleaire expressie van β -catenine in hooggradige tumoren af. Dit duidt op een inactivatie van de WNT-regelkring in hooggradige tumoren, vergelijkbaar met de IHH-regelkring. Of er een mogelijke

relatie bestaat tussen de IHH- en WNT-regelkringen in kraakbeen tumoren zal verder onderzocht moeten worden.

Naast groeifactoren als IHH, WNT en TGF- β , spelen ook hormonale factoren een belangrijke rol in enchondrale verbening. Oestrogeen heeft een negatieve invloed op de proliferatie van chondrocyten en is betrokken bij het sluiten van de groeischijf aan het einde van de puberteit. Net als de groeischijf stopt ook het osteochondroom met groeien aan het einde van de puberteit doordat de kraakbeencap verbeent. Dit suggereert dat osteochondromen reageren op oestrogeen. In een recent gepubliceerd onderzoek is aangetoond dat de oestrogeenreceptor tot expressie komt in zowel osteochondromen als perifere en centrale chondrosarcomen. Tevens werd aangetoond dat oestrogeen de groei van chondrosarcom-celkweken kan stimuleren. Dit zou kunnen betekenen dat behandeling van chondrosarcomen met antioestrogenen mogelijk is. Gezien de tegenstrijdige functies van oestrogeen in de remming van enchondrale botgroei en de stimulatie van kraakbeentumor cellen, is aanvullend onderzoek noodzakelijk.

V. De cel-van-origine van het osteochondroom

Het osteochondroom bestaat uit drie verschillende componenten: de botsteel, de kraakbeencap en het perichondrium. De kraakbeencap van het osteochondroom is neoplastisch en van clonale origine (een tumor ontstaan door vermeerdering van een enkele voorlopercel), aangezien in de cellen van de kraakbeencap de uitschakeling van beide kopieën van het *EXT1*-gen is aangetoond. Het staat echter nog ter discussie of de botsteel en het perichondrium ook neoplastisch zijn, of dat deze reactief zijn en afkomstig zijn van het onderliggende normale bot. Met behulp van fluorescente *in situ* hybridisatie (FISH) analyse van een niet-erfelijk osteochondroom, werd in **hoofdstuk 3** aangetoond dat alleen de cellen in de kraakbeencap de homozygote deletie van het *EXT1*-gen bevatten. Deze homozygote deletie was afwezig in de cellen van de botsteel of het perichondrium. Uit deze resultaten blijkt dus dat alleen de kraakbeencap van het osteochondroom neoplastisch is.

In de literatuur zijn verschillende theorieën beschreven over de mogelijke cel-van-origine waaruit een osteochondroom zou ontstaan. Maar geen van deze theorieën wordt onderbouwd door wetenschappelijke bewijzen. De huidige kennis samen met de resultaten van **hoofdstuk 3** geven een aantal aanwijzingen. Allereerst ontstaan osteochondromen alleen aan het oppervlak van het bot en nooit in het centrum van de groeischijf. Dit suggereert dat de cel-van-origine zich aan de periferie van de groeischijf zal bevinden. Ten tweede, moet de cel-van-origine gevoelig zijn voor DNA schade, aangezien beide kopieën van een *EXT*-gen geïnactiveerd moeten worden. Het ligt daarom voor de hand dat de cel-van-origine een cel met delingsactiviteit is. Deze zijn vooral aanwezig in de groeischijf en niet in het perichondrium. Osteochondromen ontstaan en groeien alleen tijdens enchondrale botgroei. Bovendien is aangetoond dat het perichondrium twee kopieën van het *EXT1*-gen bevat en dus niet neoplastisch is. Uit deze resultaten kan worden opgemaakt dat de cel-van-origine zich waarschijnlijk lateraal in de groeischijf bevindt.

VI. Een meerstaps progressie model voor de ontwikkeling van secundaire perifere chondrosarcomen

In **hoofdstuk 2** is een meerstaps progressie model voor de ontwikkeling van perifere chondrosarcomen geïntroduceerd. Met de resultaten beschreven in dit proefschrift kan dit model worden uitgebreid en verfijnd (figuur 8.1). De cel-van-origine moet eerst beide kopieën van het *EXT1*- of (weliswaar alleen in erfelijke tumoren) het *EXT2*-gen uitschakelen voordat een osteochondroom kan ontstaan. In het osteochondroom leidt het verlies van de heparan sulfaat proteoglycanen (HSPGs) aan het celoppervlak tot een verstoring van de verschillende HSPG-afhankelijke regelkringen, zoals de IHH-regelkring. De cellen in de kraakbeenskap van het osteochondroom schakelen over op autonome IHH regulatie om te kunnen blijven prolifereren en differentiëren. Wanneer deze regulatie wordt verstoord, kan een cel in de kraakbeenskap overschakelen op een andere, mogelijk minder strikt gereuleerde proliferatieve regelkring, zoals de TGF- β -regelkring, om te kunnen blijven groeien en zich te ontwikkelen tot een secundair perifeer chondrosarcoom. Dit gaat gepaard met de activatie van de PTHLH-regelkring en een toename in de genomische instabiliteit zoals al eerder is beschreven.

VII. EXT-afhankelijke groeifactor regelkringen in andere kraakbeentumoren

Er zijn verschillende kraakbeentumoren die in de differentiaal diagnose van osteochondromen en chondrosarcomen moeten worden overwogen. Tot op heden is er nog weinig bekend over de rol van de *EXT*-genen en de EXT-afhankelijke signaaltransductie regelkringen in andere kraakbeentumoren. Recent zijn er echter verschillende onderzoeken verricht naar de EXT afhankelijke regelkringen in zowel goedaardige als kwaadaardige tumoren, al waren deze voornamelijk gericht op de IHH/PTHLH-regelkring. In tabel 8.1 worden de resultaten van deze onderzoeken samengevat.

In **hoofdstuk 7** worden twee zeldzame aandoeningen beschreven die overwogen kunnen worden in de differentiaal diagnose van osteochondromen, namelijk dysplasia epiphysealis hemimelica en metachondromatose. De exostoses – osteochondroom-achtige laesies – van beide syndromen werden onderzocht op histologisch, radiologisch en moleculair biologisch niveau. De exostoses van metachondromatose waren histologisch niet te onderscheiden van osteochondromen, terwijl de exostoses van dysplasia epiphysealis hemimelica specifieke histologische kenmerken hadden, zoals een andere cellulaire organisatie in de extracellulaire matrix. metachondromatose -gerelateerde exostoses konden radiologisch van osteochondromen onderscheiden worden omdat deze laesies zich van de groeischijf africhten, terwijl osteochondromen juist naar groeischijf toewijzen.

Op moleculair biologisch niveau waren de exostoses van dysplasia epiphysealis hemimelica en metachondromatose patiënten ook verschillend van osteochondromen. Ten eerste hadden exostoses van beide syndromen geen inactivatie van de *EXT*-genen, aangezien zowel het *EXT1*- als het *EXT2*-gen normaal tot expressie kwam. Ten tweede was de IHH/PTHLH-regelkring actief, terwijl in osteochondromen de PTHLH-regelkring niet actief is. Ten slotte waren de genexpressieprofielen van de exostoses van dysplasia epiphysealis hemimelica en metachondromatose patiënten anders dan die van erfelijke en niet-erfelijke osteochondromen. Uit deze resultaten kan geconcludeerd worden dat laesies van dysplasia epiphysealis hemimelica en metachondromatose duidelijk verschillen van osteochondromen.

Het zijn daarom aparte entiteiten en de term osteochondroom kan in dit kader beter vermeden worden.

In andere goedaardige kraakbeentumoren, zoals enchondromen, chondroblastomen en chondromyxoid fibromen, blijkt de PTHLH-regelkring actief te zijn. Ook in centrale chondrosarcomen is de PTHLH-regelkring actief. Dus binnen de groep van kraakbeentumoren, is de afwezigheid van de PTHLH-regelkring specifiek voor osteochondromen.

VIII. De ontwikkeling van diagnostische markers voor perifere chondrosarcomen

Het onderscheid tussen osteochondromen en graad I perifere chondrosarcomen is in de dagelijkse praktijk soms moeilijk, ondanks het feit dat de diagnose is gebaseerd op histologische, radiologische en klinische gegevens. Eén van de doelen van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is het identificeren van moleculair biologische of immunohistochemische markers die goedaardige en kwaadaardige kraakbeentumoren kunnen onderscheiden. In een eerdere studie is aangetoond dat de PTHLH en BCL2 eiwitten, componenten van de PTHLH regelkring, aanwezig zijn in graad I perifere chondrosarcomen maar afwezig in osteochondromen. De expressie van deze eiwitten kenmerkt de ontanding van een osteochondroom naar een graad I perifeer chondrosarcom. Dit zou dus mogelijk gebruikt kunnen worden in de dagelijkse pathologie praktijk als marker voor maligniteit. Dit is in **hoofdstuk 6** verder onderzocht met behulp van immunohistochemie op een grote serie osteochondromen en graad I perifere chondrosarcomen. Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat alleen de aanwezigheid van BCL2 expressie een goede marker is voor maligniteit: 57% van de graad I chondrosarcomen was positief voor BCL2, terwijl de osteochondromen allen negatief waren. Bij afwezigheid van BCL2 expressie kan maligniteit dus niet worden uitgesloten.

In **hoofdstuk 5** is aan de hand van mRNA expressie profielen van osteochondromen en graad I secundair perifere chondrosarcomen geprobeerd om nieuwe moleculair biologische markers te vinden. Deze zijn niet gevonden, wat mogelijk verklaard wordt doordat verschillen op RNA niveau slechts heel subtiel kunnen zijn en daardoor niet altijd leiden tot statistisch significante verschillen.

IX. Conclusie

Ruim tien jaar geleden zijn de *EXT*-genen als oorzaak voor erfelijke osteochondromen geïdentificeerd. De rol van deze genen bij het ontstaan van sporadische (niet-erfelijke) tumoren was echter nog steeds niet duidelijk. Eén van de uitgangspunten van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was de opheldering van de rol van de *EXT*-genen in het ontstaan van sporadische osteochondromen. In de kraakbeenskap van sporadische osteochondromen zijn homozygote deleties van het *EXT1*-gen aangetoond. Dus net als in de erfelijke osteochondromen is er in sporadische tumoren inactivatie van beide kopieën van het *EXT1*-gen. Tevens benadrukken deze resultaten de klassieke tumorsuppressie functie van het *EXT1*-gen volgens Knudson's twee-hits-model. Het verlies van het *EXT1*-gen, of in sommige erfelijke gevallen van het *EXT2*-gen, gaat gepaard met het verlies van HSPGs aan het celoppervlak door een verstoorde functie van het EXT1/2 complex. De verschillende HSPG-afhankelijke groeifactor regelkringen worden hierdoor op verschillende manieren ver-

Nederlandse samenvatting

stoord. De IHH-regelkring functioneert autonoom in osteochondromen en de activiteit neemt af tijdens maligne ontarding en progressie als de cellulaire organisatie verdwijnt. In tegenstelling tot de IHH regelkring, is de PTHLH regelkring afwezig in osteochondromen, maar wordt onafhankelijk van IHH geactiveerd tijdens maligne ontarding.