



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Genetics of Ollier disease and Maffucci syndrome

Pansuriya, T.C.

Citation

Pansuriya, T. C. (2012, March 15). *Genetics of Ollier disease and Maffucci syndrome*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18591>

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/1887/18591>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/18591> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Pansuriya, Twinkal C.

Title: Genetics of Ollier disease and Maffucci syndrome

Issue Date: 2012-03-15

Chapter 7

Summary and Concluding Remarks



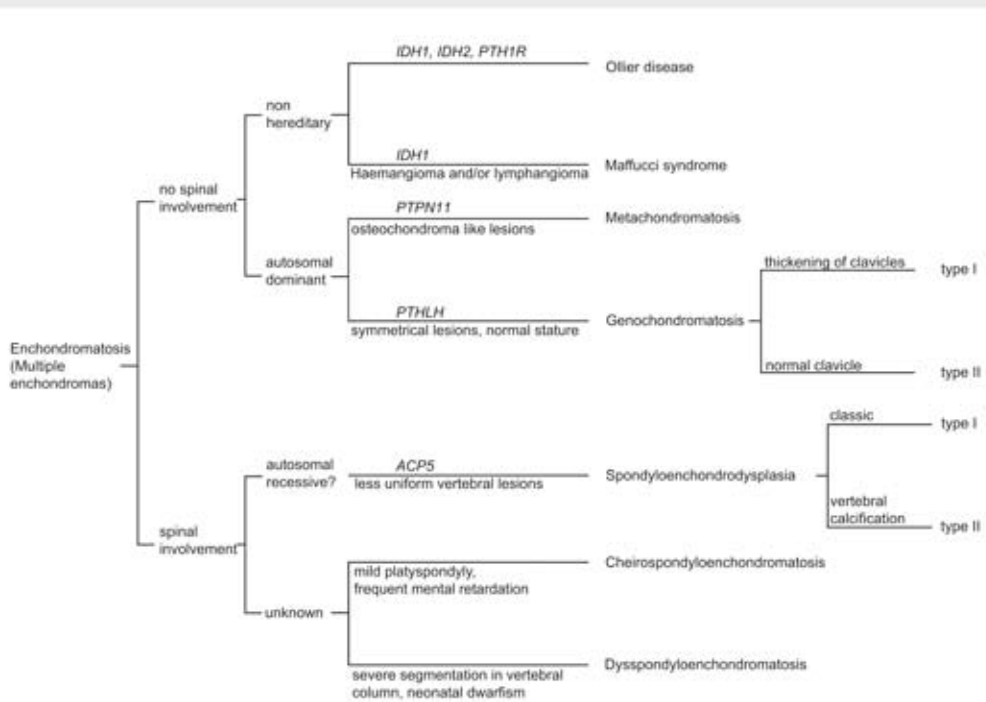
Chapter 1 gives a general introduction of this thesis, describes the aim and research questions. Enchondromatosis is characterized by the presence of multiple enchondromas with a marked unilateral predominance. It includes various subtypes with Ollier and Maffucci syndrome as the most common ones. At present, seven subtypes of enchondromatosis syndromes are recognized including Ollier disease, Maffucci syndrome, metachondromatosis, genochondromatosis, spondyloenchondromatosis, cheiro-spondyloenchondromatosis and dyspondyloenchondromatosis as delineated in **Chapter 2**.

Due to the rarity of these diseases, studies on the genetic cause of Ollier disease are sparse and hampered by low numbers. A small subset of patients with Ollier disease has been reported to have four different types of point mutations in *PTH1R* (1-3). Therefore, the genetic defect involved in the majority of the patients with Ollier disease and Maffucci syndrome was not known. During the course of our studies mutations were found in several other subtypes of enchondromatosis syndromes (summarized in Figure 1). *PTPN11* was found to be mutated in patients with metachondromatosis syndrome (4;5). *PTH1R* nor *PTPN11* were mutated in our patient series with Ollier disease and Maffucci syndrome. *PTPN11* is a protein tyrosine phosphatase and an important intracellular signaling molecule linking several growth factor receptors to the Ras/MAPK and other signaling pathways. Duplication of 12p11.23 to 12p11.22 containing *PTHLH* was found in one patient with symmetrical enchondromatosis (genochondromatosis features as reviewed in **Chapter 2**). Like *PTH1R*, *PTHLH* is also involved in growth plate signaling. Mutations in *ACP5* were found in patients with spondyloenchondrodysplasia (6;7). *ACP5* encodes for tartrate-resistant phosphatase (TRAP) and TRAP is required for processing and/or degradation of osteopontin. Osteopontin is a bone matrix protein that mediates osteoclast substrate adhesion, migration and its dephosphorylation by TRAP reduces the affinity of osteoclast binding to different substrates (7). Over the past years by means of either genomewide (*PTPN11*, *ACP5*, *PTHLH*) or hypothesis driven approach (*PTH1R*, *IDH1*, *IDH2*) the genetic background of the different subtypes of enchondromatosis has been explored in detail (Figure 1).

The aim of the research described in this thesis was to identify the genetic cause of Ollier disease and Maffucci syndrome through molecular analyses. To achieve this goal, we collected a large series of patient materials with the collective efforts of the EuroBoNet and EMSOS networks and used a genome-wide as well as a hypothesis driven approach.

In **Chapter 3**, we have applied genome-wide analysis and reported very few genetic alterations for enchondromas of Ollier diseases. Nonrecurrent copy number alterations were found at *FAM86D*, *PRKG1* and *ANKS1B* in enchondromas. LOH with copy number loss of chromosome 6 was found in enchondromas from two unrelated patients with Ollier disease and one of these patients also showed loss of chromosome 3. There were no common genomic alterations found for all enchondromas. Using an integration approach of SNP and expression array, we screened for *POU5F1* (loss and downregulation) and *NIPBL* (gain and upregulation). Strikingly, none of these candidate regions were affected in more than two patients with Ollier diseases suggesting these changes to be a random secondary event in enchondroma development. Chondrosarcomas from patients with Ollier disease were proven to be genetically unstable. We also found that LOH and copy number alterations were associated with chondrosarcomas and it mainly involved chromosomes 3, 5, 6 and 9.

Figure 1 Enchondromatosis sub-types



Different genes are involved in different subtypes of enchondromatosis syndrome, with the exception of Ollier disease and Maffucci syndrome for which we have now shown that both can be caused by mutations in *IDH1*.

In Chapter 4, we have used the same approach to study tumors related to Maffucci syndrome. Like in chapter 3, we found neither LOH nor common copy number alterations shared by all enchondromas related to Maffucci syndrome, with the exception of some copy number variations. Similar to solitary and Ollier related chondrosarcomas, the chondrosarcomas of Maffucci syndrome were found to have multiple genomic imbalances. Our results are in line with the multistep genetic progression model. Expression profiling using Illumina BeadArray-v3 chip revealed that cartilaginous tumors in Maffucci patients are more similar to tumors in Ollier patients than to solitary cartilage tumors.

Based on findings of the genome-wide approach, we hypothesized that point mutation(s) in a single gene or other copy number neutral genomic changes might play a role in enchondromagenesis. We therefore applied a hypothesis driven approach and studied *NDST1*, *PTH1R*, *IDH1*, *IDH2* and *GNAS* as possible candidate genes.

In **Chapter 5**, we explored possible parallels with multiple osteochondromas therefore we studied *EXT1*, heparan sulfate and *NDST1* in patients with Ollier disease as well as Maffucci syndrome. We found normal protein expression of *EXT1* and heparan sulfate and *NDST1*. Mutation analysis of *NDST1* did not reveal any point mutations that altered the function of *NDST1*.

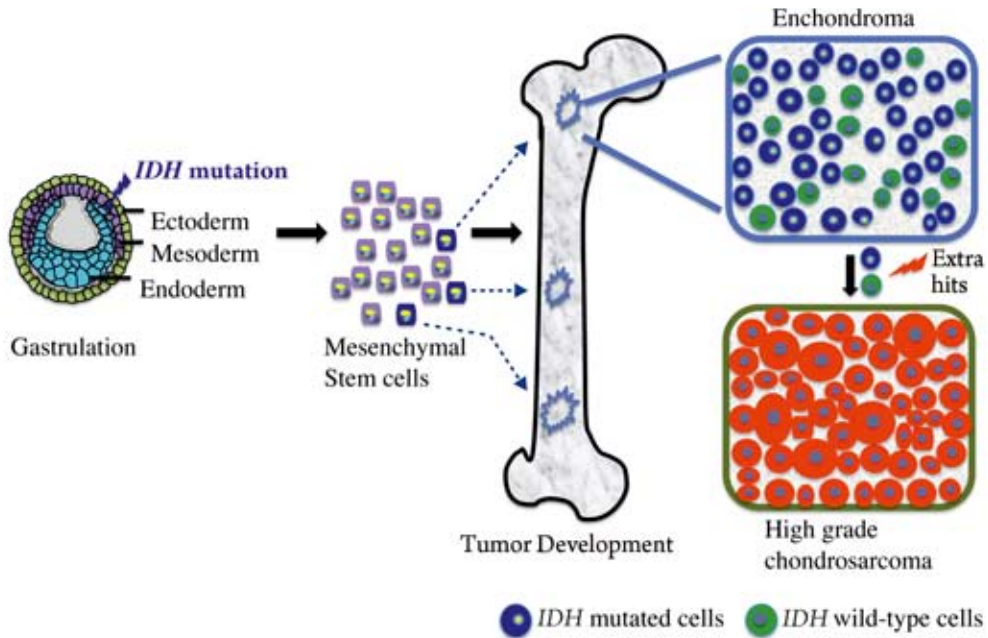
In **Chapter 6**, we have considered *PTH1R*, *IDH1*, *IDH2* and *GNAS* as candidate genes. *PTH1R* is involved in growth plate signaling and mutations were reported in a subset (8%) of patients with Ollier disease (1-3). We screened 35 patients with Ollier disease in which mutations were absent, decreasing the overall mutation rate for *PTH1R* to only ~5%.

Based on the increased incidence of gliomas and juvenile ovarian granulosa cell tumors in Ollier disease and Maffucci syndrome, we screened the *IDH1*, *IDH2* and *GNAS* genes for mutations. *GNAS* mutations were absent in tumors as well as in control DNA from patients. We reported somatic heterozygous *IDH1* (R132C and R132H) or *IDH2* (R172S) mutations in 87% of enchondromas and 70% of spindle cell hemangiomas. With the elucidation of *IDH1* and *IDH2* mutations in patients with Ollier disease (81%) and Maffucci syndrome (77%), we demonstrate that the different enchondromatosis subtypes are caused by mutations in different genes with the exception of Ollier disease and Maffucci syndrome. Using a highly sensitive hydrolysis probes assay, the presence of a subpopulation of cells with an *IDH1* mutation was confirmed. These findings were also supported by using the R132H *IDH1* mutation specific antibody, where we observed presence of tumor cells with and without *IDH1* mutation (intraneoplastic mosaicism, Figure 2), within the tumor. Parallel to our study, Amary et al. reported an additional 40 individuals with Ollier disease and Maffucci syndrome, of which 35 individuals carried *IDH1* or *IDH2* mutations in at least one of their tumors (8).

These results are in line with the hypothesis that the mutation in Ollier disease or Maffucci syndrome should occur early during embryonic development resulting in somatic mosaicism. Using a R132H *IDH1* mutation specific antibody, we also showed mosaic distribution of osteocytes, osteoblasts, adipocytes and fibroblasts in surrounding area of the tumor expressing mutant protein with very low frequency.

Moreover, fourteen of sixteen patients (88%) possessed identical mutations, including a rare variant (R172S *IDH2*), in more than one tumor. These observations support the model that *IDH1* or *IDH2* mutations occur in the mesoderm (from which the skeleton will be formed) during early gastrulation. Thus, a small percentage of mesenchymal stem cells in the body of these patients contain mutations in *IDH1* or *IDH2* and may give rise to the formation of enchondromas at different locations in the skeleton, with a unilateral predominance (Figure 2). Indeed, Amary and colleagues detected 9-16% mosaic mutation levels in bone marrow derived DNA from two unrelated subjects with Ollier disease (8). The facts that Ollier disease and Maffucci syndrome are not familial and that a low level of mosaic somatic can be detected in patients may indicate that mutations at 132 *IDH1* and 172 *IDH2* positions could be embryonically lethal.

Figure 2 Model for enchondroma and secondary central chondrosarcoma development in Ollier disease and Maffucci syndrome



Based on the results from chapter 6 we expect *IDH* mutations to occur early in mesenchymal stem cells in the mesoderm (from which the skeleton will be formed) causing somatic mosaicism underlying multiple enchondromas development. Our results suggest enchondromas consist of *IDH1* or *IDH2* mutated cells intermingled with wild-type cells (intra-neoplastic mosaicism). For secondary central chondrosarcoma an additional hit is postulated to occur in either the *IDH1* or *IDH2* mutated or in wild-type cells.

Amary et al. showed that *IDH* mutations in solitary tumors and tumors related to Ollier disease and Maffucci syndrome are associated with increased levels of 2HG in the tumor (8). The increased 2HG production may result in altered methylation pattern through the genome, as was previously shown for gliomas and acute myeloid leukemia (9;10).

Indeed, in our study we showed that *IDH* mutations are associated with a CpG Island methylator Phenotype in enchondromas. We further hypothesized that due to hypermethylation of several genes the differentiation of chondrocytes into bone is inhibited, resulting in islands of proliferating chondrocytes within the skeleton. There might be a close interaction between mutated and wild-type tumor cells and a paracrine effect of 2HG may prevent the wild-type cells to differentiate towards bone cells.

Enchondromas related to Ollier disease and Maffucci syndrome or solitary enchondromas can progress towards secondary central chondrosarcomas. It was recently shown that the risk of malignant transformation in Ollier disease and Maffucci syndrome is variable and depends on the location of enchondromas; enchondroma restricted to the small bones of hands and/or feet bear a risk of 14% while those in the long bones progress to malignancy in 44-50% (12), which is much higher as compared to solitary tumors in these locations. This might be due to the fact that there are multiple tumors present in Ollier disease and Maffucci syndrome having an additive effect on the probability of malignant transformation. In general, solitary enchondromas are diagnosed accidentally. The malignant transformation rate of solitary enchondroma might therefore be underestimated because in case of presence of symptoms (mainly pain), a lesion is more likely to be diagnosed as low grade chondrosarcoma while the pre-existing enchondroma remains unidentified. It is hypothesized that extra hits are necessary for the malignant transformation of enchondroma which might occur either in *IDH* wild-type or *IDH* mutated chondrocytes (Figure 2). In analogy, for peripheral chondrosarcoma it was recently shown that these predominantly arise in the wild-type cells and not in the *EXT* mutated cells of a mosaic osteochondroma (11). Since *IDH* mutations are present in the majority of enchondromas as well as chondrosarcomas of syndromic as well as non-syndromic conditions, these mutations do not have any diagnostic value in distinguishing enchondromas from low grade chondrosarcomas.

We and others also evaluated the occurrence of *IDH* mutations in other cartilaginous and vascular tumors, and demonstrated that the occurrence of *IDH* mutations was restricted to enchondromas, central chondrosarcomas, periosteal chondrosarcomas and dedifferentiated central chondrosarcomas.

Mutations were absent in soft tissue chondromas, chondromyxoid fibromas, chondroblastomas, osteochondromas, peripheral chondrosarcomas, synovial chondromatosis, mesenchymal chondrosarcomas and clear cell chondrosarcomas (13) (This thesis).

Concluding Remarks

The purpose of this thesis was to identify the underlying genetic changes in Ollier disease and Maffucci syndrome by studying patient's enchondromas and chondrosarcomas. Ultimately, we identified mutations in two genes (*IDH1* and *IDH2*) that were present in the majority of the tumors from patients with Ollier disease and Maffucci syndrome. A subgroup of patients did not show mutations in *IDH1*, *IDH2* or *PTH1R* and therefore, other genes (except *ACP5*, *PTPN11*, *PTHLH*, *GNAS*, *NDST1*) might be involved. Moreover, one can not exclude the possibility of functional links or pathways shared between *IDH1* or *IDH2* with *EXT1*, *EXT2*, *PTH1R*, *PTPN11*, *PTHLH* and *ACP5* (8). A high-resolution, genome-wide, approach like next generation sequencing may facilitate the identification of additional genes. Mutations of other members involved in metabolic pathway (such as D- and L-2- hydroxyglutarate dehydrogenases, malate dehydrogenase) which leads to an increased 2HG production can be anticipated (8). There is also a possibility of presence of mutations in *TET2* (9).

Functional studies to dissect the role of *IDH1* and *IDH2* in Ollier disease and Maffucci syndrome using chondrosarcoma cell-lines with, and without *IDH1* or *IDH2* mutations might shed light onto the pathogenesis of Ollier disease and Maffucci syndrome. Amary et al. confirmed that indeed tumors with *IDH1* mutation produce 2HG (8). We have shown that *IDH1* mutations are associated with hypermethylation and consequently downregulation of several genes. Future studies should clarify whether 2HG is causative for the hypermethylation and how this leads to enchondroma formation. *DLX5* was the most differentially methylated gene between enchondromas with, and without *IDH1* mutations. Future studies could reveal whether down regulation of *DLX5* through methylation as a consequence of *IDH1* mutation delays hypertrophic differentiation of chondrocytes and inhibits subsequent osteogenic differentiation, thereby leaving clusters of proliferating chondrocytes behind.

References

1. Hopyan S, Gokgoz N, Poon R, Gensure RC, Yu C, Cole WG, et al. A mutant PTH/PTHrP type I receptor in enchondromatosis. *Nat Genet* 2002;30(3):306-10.
2. Rozeman LB, Sangiorgi L, Bruijn IH, Mainil-Varlet P, Bertoni F, Cleton Jansen AM, et al. Enchondromatosis (Ollier disease, Maffucci syndrome) is not caused by the PTHR1 mutation p.R150C. *Hum Mutat* 2004;24(6):466-73.
3. Couvineau A, Wouters V, Bertrand G, Rouyer C, Gerard B, Boon LM, et al. PTHR1 mutations associated with Ollier disease result in receptor loss of function. *Hum Mol Genet* 2008;17(18):2766-75.
4. Bowen ME, Boyden ED, Holm IA, Campos-Xavier B, Bonafe L, Superti Furga A, et al. Loss-of-Function Mutations in PTPN11 Cause Metachondromatosis, but Not Ollier Disease or Maffucci Syndrome. *PLoS Genet* 2011;7(4):e1002050.
5. Sobreira NL, Cirulli ET, Avramopoulos D, Wohler E, Oswald GL, Stevens EL, et al. Whole-genome sequencing of a single proband together with linkage analysis identifies a Mendelian disease gene. *PLoS Genet* 2010;6(6):e1000991.
6. Briggs TA, Rice GI, Daly S, Urquhart J, Gornall H, Bader-Meunier B, et al. Tartrate-resistant acid phosphatase deficiency causes a bone dysplasia with autoimmunity and a type I interferon expression signature. *Nat Genet* 2011;43(2):127-31.
7. Lausch E, Janecke A, Bros M, Trojandt S, Alanay Y, De LC, et al. Genetic deficiency of tartrate-resistant acid phosphatase associated with skeletal dysplasia, cerebral calcifications and autoimmunity. *Nat Genet* 2011;43(2):132-7.
8. Amary MF, Damato S, Halai D, Eskandarpour M, Berisha F, Bonar F, et al. Ollier disease and Maffucci syndrome are caused by somatic mosaic mutations of IDH1 and IDH2. *Nat Genet* 2011; doi:10.1038/ng.994.
9. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010;18(6):553-67.
10. Noshmeh H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010;17(5):510-22.
11. de Andrea CE, Reijnders CM, Kroon HM, de JD, Hogendoorn PC, Szuhai K, et al. Secondary peripheral chondrosarcoma evolving from osteochondroma as a result of outgrowth of cells with functional EXT. *Oncogene* 2011; doi: 10.1038/nc.2011.311.
12. Verdegaaal SHM, Bovée JVMG, Pansuriya TC, Grimer RJ, Ozger H, Jutte PC, et al. Incidence, predictive factors and prognosis of chondrosarcoma in patients with Ollier disease and Maffucci syndrome; an international multicenter study of 161 patients. *The Oncologist* 2011.
13. Damato S, Alorjani M, Bonar F, McCarthy SW, Cannon SR, O'Donnell P, et al. IDH1 mutations are not found in cartilaginous tumours other than central and periosteal chondrosarcomas and enchondromas. *Histopathology* 2011; DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.04010.

Hoofdstuk 7 Nederlandse Samenvatting

Hoofdstuk 1 geeft een algemene inleiding van dit proefschrift, beschrijft het doel en de onderzoeksvragen. Enchondromatosis wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van multipale enchondromen in het skelet, waarbij de ene zijde van het lichaam vaak ernstiger is aangedaan dan de andere zijde. Het omvat verschillende subtypes waarvan de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci het meest voorkomen. Momenteel worden zeven subtypes van enchondromatosis erkend waaronder de ziekte van Ollier, het syndroom van Maffucci, metachondromatosis, genochondromatosis, spondyloenchondromatosis, cheiro-spondyloenchondromatosis en dys-spondyloenchondromatosis. In **hoofdstuk 2** worden deze subtypes in detail beschreven.

Wegens de zeldzaamheid van deze aandoeningen is er tot nu toe weinig onderzoek verricht naar de genetische oorzaak van de ziekte van Ollier. Voor een klein deel van de patiënten met de ziekte van Ollier zijn vier verschillende puntmutaties beschreven in *PTH1R* (1-3). Gedurende het beloop van ons onderzoek werden ook mutaties beschreven in enkele andere subtypes van enchondromatosis syndroom (samengevat in hoofdstuk 7 figuur 1). Mutaties in het *PTPN11*-gen werden gevonden in patiënten met metachondromatosis (4; 5). Zowel *PTH1R* als *PTPN11* bleken niet afwijkend te zijn in onze reeks patiënten met de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci. *PTPN11* is een eiwit tyrosine phosphatase en een belangrijke intracellulair signaal transductie molecuul. In één patiënt met symmetrische enchondromatosis (genochondromatosis zoals beschreven in Hoofdstuk 2) werd amplificatie gevonden van chromosoom 12p11.23 tot 12p11.22, het gebied waar het *PTHLH*-gen gelocaliseerd is. Net als *PTH1R*, is *PTHLH* ook betrokken bij de signaaltransductie cascades in de normale groeischijf. In patiënten met spondyloenchondrodysplasia werden afwijkingen in het *ACP5*-gen aangetoond (6; 7). *ACP5* codeert voor tartraat resistent phosphatase (TRAP) en is nodig voor verwerking en/of degradatie van osteopontin, een eiwit in de bot matrix (7). Kortom, door middel van een genoom-wijde (*PTPN11*, *ACP5*, *PTHLH*) of hypothese gerichte benadering (*PTH1R*, *IDH1*, *IDH2*) werd recent de genetische achtergrond van de verschillende subtypes van enchondromatosis in detail onderzocht (zie hoofdstuk 7 figuur 1).

Het doel van het onderzoek zoals dat in dit proefschrift wordt beschreven was de genetische oorzaak van de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci op te helderen door middel van een moleculaire analyse. Om dit doel te bereiken, verzamelden wij materiaal van een grote reeks patiënten, gebruik makend van de onderzoeksnetwerken EuroBoNeT en EMSOS. We gebruikten zowel een genoom-wijde als een hypothese gedreven benadering.

In **hoofdstuk 3** beschrijven wij een genoom-wijde analyse bij de ziekte van Ollier. Het bleek dat de enchondromen van patiënten met de ziekte van Ollier maar weinig genetische veranderingen bevatten. Deze genetische veranderingen betroffen met name *FAM86D*, *PRKG1* en *ANKS1B*, maar dit werd niet in andere enchondromen terug gevonden. Wij vonden verlies van heterozygotie gecombineerd met verlies van een copie van chromosoom 6 in enchondromen van twee niet verwante patiënten met de ziekte van Ollier, en één van deze patiënten toonde ook verlies van chromosoom 3. Er waren echter geen gemeenschappelijke genomische veranderingen die in alle enchondromen werden gevonden.

Door het combineren van de informatie over het aantal kopieën van genen met gen expressie data, identificeerden wij *POU5F1* (verlies en downregulatie) en *NIPBL* (amplificatie en upregulatie). Deze twee kandidaat genen bleken echter niet in meer dan twee patiënten met de ziekte van Ollier aangedaan te zijn. Dit suggereert dat deze veranderingen door toeval zijn ontstaan. Chondrosarcomen van patiënten met de ziekte van Ollier bleken genetisch instabiel te zijn. Daarnaast toonden wij aan dat verlies van heterozygotie en veranderingen in het aantal kopieën met name werd gevonden in chondrosarcomen, en dat dit hoofdzakelijk de chromosomen 3, 5, 6 en 9 betrof.

In **hoofdstuk 4** hebben wij dezelfde benadering gebruikt voor het syndroom van Maffucci. Net als in hoofdstuk 3 vonden wij noch LOH noch gemeenschappelijke veranderingen in het aantal kopieën in alle enchondromen. Net als in solitaire en Ollier gerelateerde chondrosarcomen, waren de chondrosarcomen bij het syndroom van Maffucci genetisch instabiel. Deze resultaten ondersteunen het multistep genetisch progressiemodel. Het genexpressie profiel dat door middel van Illumina beadArray-V3 chip werd bepaald liet zien dat de kraakbeen tumoren bij Maffucci syndroom meer overeenkomen met kraakbeentumoren bij de ziekte van Ollier, dan met solitaire kraakbeentumoren.

Gebaseerd op de bevindingen van de genoom-wijde benadering, stelden wij de hypothese op dat puntmutaties in één enkel gen, of een andere verandering die het aantal kopieën onveranderd laat, ten grondslag ligt aan het ontstaan van een enchondroom. Wij pasten daarom een hypothese gedreven benadering toe en bestudeerden *NDST1*, *PTH1R*, *IDH1*, *IDH2* en *GNAS* als mogelijke kandidaatgenen.

In **hoofdstuk 5** exploreerden wij mogelijke parallellen met multipole osteochondromen. *EXT1*, heparansulfaat en *NDST1* werden bestudeerd in patiënten met de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci. Wij vonden normale eiwit expressie van *EXT1*, heparansulfaat en *NDST1*. Mutatie analyse van het *NDST1* gen leverde geen puntmutaties op.

In **hoofdstuk 6** hebben wij *PTH1R*, *IDH1*, *IDH2* en *GNAS* als kandidaatgenen onderzocht. *PTH1R* is betrokken bij de signaaltransductie cascades in de groeischijf en mutaties zijn beschreven in een subgroep (8%) van de patiënten met de ziekte van Ollier (1-3). Wij onderzochten 35 patiënten met de ziekte van Ollier en vonden geen mutaties. Daarmee daalt het totale percentage *PTH1R* mutaties in patiënten met de ziekte van Ollier naar slechts ~5%.

Gebaseerd op de verhoogde incidentie van gliomen en juveniele granulosa cell tumoren van het ovarium in patiënten met de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci, onderzochten wij de genen *IDH1*, *IDH2* en *GNAS*. *GNAS* mutaties waren afwezig in zowel de tumoren als normaal DNA van patiënten. Wel vonden wij somatische, heterozygote *IDH1* (R132C en R132H) of *IDH2* (R172S) mutaties in 87% van de enchondromen en 70% van de spoelcel hemangiomen. Met de opheldering van *IDH1* en *IDH2* mutaties in patiënten met de ziekte van Ollier (81%) en het syndroom van Maffucci (77%), tonen wij aan dat de verschillende enchondromatosis subtypes veroorzaakt worden door veranderingen in verschillende genen, met uitzondering van de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci welke door hetzelfde gendefect worden veroorzaakt. Met behulp van een sensitieve allel specifieke PCR werd een subpopulatie van cellen aangetoond met een *IDH1* mutatie. Deze bevindingen werden ook ondersteund door het gebruik van immunohistochemie met een *IDH1* R132H specifiek antilichaam, waarmee de aanwezigheid van tumorcellen met en zonder *IDH1* mutatie binnen de tumor werd aangetoond (intra-neoplastisch mosaïcisme, zie hoofdstuk 7 figuur 2).

Parallel aan onze studie, publiceerden Amary et al. 40 extra individuen met de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci, waarvan 35 individuen *IDH1* of *IDH2* mutaties toonden in tenminste één van hun tumoren (8).

Deze resultaten onderschrijven de hypothese dat de mutatie in de ziekte van Ollier of het syndroom van Maffucci vroeg tijdens de embryonale ontwikkeling zou moeten optreden, resulterend in somatisch mosaïcisme. Met behulp van het *IDH1* R132H specifieke antilichaam toonden wij aan dat ook enkele normale osteocyten, osteoblasten, adipocyten en fibroblasten uit het weefsel rondom de tumor mutant eiwit tot expressie brachten. Daarnaast hadden veertien van de zestien patiënten (88%) identieke veranderingen in meer dan één tumor, waarbij ook een zeldzame variant (R172S *IDH2*) werd gezien. Deze bevindingen steunen de hypothese dat *IDH1* of *IDH2* mutaties in de mesoderm ontstaan (waaruit het skelet zal worden gevormd) tijdens de vroege gastrulatie fase. Het gevolg is dat een klein percentage van de mesenchymale stamcellen in het lichaam van deze patiënten mutaties bevatten in *IDH1* of *IDH2*. Dit zou kunnen leiden tot de vorming van enchondromen op verschillende plaatsen in het skelet, waarbij een zijde van het lichaam ernstiger is aangedaan dan de andere zijde (zie hoofdstuk 7 figuur 2). Amary en collega's beschrijven een mozaïek waarin 9-16% gemuteerde cellen worden gevonden in DNA geïsoleerd uit beenmerg van 2 onverwante patiënten met de ziekte van Ollier (8). Het feit dat de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci niet familiair zijn, en dat een somatisch mozaïek wordt gevonden in patiënten, zou erop kunnen duiden dat embryos met veranderingen ter plaatse van de 132 *IDH1* en 172 *IDH2* posities niet levensvatbaar zijn.

Amary et al. toonde aan dat mutaties in *IDH* geassocieerd zijn met verhoogde niveaus van de oncometaboliet 2 hydroxyglutaraat (2HG) in solitaire maar ook in Ollier en Maffucci gerelateerde tumoren (8). De verhoogde 2HG productie kan leiden tot veranderingen in methylering van het genoom, zoals reeds eerder voor gliomen en acute myeloïde leukemie werd aangetoond (9; 10). In onze studie bevestigden wij dat ook in enchondromen het voorkomen van een *IDH* mutatie is geassocieerd met hypermethylering van het genoom. Wij speculeren daarom dat door de hypermethylering van verscheidene genen de differentiatie van chondrocyten naar bot geremd wordt, hetgeen zou kunnen leiden tot de ophoping van clusters prolifererende chondrocyten in het bot. Er zou een nauwe interactie kunnen zijn tussen *IDH* gemuteerde en wild-type cellen, waarbij 2HG via een paracrien effect de wild-type cellen zou kunnen verhinderen om verder te differentieren naar bot.

Enchondromen kunnen progressie vertonen naar een secundair centraal chondrosaroom, zowel bij de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci als wanneer zij solitair voorkomen. Binnen de context van de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci varieert het risico op maligne transformatie naar centraal chondrosaroom afhankelijk van de localisatie van de enchondromen. Enchondromen in de handen en/of voeten hebben een kans van 14%, terwijl enchondromen in de lange pijpbeenderen en/of het axiale skelet een risico van 44-50% op maligne transformatie in zich dragen (12). Dit is veel hoger dan het risico in solitaire tumoren. Dit verschil zou toe te schrijven kunnen zijn aan het feit dat er meerdere tumoren aanwezig zijn bij de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci, welke een additief effect op het risico kunnen hebben. In het algemeen worden solitaire enchondromen vaak per toeval ontdekt.

Het percentage solitaire enchondromen dat progressie vertoont naar chondrosarcoom zou onderschat kunnen worden, omdat een laesie eerder als een laaggradig chondrosarcoom zal worden gediagnostiseerd wanneer er klachten zijn (hoofdzakelijk pijn), waarbij een eventueel onderliggend enchondroom onopgemerkt kan blijven. Het ligt in de lijn der verwachting dat er extra genetische veranderingen nodig zijn voor maligne transformatie. Deze genetische veranderingen kunnen zowel ontstaan in *IDH* wild-type cellen als in *IDH* gemuteerde chondrocyten (zie hoofdstuk 7 figuur 2). Ter vergelijking: in perifere chondrosarcomen toonde men onlangs aan dat deze extra genetische veranderingen met name optraden in de wild-type cellen en niet in de *EXT* gemuteerde cellen van een mozaïsch osteochondroom (11). Aangezien *IDH* mutaties in de meerderheid van de enchondromen alsmede de chondrosarcomen aanwezig zijn, kunnen deze mutaties niet worden gebruikt om het lastige onderscheid tussen enchondromen en laaggradige chondrosarcomen te maken.

Wij en andere onderzoekers evalueerden ook het voorkomen van *IDH* mutaties in andere kraakbeen- en vasculaire tumoren, en toonden aan dat *IDH* mutaties alleen voorkomen in enchondromen, centrale, periostale en gededifferentieerde chondrosarcomen. Mutaties zijn afwezig in weke delen chondromen, chondromyxoid fibromen, chondroblastomen, osteochondromen, perifere chondrosarcomen, synoviale chondromatosis, mesenchymale chondrosarcomen en heldercellige chondrosarcomen (13).

Conclusies

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was de onderliggende genetische veranderingen in de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci te identificeren, door middel van het bestuderen van enchondromen en chondrosarcomen van deze patiënten. Uiteindelijk hebben wij in de meerderheid van de tumoren van patiënten met de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci mutaties geïdentificeerd in twee genen: *IDH1* en *IDH2*. Een kleine restgroep van patiënten toonde geen afwijkingen in *IDH1*, *IDH2* of *PTH1R* en daarom zouden hier andere genen (met uitzondering van *ACP5*, *PTPN11*, *PTHLH*, *GNAS*, *NDST1*) betrokken kunnen zijn. Bovendien kan men vooralsnog een eventuele functionele relatie tussen *IDH1* of *IDH2* en *EXT1*, *EXT2*, *PTH1R*, *PTPN11*, *PTHLH* of *ACP5* (8) niet uitsluiten. Een genoom-wijde benadering door middel van next generation sequencing zou de identificatie van extra genen kunnen vergemakkelijken. Mogelijk is er betrokkenheid van andere genen betrokken bij het metabolisme van de cel (zoals van D- en L-2 hydroxyglutaraat dehydroxygenases, malaat dehydroxygenases) welke eveneens tot een verhoging van 2HG kunnen leiden (8).

Om de rol van *IDH1* en *IDH2* in het ontstaan van de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci verder te ontrafelen kunnen de chondrosarcoom cellijnen met en zonder mutaties in *IDH1* of *IDH2* worden gebruikt voor functionele studies. Deze studies zouden meer licht kunnen werpen op de pathogenese van de ziekte van Ollier en het syndroom van Maffucci. Amary et al. bevestigde reeds dat kraakbeentumoren met *IDH1* mutaties inderdaad 2HG produceren (8). Wij hebben aangetoond dat *IDH1* mutaties geassocieerd zijn met hypermethylering en als gevolg hiervan downregulatie van verscheidene genen. Toekomstige studies zouden moeten verduidelijken of er een causaal verband is tussen verhoogd 2HG en hypermethylering, en hoe dit tot de vorming van enchondromen leidt. *DLX5* was het gen waarbij het verschil in methylering het grootst was tussen enchondromen met en zonder *IDH1* mutatie. Nog onderzocht zal moeten worden of downregulatie van *DLX5* door hypermethylering als gevolg van de *IDH1* mutatie de hypertrofe differentiatie van chondrocyten en de verdere osteogene differentiatie remt, met als gevolg het achterblijven van clusters kraakbeen in het bot.

Referenties

1. Hopyan S, Gokgoz N, Poon R, Gensure RC, Yu C, Cole WG, et al. A mutant PTH/PTHrP type I receptor in enchondromatosis. *Nat Genet* 2002;30(3):306-10.
2. Rozeman LB, Sangiorgi L, Bruijn IH, Mainil-Varlet P, Bertoni F, Cleton Jansen AM, et al. Enchondromatosis (Ollier disease, Maffucci syndrome) is not caused by the PTHR1 mutation p.R150C. *Hum Mutat* 2004;24(6):466-73.
3. Couvineau A, Wouters V, Bertrand G, Rouyer C, Gerard B, Boon LM, et al. PTHR1 mutations associated with Ollier disease result in receptor loss of function. *Hum Mol Genet* 2008;17(18):2766-75.
4. Bowen ME, Boyden ED, Holm IA, Campos-Xavier B, Bonafe L, Superti Furga A, et al. Loss-of-Function Mutations in PTPN11 Cause Metachondromatosis, but Not Ollier Disease or Maffucci Syndrome. *PLoS Genet* 2011;7(4):e1002050.
5. Sobreira NL, Cirulli ET, Avramopoulos D, Wohler E, Oswald GL, Stevens EL, et al. Whole-genome sequencing of a single proband together with linkage analysis identifies a Mendelian disease gene. *PLoS Genet* 2010;6(6):e1000991.
6. Briggs TA, Rice GI, Daly S, Urquhart J, Gornall H, Bader-Meunier B, et al. Tartrate-resistant acid phosphatase deficiency causes a bone dysplasia with autoimmunity and a type I interferon expression signature. *Nat Genet* 2011;43(2):127-31.
7. Lausch E, Janecke A, Bros M, Trojandt S, Alanay Y, De LC, et al. Genetic deficiency of tartrate-resistant acid phosphatase associated with skeletal dysplasia, cerebral calcifications and autoimmunity. *Nat Genet* 2011;43(2):132-7.
8. Amary MF, Damato S, Halai D, Eskandarpour M, Berisha F, Bonar F, et al. Ollier disease and Maffucci syndrome are caused by somatic mosaic mutations of IDH1 and IDH2. *Nat Genet* 2011; doi:10.1038/ng.994.
9. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010;18(6):553-67.
10. Noshmeh H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010;17(5):510-22.
11. de Andrea CE, Reijnders CM, Kroon HM, de JD, Hogendoorn PC, Szuhai K, et al. Secondary peripheral chondrosarcoma evolving from osteochondroma as a result of outgrowth of cells with functional EXT. *Oncogene* 2011; doi: 10.1038/onc.2011.311.
12. Verdegaaal SHM, Bovée JVMG, Pansuriya TC, Grimer RJ, Ozger H, Jutte PC, et al. Incidence, predictive factors and prognosis of chondrosarcoma in patients with Ollier disease and Maffucci syndrome; an international multicenter study of 161 patients. *The Oncologist* 2011.
13. Damato S, Alorjani M, Bonar F, McCarthy SW, Cannon SR, O'Donnell P, et al. IDH1 mutations are not found in cartilaginous tumours other than central and periosteal chondrosarcomas and enchondromas. *Histopathology* 2011; DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.04010.

