

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/32718> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Verbeke, Sofie Lieve Jozef

**Title:** Primary vascular tumours of bone: towards a new classification based on pathology and genetics

**Issue Date:** 2015-04-14



# 9

**Nederlandse samenvatting**



## Introductie

**Hoofdstuk 1** benadrukt de noodzaak voor meer specifieke morfologische, immuunhistochemische en/of moleculaire testen die de classificatie van de verschillende vaattumoren van het bot kunnen ondersteunen. Aangezien vaattumoren gelokaliseerd in de weke delen frequenter voorkomen en dus ook gemakkelijker beschikbaar zijn voor aanvullend onderzoek, zijn deze tumoren in de loop der jaren zowel morfologisch als op moleculair niveau beter omschreven. Vaattumoren gelokaliseerd in het bot moeten eerst ontkalkt worden voordat deze in de dagelijkse praktijk histologisch onderzocht kunnen worden. Deze ontkalkingstechniek heeft echter een ernstige negatieve invloed op de DNA kwaliteit. Tot op heden is het nog steeds niet duidelijk of vaattumoren van het bot vergelijkbaar zijn met hun tegenhanger in de weke delen, en dus alleen verschillen in lokalisatie, of dat deze tumoren toch beschouwd dienen te worden als twee verschillende entiteiten met een afzonderlijk moleculair profiel en een verschillend klinisch gedrag.

**Hoofdstuk 2** vat alle verschillende histologische subtypes van vaattumoren van het bot samen, gebaseerd op radiologische beeldvorming, histologie en indien bekend het genetisch profiel, zoals dit voor het verschijnen van de Wereld Gezondheid Organisatie (WGO) classificatie van 2013 gebruikelijk was. Op basis van de destijds beschikbare literatuur is een classificatie schema voorgesteld welke later is overgenomen in de WGO classificatie van 2013<sup>1</sup>.

### Typing van angiosarcomen van het bot gebaseerd op morfologie

In **Hoofdstuk 3** proberen we de hooggradige kwaadaardige vaattumoren (ook wel angiosarcomen genoemd) van het bot nader te omschrijven door een systematische histologische analyse van een grote groep van angiosarcomen van het bot, afkomstig uit verschillende centra voor bottumoren. Voorheen werden uitgesproken kernatypie en veelvuldig voorkomen van celdelingen, met of zonder atypische vormen, gebruikt als belangrijke histologische criteria om kwaadaardigheid in vaattumoren van het bot vast te stellen. Exact meetbare (kwantificeerbare) histologische parameters ontbreken echter nog steeds. In onze dataset van angiosarcomen van het bot is cytonucleaire atypie aanwezig in alle tumoren. Bijna de helft van de tumoren toont kern-hyperchromasie en de celdelingen variëren van 0 tot 9 celdelingen per 10 hoge vergrotingsvelden. Binnen deze groep stelden we, via multivariaat statistisch onderzoek, drie hooggradige histologische parameters vast die samenhangen met een slechte overleving, namelijk: 3 of meer celdelingen per 10 hoge vergrotingsvelden, een macrocroculeolus en de aanwezigheid van minder dan 5 eosinofiele granulocyten per 10 hoge vergrotingsvelden. Het deel van angiosarcomen van het bot die de combinatie van deze drie eigenschappen bevatten, toonden een ernstiger klinisch beloop. Bij nagenoeg een derde van de patiënten bleken meerdere botten aangedaan door de ziekte. Angiosarcomen van het bot tonen een wisselende expressie voor de vaatmarkers CD31, CD34 en Factor VIII en meer dan twee derde toont ook aankleuring voor cytokeratine. Daarnaast toont een grote meerderheid van de tumoren ook een epitheliaal-achtige, zogenaamd epitheloïde, morfologie. Het multifocaal voorkomen (meerdere botten aangedaan), de epitheloïde morfologie samen met de aankleuring voor cytokeratine kan

makkelijk tot de verkeerde diagnose van een uitgezaaide epitheliale tumor leiden. Beeldvorming van goed omschreven, osteolytische (waarbij het bot verdwijnt) afwijkingen die in meerdere botten voorkomen met ook onderbreking van de cortex en opvallende reactie van de omgevende weke delen moeten de radioloog ertoe aanzetten om vaattumoren in de differentiaal diagnose op te nemen, en de patholoog ertoe aansporen om toekomstige immuunhistochemische markers toe te voegen om de vaat-differentiatie van de tumor te bevestigen<sup>2</sup>.

### **Typering van angiosarcomen van het bot gebaseerd op eiwitexpressie in vergelijking met angiosarcomen van de weke delen**

In **Hoofdstuk 4** typeren we de angiosarcomen van het bot door middel van eiwitexpressie gebaseerd op een grote groep van oncogenen, tumorsupressor genen en signaalmoleculen. Daarnaast werd een hotspot mutatie analyse verricht voor PIK3CA, KRAS en BRAF. In dit proefschrift tonen we aan dat meer dan de helft van de angiosarcomen van het bot een verstoring van de retinoblastoom (Rb) route laat zien, veroorzaakt door ofwel verlies van CDKN2A expressie ofwel door overexpressie van Cycline D1. In tegenstelling tot angiosarcomen van de weke delen, lijkt de TP53 route niet belangrijk bij angiosarcomen van het bot. De verstoring van de Rb route suggereert dat angiosarcomen behoren tot de groep van sarcomen met een complex genetisch profiel. Daarnaast tonen we ook aan dat de TGF-beta route erg actief is in angiosarcomen van het bot en dus een mogelijke rol speelt in de tumorontwikkeling. Aangezien er reeds producten voorhanden zijn die deze TGF-beta route kunnen blokkeren, impliceren deze bevindingen ook mogelijke therapeutische opties voor angiosarcomen van het bot. We tonen ook aan dat de PI3K/Akt route zowel in angiosarcomen van het bot als in de weke delen actief is, maar gezien het verschil in eiwitexpressie is er vermoedelijk een ander activatiemechanisme. In bijna de helft van de angiosarcomen van het bot kan dit verklaard worden door de afname van expressie van PTEN, terwijl dit slechts in 7% van de angiosarcomen van de weke delen wordt gezien. Hoewel er in de literatuur slechts bij één angiosarcoom van de lever een *PTEN* genmutatie is gerapporteerd, is het tot op heden onduidelijk of *PTEN* mutaties aanwezig zijn in angiosarcomen van het bot. Het is bekend dat genetische afwijkingen in de PI3K/Akt route, zoals PIK3CA mutaties, aanleiding kunnen geven tot kwaadaardige tumoren. De mogelijke rol van de PI3K/Akt route in angiosarcomen van het bot leidt tot de achterliggende gedachte dat stoffen die de PI3K/Akt-route kunnen blokkeren behulpzaam zouden kunnen zijn in de behandeling van deze tumoren. Nader onderzoek is hiervoor echter noodzakelijk. In 90% van de angiosarcomen van de weke delen wordt de tyrosine kinase receptor KIT tot overexpressie gebracht, dit is slechts in 17% van de angiosarcomen van het bot aanwezig. Er is één publicatie van een goede respons op imatinib (Glivec) in een angiosarcoom van de weke delen, ondanks dat er geen KIT of PDGFRA mutaties in deze tumoren werden aangetoond<sup>3</sup>.

### **Typering van angiosarcomen van het bot op moleculair niveau in vergelijking met angiosarcomen van de weke delen**

In de meeste pathologie laboratoria gebeurt de ontkalking van botbevattend materiaal in de dagelijkse praktijk op basis van mierenzuur. Deze methode zorgt voor DNA afbraak waardoor

de DNA kwaliteit sterk vermindert. De lengte van de DNA fragmenten die van deze stalen verkregen worden, zijn vaak kleiner dan 150–200 baseparen, waardoor moleculaire testen enigszins bemoeilijkt worden. Ten einde onze groep van angiosarcomen van het bot, een groep die voornamelijk bestaat uit ontkalkt en in formaline gefixeerd en in paraffine ingebedde weefselblokjes, te kunnen typeren middels een moleculaire test, moesten we eerst deze technische hindernis omzeilen. Derhalve hebben we eerst de array-CGH techniek geoptimaliseerd en gevalideerd op verschillende bottumoren die in verschillende instituten uitgebreid ontkalkt zijn en vervolgens in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed, zoals beschreven in **Hoofdstuk 5**. In dit proefschrift gebruiken we oligonucleotide gebaseerde array chips die reporter elementen van ~60 baseparen bevatten. Omdat enzymatische labeling verdere fragmentatie van het DNA kan veroorzaken, worden twee verschillende labelingstechnieken uitgetest. De eerste methode betreft een directe chemische labeling (Universal Linkage System) zonder verdere fragmentatie van het DNA, terwijl de tweede methode een commercieel verkrijgbare ‘random primer labeling’ set is speciaal ontworpen voor DNA verkregen uit formaline gefixeerd en in paraffine ingebed weefsel. Beide labelingsmethodes bleken goed reproduceerbaar en tonen gelijkwaardige resultaten bij gebruik van 500 ng DNA als startmateriaal. Daarnaast werden de DNA concentraties op twee verschillende manieren gemeten: een DNA concentratie meting gebaseerd op absorptie, en ethidium-bromide gekleurde gel-electroforese. We tonen aan dat een schatting van de DNA concentratie belangrijker is voor een positief testresultaat dan de DNA kwaliteit (grootte van de fragmenten) van het DNA verkregen uit formaline gefixeerd en in paraffine ingebed weefsel.

Na optimalisatie, hebben we deze techniek toegepast in **Hoofdstuk 6** om op deze manier het genomisch profiel te verkrijgen van een eerste grote groep van angiosarcomen van het bot, in vergelijking met een kleine groep van angiosarcomen van de weke delen. In deze studie tonen we aan dat er geen evident moleculair verschil is tussen beide groepen. Daarentegen stellen we vast dat er twee groepen angiosarcomen zijn, namelijk angiosarcomen met een complex genetisch profiel en angiosarcomen met weinig of geen genetische afwijkingen. Hoewel eerdere resultaten in dit proefschrift een mogelijk rol van de Rb en/of TP53 route suggereren, wordt er in deze studie geen verband aangetroffen tussen de Rb/TP53 route en een complex genetisch profiel. Eén angiosarcoom van de weke delen toont de aanwezigheid van MYC amplificatie, dit zonder een voorgeschiedenis van radiotherapie of chronisch lymfoedeem, en ‘high-level’ amplificatie van regio 5q, de regio die het *FLT4* en *MAPK9* (*JNK2*) gen bevat. In het overgrote deel van angiosarcomen (bot en weke delen) tonen wij hoge eiwit expressie aan van MAPK9 (*JNK2*), onafhankelijk van de aan- of afwezigheid van genomische amplificatie van deze regio. Een mogelijke rol van JNK2 bij vaat tumoren werd nog niet eerder beschreven, hoewel TGF-beta JNK2 kan activeren. Daarom lijkt het aannemelijk dat de aanwezigheid van JNK2 expressie verklaard kan worden door de hoge expressie van TGF-beta, welke we reeds eerder in **Hoofdstuk 4** aangetoond hebben. Eén angiosarcoom van het bot toonde een amplificatie ter hoogte van regio 1p36, welke onder andere het SKI (Sloan Kettering Institute proto-oncoprotein)-gen bevat. SKI is niet alleen betrokken bij talrijke signaalroutes (de meest bekende functie is de negatieve regulatie van het TGF-beta signaal), maar kan ook kanker progressie bevorderen en

wordt in verschillende tumorsoorten hoog tot expressie gebracht. In dit onderzoek tonen we aan dat SKI in zowel angiosarcomen van het bot als de weke delen hoog tot expressie wordt gebracht. Hoewel er al eerdere publicaties zijn die suggereren dat de overexpressie van SKI een rol zou kunnen spelen in tumorgroei en bloedvatvorming, blijft de specifieke rol van SKI in de bloedvatvorming onduidelijk. Hoewel binnen onze groep de drempel (25%) voor terugkerende genetische afwijkingen niet bereikt werd, tonen 3 angiosarcomen een 'high-level' amplificatie van chromosoom 2q en 17q. High-level amplificatie van 17q23 is eerder al beschreven in verschillende tumorsoorten. Met name in borsttumoren wordt er verondersteld dat er een relatie is met tumor progressie en een slechte prognose. Tot op vandaag is high-level amplificatie van 2q32-34 niet eerder beschreven.

### **Haemangiopericytoom van het bot: een bestaande entiteit?**

Sinds de 2002 WGO Classificatie voor Weke Delen en Bottumoren, is het haemangiopericytoom van de weke delen niet langer erkend als een unieke entiteit. Het is algemeen aanvaard dat deze afwijkingen beter ingedeeld worden als solitaire fibreuze tumoren, monofasisch synoviosarcoom en (infantiele) myofibromatosis of myofibroblastaire laesies<sup>4</sup>. In Hoofdstuk 7 vergelijken we de bottumoren met hun tegenhangers in de weke delen door een relatief grote groep van tumoren die eerder als “haemangiopericytoom van het bot” werden gediagnosticeerd te bestuderen. Op basis van een histologische herbeoordeling, worden er 2 histologische hoofdpatronen herkend: een groep van zes tumoren toont een patroonloze architectuur, variabele celrijkdom met monomorfe tumorcellen zonder opvallende kernen die ook geen overlap tonen en omgeven worden door een beperkte hoeveelheid eosinofiel cytoplasma en onscherpe celgrenzen, inpasbaar met de morfologie van een solitaire fibreuze tumor. Een tweede groep van drie tumoren wordt gekenmerkt door een bundelige opbouw van uniforme, niet pleiomorfe spoelvormige cellen met een geringe hoeveelheid cytoplasma, kernoverlap en onscherpe celgrenzen, overeenkomstig met de morfologie van een synoviosarcoom. Deze histologische bevindingen worden in de meerderheid van de gevallen ondersteund door immunohistochemie en/of een moleculaire test, namelijk SS18-FISH. Op het moment van de evaluatie van deze tumoren was er nog geen specifieke translocatie en/of specifieke immunohistochemische marker bekend die de diagnose van solitaire fibreuze tumor kon ondersteunen. Recent is er in solitaire fibreuze tumoren van de weke delen en de hersenen een specifieke *NAB2-STAT6* fusieproduct beschreven<sup>5</sup>. Daarnaast is er ook een commercieel verkrijgbaar antilichaam gericht tegen *STAT6*, waarvan bewezen is dat het behulpzaam is bij het stellen van de diagnose van solitaire fibreuze tumoren. Door de fusie met *NAB2* transloceert *STAT6*, wat normaal gesproken in het cytoplasma aanwezig is naar de kern<sup>6</sup>. In dit proefschrift bevestigen we dat, net zoals in de weke delen, haemangiopericytoma van het bot louter staat voor een groeipatroon in plaats van een zuivere aparte entiteit. In dit opzicht is het gebruik van *STAT6* immunohistochemie en/ of SS18-FISH wenselijk in de diagnostische opwerking van spoelcellige tumoren met een hemangiopericytoom-achtig vaatpatroon.

## Toekomstmogelijkheden

In dit proefschrift hebben we het meest kwaadaardige deel van de vaattumoren van het bot omschreven. Dit zijn uiterst zeldzame tumoren waardoor samenwerking met meerdere, verschillende instituten noodzakelijk is. Dankzij een samenwerking binnen het EuroBoNeT consortium, een door de Europese Commissie gesubsidieerd Netwerk van Excellentie voor het bestuderen van pathologie en genetica van bottumoren dat de multicentrische samenwerking binnen Europa stimuleert, was dit onderzoek mogelijk.

Alhoewel we in **Hoofdstuk 3** drie hoog-risico histologische parameters konden aantonen die een verband tonen met een slechte prognose, tonen niet alle angiosarcomen deze drie kenmerken en een klein deel van deze tumoren toont een ander, zelfs iets beter, klinisch beloop. Tot op heden is er geen overtuigend bewijs voor het bestaan van laaggradige angiosarcomen van het bot, ook wel haemangioendotheliomen genoemd, als een separate entiteit. Array-CGH onderzoek, verricht in **Hoofdstuk 6**, toont enkel 2 subgroepen van angiosarcomen (met of zonder complex genomisch profiel) aan, waarbij er ook geen verband aantoonbaar was met de prognose. Hieruit leiden we af dat de resultaten van de array-CGH geen diagnostische of prognostische markers leveren die behulpzaam kunnen zijn bij de indeling van angiosarcomen van het bot of een onderscheid kunnen maken tussen angiosarcomen met een slechte prognose (2 jaarsoverleving 0%) en angiosarcomen met een enigzins betere prognose (5 jaarsoverleving 33%). Hierbij dient opgemerkt te worden dat gebalanceerde genomische veranderingen, zoals gebalanceerde translocaties en inversies alsmede puntmutaties in het DNA, niet gedetecteerd worden middels array-CGH. Meerdere recente studies van specifieke entiteiten binnen de vaattumoren, zoals bijvoorbeeld het epitheloid haemangioendotheliom, pseudomyogeen haemangioendotheliom en zelfs het epitheloid haemangioom, hebben specifieke gebalanceerde translocaties in deze tumoren aangetoond. De Nieuwe Generatie Sequencing-technologie (Next Generation Sequencing, NGS) zou daarmee ook zeer interessant zijn voor toepassing op angiosarcomen van het bot: hoofdzakelijk om te bestuderen of specifieke genetische veranderingen aanwezig zijn in angiosarcomen van het bot en indien dit het geval is, of deze genetische veranderingen een verband tonen met de morfologie en het klinisch beloop. Daarnaast zouden specifieke genetische veranderingen opheldering kunnen geven omtrent de tumorgenese en daaruit zouden eventuele nieuwe therapeutische strategieën kunnen voortvloeien. Tot op heden is deze techniek echter niet geschikt voor (ontkalkt) materiaal verkregen uit formaline gefixeerd en in paraffine ingebed weefsel.

Op basis van genomisch onderzoek van één angiosarcoom dat op meerdere plaatsen in de voet gelokaliseerd is, kunnen we in dit proefschrift geen cytogenetisch zichtbare gebalanceerde herschikking aantonen (Hoofdstuk 5). Recente studies hebben echter identieke veranderingen aangetoond in multifocale vaatlesies binnen één patiënt. Alle onderzochte tumoren van een epitheloid haemangioendotheliom bij een zelfde patiënt bevatten een translocatie met identiek breekpunt<sup>8</sup>, en meerdere enchondromen en spoelcellige goedaardige vaatafwijkingen (haemangiomen) in patienten met het Maffucci syndroom bevatten allen de R132C hotspot mutatie<sup>7</sup>. Deze bevindingen ondersteunen de gedachte van een klonale aandoening en



impliceren dat de tumor nodi eerder uitzaaiingen zijn, dan gelijktijdig ontstane tumorklonen<sup>8</sup>. NGS testen van meerdere tumorstalen van een zelfde patient zou in dit opzicht erg interessant en behulpzaam zijn in de ontrafeling van de klonale evolutie van deze lesies.

Hoewel het nog steeds niet duidelijk is of angiosarcomen van het bot nu daadwerkelijk verschillend zijn van angiosarcomen van de weke delen, of dat deze tumoren behoudens het verschil in lokalisatie toch als één groep beschouwd dienen te worden, hebben we in **Hoofdstuk 6** aangetoond dat op basis van de array-CGH resultaten geen evident genetisch verschil aantoonbaar is tussen beide groepen. Op basis van het immuunhistochemisch onderzoek verricht in hoofdstuk 4 is er echter wel een duidelijk verschil in eiwitexpressie tussen beide groepen. We hebben aangetoond dat TGF-beta route actiever is in angiosarcomen van het bot, waarbij de PI3K/Akt route actief is in zowel angiosarcomen van het bot als de weke delen. Aangezien deze tumoren een gelijkwaardige morfologie en genetisch profiel hebben, kan het verschil in eiwitexpressie en activatie van verschillende routes veroorzaakt worden door epigenetische veranderingen of door verschillen in tumor-omgeving. Deze verschillen hebben mogelijk ook therapeutische implicaties. Om dit nader te onderzoeken is er behoefte aan goede *in vitro* modellen en is het wenselijk om een cellijn afkomstig van een angiosarcoom van het bot te ontwikkelen.

## References

1. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. WHO Classification of tumours of Soft Tissue and Bone. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2013.
2. Vermaat M, Vanel D, Kroon HM, et al. Vascular tumors of bone: Imaging findings. *Eur. J. Radiol.* 2011 Jan;**77**(1):13-18.
3. Kiesel H, Muller AM, Schmitt-Graeff A, Veelken H. Dramatic and durable efficacy of imatinib in an advanced angiosarcoma without detectable KIT and PDGFRA mutations. *Cancer Biol. Ther.* 2009 Feb;**8**(4):319-321.
4. Fletcher CD. Haemangiopericytoma – A dying breed? Reappraisal of an ‘entity’ and its variants: a hypothesis. *Current Diagnostic Pathology* 1994;**1**(1):19-23.
5. Mohajeri A, Tayebwa J, Collin A, et al. Comprehensive genetic analysis identifies a pathognomonic NAB2/STAT6 fusion gene, nonrandom secondary genomic imbalances, and a characteristic gene expression profile in solitary fibrous tumor. *Genes Chromosomes. Cancer* 2013 Oct;**52**(10):873-886.
6. Doyle LA, Vivero M, Fletcher CD, Mertens F, Hornick JL. Nuclear expression of STAT6 distinguishes solitary fibrous tumor from histologic mimics. *Mod. Pathol.* 2014 Mar;**27**(3):390-395.
7. Errani C, Zhang L, Sung YS, et al. A novel WWTR1-CAMTA1 gene fusion is a consistent abnormality in epithelioid hemangioendothelioma of different anatomic sites. *Genes Chromosomes. Cancer* 2011 Aug;**50**(8):644-653.
8. Pansuriya TC, Van ER, d’Adamo P, et al. Somatic mosaic IDH1 and IDH2 mutations are associated with enchondroma and spindle cell hemangioma in Ollier disease and Maffucci syndrome. *Nat. Genet.* 2011 Dec;**43**(12):1256-1261.

