



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Molecular profiling of solitary and Ollier disease-related central chondrosarcomas: An investigation of DNA aberrations, mRNA and protein expression

Rozeman, L.B.

Citation

Rozeman, L. B. (2005, October 13). *Molecular profiling of solitary and Ollier disease-related central chondrosarcomas: An investigation of DNA aberrations, mRNA and protein expression*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3482>

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/1887/3482>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Moleculaire opmaak van solitaire en Morbus Ollier gerelateerde centrale chondrosarcomen:

Een onderzoek naar DNA afwijkingen, mRNA en eiwit expressie.

INHOUD

I Expressie analyse van centrale chondrosarcomen

I.a. Specifieke (hypothese gerelateerde) expressie analyse

I.a.i. CDKN2A

I.a.ii. JUNB

I.a.iii. IHH en PTHLH signalering

I.b. Algemene gen expressie analyse

II Genetische veranderingen in centrale chondrosarcomen

III Model voor tumorvorming

IV Conventionele centrale chondrosarcoom subtypes

IV.a. Tumoren gelokaliseerd in vingers en tenen

IV.b. Tumoren in de context van enchondromatose

V Conclusies en samenvatting

Chondrosarcomen zijn kwaadaardige kraakbeen-producerende tumoren. Deze tumoren zijn zeldzaam en groeien meestal langzaam. Het merendeel behoort - microscopisch gezien - tot de subgroep conventionele chondrosarcomen. Binnen deze groep worden er 3 graden van maligniteit onderscheiden (graad I-III). De tumoren met de hoogste graad hebben een slechtere prognose. Binnen de groep van conventionele chondrosarcomen zijn twee groepen te onderscheiden op basis van waar deze zich bevinden ten opzichte van het bot waarvan ze uitgaan en al of niet bestaan van een goedaardige voorloper. Het perifere chondrosarcoom dat altijd ontstaat aan het oppervlak in de kraakbeencap van zijn goedaardige tegenhanger het osteochondroom, en het centrale chondrosarcoom dat primair centraal in het bot gelegen is en kan al of niet ontstaan zijn in een goedaardige voorloper, genaamd enchondroom. Deze centrale chondrosarcomen zijn het meest voorkomend ($\pm 80\%$). Dit proefschrift concentreert zich op deze specifieke groep tumoren.

Enchondromen zijn meestal solitair, dat wil zeggen dat er per patiënt maar één tumor wordt gevonden. Er zijn echter patiënten waarbij meerdere van deze tumoren voorkomen. Deze mensen lijden aan een syndroom genaamd “enchondromatose”. Binnen dit syndroom wordt er onderscheid gemaakt tussen verschillende subtypen waarvan Morbus Ollier (M. Ollier) en het Maffucci syndroom het meest voorkomend zijn.

Naast graad is ook de lokalisatie in het skelet van de tumoren van belang voor de prognose. De tumoren gelegen in de botten van de vingers en tenen tonen, in tegenstelling tot wat hun histologie doet denken, een relatief gunstige prognose.

I. Expressie analyse van central chondrosarcomen

Het onderliggend mechanisme van de ontaarding van enchondromen naar laaggradige chondrosarcomen is onbekend. Ook zijn er geen moleculaire merkers bekend die kunnen helpen om het verschil tussen deze benigne en maligne tumoren te verduidelijken. Dit zou goed van pas komen omdat het verschil soms moeilijk vast te stellen is door de patholoog. Daarnaast is het histologische graderingsstelsel wat wordt gebruikt voor deze tumoren niet altijd glashelder, doordat de histologische kenmerken die van belang zijn voor de gradering verschillend geïnterpreteerd kunnen worden.

Chondrosarcomen zijn een van de weinige mesenchymale tumoren waarbij progressie in graad kan plaatsvinden. Het bestuderen van expressie niveaus in de verschillende graden kan daarom aanwijzingen geven wat betreft de mechanismen die betrokken zijn bij dit proces van progressie en de daaraan gecorreleerde risico's op metastase en tumor gerelateerd overlijden.

I.a. Specifieke (hypothese gerelateerde) expressie analyse

RNA en eiwit expressie is onderzocht in de **hoofdstukken 3** (CDKN2A), **5** (IHH en PTHLH signaal transductie) en **6** (JUNB).

I.a.1. CDKN2A

Het gen (CDKN2A) coderend voor het eiwit genaamd p16 (betrokken bij de regulatie van cel groei en deling en zo genoemd naar aanleiding het molecuul gewicht van dit eiwit) ligt in

een regio van het genoom (9p21; een gebied op de korte arm van chromosoom 9, band p21) dat gedeeltelijk verloren is gegaan in een deel van de centrale chondrosarcomen. Gecombineerde analyse van zowel het mogelijk verlies van de regio 9p21 en de mate van eiwitexpressie van p16 liet zien dat verlies van de regio en p16 eiwitexpressie voornamelijk iets is dat voorkomt in hooggradige chondrosarcomen (**hoofdstuk 3**). Er is echter geen relatie gevonden tussen het verlies van p16 eiwitexpressie, het verlies van het stukje genoom 9p21, of de aanwezigheid van methylering van het gen (een mechanisme dat kan zorgen voor een verminderde eiwitexpressie). Daarom is er waarschijnlijk een ander, nog niet geïdentificeerd, mechanisme actief dat leidt tot verminderde expressie van p16. Verlies van het eiwit p16 speelt een rol in de progressie van chondrosarcomen. Dit is een gegeven dat ook beschreven is bij andere tumoren zoals het rondcel liposarcoom.

I.a.ii. JUNB

JUNB is een van de genen die een klein, maar niet significant, verschil heeft gegeven bij de vergelijking van M. Ollier gerelateerde graad II chondrosarcomen met solitaire graad II chondrosarcomen zoals beschreven in **hoofdstuk 6**. Het eiwit *JUNB* maakt deel uit van een familie van transcriptie factoren (factoren die op basis van hun kenmerken het afschrijven van genen zowel positief als negatief kunnen beïnvloeden), genaamd AP-1. Deze factor speelt een rol bij de controle van groei en differentiatie van kraakbeen. Muizen waarbij *JunB* experimenteel is uitgeschakeld laten een gereduceerde groei van zowel kraakbeen als botvormende cellen zien.

Bij de analyse van *JUNB* eiwitexpressie in een grotere groep tumoren - opgesplitst in solitaire en M. Ollier gerelateerde tumoren - is er echter geen verschil gezien tussen deze twee groepen. Er is wel een verschil gevonden in eiwitexpressie tussen enchondromen en laaggradige chondrosarcomen. Hierbij is een toename van expressie geconstateerd in de chondrosarcomen. Dit suggereert dat *JUNB* expressie mogelijk kan worden gebruikt om het onderscheid tussen enchondromen en laaggradige chondrosarcomen te maken.

I.a.iii. IHH en PTHLH signaal transductie

In de **hoofdstukken 1 en 2** wordt de signaaltransductie regelkring zoals die beschreven is voor Indian Hedgehog (IHH) en parathyroid hormoon-gelijklend hormoon (PTHLH) geïntroduceerd. IHH komt aan zijn naam omdat wanneer een eiwit dat er veel op lijkt, in de fruitvlieg wordt verwijderd dit leidt tot een larve met allemaal stekeltjes (engels: "hedgehog"), de naamgeving Indian komt van het feit dat dit gen als eerste werd ontdekt in India. De IHH/PTHLH regelkring speelt een belangrijke rol in de normale groei en ontwikkeling van de groeischijf. In erfelijke osteochondromen, de goedaardige tegenhangers van perifere chondrosarcomen, is de signaaltransductie van deze regelkring beïnvloed door mutaties in de genen *EXT1* en *EXT2*. Daarom zijn de expressie niveaus van moleculen betrokken bij deze regelkring in enchondromen en centrale chondrosarcomen bestudeerd in **hoofdstuk 5**. De moleculen zijn bestudeerd op eiwit niveau (immunohistochemie) voor PTHLH, PTHR1 (de receptor voor PTHLH), BCL2 (een eiwit betrokken bij het geprogrammeerde sterfproces van de cel), p21, cycline D1 en cycline E (drie eiwitten betrokken bij de regulatie van de cel

deling). Op RNA niveau is er gekeken naar *IHH*, *PTCH* (patched, de receptor van IHH), *SMOH* (smoothened, een eiwit dat vast kan zitten aan PTCH en een rol speelt bij het doorgeven van het signaal) en *GLI2* (een eiwit dat codeert voor een transcriptie factor en eveneens een rol speelt bij het doorgeven van het signaal)(Figuur 5.1). De data laten zien dat de IHH signaal transductie regelkring afwezig is in enchondromen en centrale chondrosarcomen, terwijl de PTHLH regelkring wel actief is. Er is geen verschil in expressie niveaus gevonden tussen enchondromen en graad I chondrosarcomen. Het lijkt er dus op dat de PTHLH regelkring geen belangrijke rol speelt in de overgang van enchondroom naar chondrosarcom. Een hoger expressie niveau correlerend met toenemende hogere histologische graad is gevonden voor de eiwitten PTHR1 en BCL2. Dit suggereert dat deze eiwitten mogelijk een rol spelen in de tumor progressie.

I.b. Algemene gen expressie analyse

In hoofdstuk 6 zijn de RNA expressie niveaus van duizenden genen tegelijkertijd in enchondromen en centrale chondrosarcomen gemeten, met cDNA microarray analyse. De progressie is onderzocht door het vergelijken van de expressie patronen per gen in graad I en graad III chondrosarcomen. Naast de veranderingen die al bekend zijn, zoals de afname van extracellulaire matrix genen (graad III chondrosarcomen zijn celrijker en hebben minder substantie liggen tussen de tumor cellen) werden er ook andere processen die significant verschillend zijn tussen de graad I en graad III chondrosarcomen gevonden.

Een van deze processen is de energie huishouding. In graad III chondrosarcomen is er een lagere expressie van genen gevonden betrokken bij de oxidatieve fosforylering. Dit is een proces dat zorgt dat suikers samen met zuurstof (aëroob) worden omgezet in energie. Daarnaast is er in hooggradige tumoren een hogere expressie gevonden van genen betrokken bij de glycolyse. Glycolyse is het proces waarbij suiker wordt omgezet in energie, zonder dat er zuurstof wordt gebuikt (anaëroob). De toename van glycolyse is beschreven bij verschillende kanker soorten, en er wordt zelfs gesuggereerd dat het een kenmerk is van invasieve tumoren. De stimulering van het proces van glycolyse leidt mogelijk in de laaggradige tumoren tot een groeivoordeel, aangezien er in deze tumoren weinig bloedvaten (en dus zuurstof) aanwezig zijn. Bij toename in graad neemt ook de vaatgroei toe, waardoor er meer zuurstof beschikbaar is voor de cellen. De glycolyse die netto resulteert in minder energie per suiker molecuul, gaat echter niet omlaag. Waarschijnlijk zijn de cellen dus omgeschakeld van aërobe naar anaërobe energie voorziening tijdens progressie. Mogelijk leidt de verhoogde activiteit van de glycolyse tot een verlaging van de activiteit van de oxidatieve fosforylering. Andere verklaringen zijn dat tumorcellen de producten die vrijkomen bij de glycolyse nodig hebben, dat het proces van oxidatieve fosforylering niet goed functioneert (bijvoorbeeld door mutaties), of dat cellen de hoeveelheid vrije radicalen (een bijproduct van oxidatieve fosforylering dat het DNA aan kan tasten) willen beperken.

II. Genetische veranderingen in centrale chondrosarcomen

Tot nu toe waren er weinig specifieke veranderingen van het genoom bekend in het geval van enchondromen en conventionele centrale chondrosarcomen (9p21, 12q). Vorige studies

combineerden vaak de conventionele centrale chondrosarcomen en de perifere chondrosarcomen, waardoor mogelijke verschillen specifiek voor een van deze twee groepen moeilijk te detecteren zijn.

In **hoofdstuk 3** is, gebaseerd op eerdere studies, het verlies van de regio 9p21 verder bestudeerd. Verlies hiervan lijkt specifiek te zijn voor conventionele centrale chondrosarcomen. De regio bevat onder andere het gen *CDKN2A*, wat codeert voor het p16 eiwit (zie boven). Doordat het eiwit in sommige gevallen de ontwikkeling en groei van tumoren kan belemmeren, is dit gen vaak het doel van het verlies. Met behulp van 4 markers, gelokaliseerd op chromosoom 9 rondom de regio waar het *CDKN2A* gene ligt, is aangetoond dat een kopie van deze regio is verloren in 15 van 39 chondrosarcomen. Er zijn geen mutaties in de genen *CDKN2A* en *p14ARF* (een gen dat gedeeltelijk overlap vertoont met *CDKN2A*) gevonden in alle 47 geteste tumoren. Dit alles te samen suggereert dat dit gebied, met de genen *CDKN2A* en *p14ARF*, niet het doel van het verlies is, maar dat er in deze regio (9p21) een ander gen van belang is.

In **hoofdstuk 7** wordt beschreven hoe over het gehele genoom onderzoek is gedaan met array-CGH (een experiment waarmee de mate van winst of verlies van het genetisch materiaal in een keer kan worden meten). Er is gekeken naar genomische afwijkingen in primaire tumoren: enchondromen, graad I, graad II en graad III chondrosarcomen. Hierbij is een toename in zowel het aantal als de uitgebreidheid van de veranderingen in tumoren van hogere graad gevonden. In het algemeen waren de afwijkingen van de enchondromen (alle drie gelokaliseerd in de botten van vingers en tenen) en de graad I chondrosarcomen beperkt en indien aanwezig klein, hoewel één van de enchondromen verlies vertoonde van geheel chromosoom 6. In de hooggradige chondrosarcomen zijn beduidend meer, schijnbaar willekeurige, veranderingen waargenomen, alsof het genoom van deze tumoren instabiel is geworden.

Geen van de veranderingen was aanwezig in alle geteste tumoren, maar er zijn wel veranderingen die werden gevonden in meerder tumoren. Door het toepassen van een scheidslijn waarbij minimaal 5 tumoren dezelfde veranderingen moeten bevatten zijn er 22 regio's geïdentificeerd. De grootte van deze regio's varieerde van 0.55 Mb tot 113 Mb. Enkele van deze regio's zijn eerder genoemd in andere studies, terwijl andere nog niet eerder waren gerapporteerd. In het geval van de chromosomen 7, 12 en 20 zijn meerdere stukjes met verlies of winst gevonden. Op chromosoom 7 zijn dat de regio's 7p12.3-p15.3, 7p11.2-q11.23, 7q36.1-q36.3, op chromosoom 12: 12p13, 12p11.21-p11.23 and 12q13 en op chromosoom 20: 20q11.21, 20q12, 20q13.33. Verdere analyse toonde aan dat winst of verlies van sommige chromosomen of chromosoom regio's specifiek lijken te zijn voor progressie of prognose. Verlies van chromosoom 6 of 10 en winst van de regio 12q12 correleert met een hogere graad. Verlies van chromosoom 10 (10pter-10q25.3), 4q13, 4q34.3 en toename van 9q34 correleert met een slechtere prognose.

Winst van genetisch materiaal op chromosoom 12 wordt waargenomen in meerdere tumorsoorten. Vooral in sarcomen, zoals osteosarcomen en liposarcomen, worden amplificaties van de regio 12q13-15 vaker gezien. In dit gebied liggen onder andere de genen *CDK4*, *MDM2*, *SAS* en genen van de familie van "high mobility group" eiwitten. Winst van de korte

arm van chromosoom 12 (12p) wordt ook gezien in andere typen kanker, zoals bepaalde types kiembaan tumoren van de testis en pancreas carcinomen. In beide type tumoren wordt, net als in chondrosarcomen, amplificatie van 12p11 gevonden. Winst van 12p wordt gezien als een mogelijke stap naar verdere kwaadaardige progressie.

Uiteindelijk zijn de resultaten van de cDNA expressie array (**hoofdstuk 6**) en die van de array-CGH (**hoofdstuk 7**) gecombineerd om te zien of het niveau van de gen expressie mee verandert met het verlies of winst van gedeeltes van het genoom. Er zijn twee genen geïdentificeerd, *CDK4* (12q13) kwam hoger tot expressie in tumoren waarvan deze regio amplificatie vertoonde en *RPS6* (9p21.3-p24.1) had lagere expressie niveaus in tumoren met verlies van deze regio. Deze data suggereren dat de hiergenoemde genen kandidaat zijn als doelwit voor de gevonden winst en respectievelijk verlies.

III. Model voor tumorvorming

Met behulp van de hierboven staande data is een model voor tumor vorming van conventionele central chondrosarcomen opgesteld (Figuur 8.1).

Bij de transformatie van enchondroom naar laaggradig chondrosarcoom wordt een toename van expressie van het eiwit JUNB gevonden (**hoofdstuk 6**). De progressie van laag- naar hooggradig chondrosarcoom wordt gekenmerkt door de verhoogde expressie van genen betrokken bij de glycolyse, gecombineerd met de afname in expressie van genen betrokken bij de oxidatieve fosforylering (**hoofdstuk 6**). Daarnaast wordt een toename van PTHR1 en BCL2 eiwitexpressie gezien met toename in histologische graad (**hoofdstuk 5**), terwijl de eiwitexpressie van p16 afneemt (**hoofdstuk 3**). Op genomisch niveau worden er geen verschillen waargenomen tussen enchondromen en laaggradige chondrosarcomen. Bij de overgang van laag- naar hooggradige tumoren wordt verlies van chromosoom 6, 10 en amplificatie van de regio 12q12 gevonden, hoewel verlies van chromosoom 6 ook is gevonden in één van de drie enchondromen. Tevens nam het aantal en de grootte van de genomische veranderingen toe in de hooggradige tumoren, mogelijk door genomische instabiliteit (**hoofdstuk 7**). Het verlies van 4q13, 4q34, en 10pter-10q25 en de amplificatie van 9q34 bleken te correleren met een slechtere prognose (**hoofdstuk 7**).

IV. Conventionele centrale chondrosarcoma subtypes

Binnen de groep van conventionele centrale chondrosarcomen zijn er, gelet op de klinische data, verschillende subtypes te onderscheiden. Patiënten met chondrosarcomen gelokaliseerd in de botten van de vingers en tenen hebben een lagere kans op uitzaaiingen vergeleken met patiënten waarvan de tumoren soortgelijke histologische kenmerken vertonen, maar die elders gelokaliseerd zijn. Ook voor patiënten met enchondromatose, gekarakteriseerd door meerdere centraal in het bot gelegen kraakbeen-vormende tumoren, worden er als gevolg van verschillend klinisch gedrag andere histologische criteria gebruikt, vergeleken met solitaire tumoren.

IV.a. Tumoren gelokaliseerd in vingers en tenen

In de **hoofdstukken 5 en 6** zijn de RNA- en eiwit-expressieniveaus van tumoren gelokaliseerd in vingers en tenen (hieronder groep I genoemd) in zichzelf vergeleken met de tumoren die zich elders in het skelet bevinden (hieronder groep II genoemd). Dit is gedaan om te onderzoeken of de tumoren biologisch verschillend zijn, of dat de locatie van deze tumoren in vinger en tenen de oorzaak is van hun goede prognose.

Wat betreft eiwitexpressie (**hoofdstuk 5**) zijn vanwege de overeenkomsten in de histologie de chondrosarcomen in groep I vergeleken met graad II chondrosarcomas uit groep II. In totaal zijn 64 enchondromen (waarvan 21 behoren tot groep I) en 89 chondrosarcomen (waarvan 17 behoren tot groep I) onderzocht op verschillen in de IHH en PTHLH signaal transductie regelkring. Er zijn geen significante verschillen gevonden tussen de chondrosarcomen van groep I en de graad II chondrosarcomen uit groep II. Er was echter wel een kleine groep van chondrosarcomen gelokaliseerd in de botten van vinger en tenen (groep I) die verminderde expressie toonden van het eiwit PTHLH. De BCL2 en PTHR1 eiwitexpressie van enchondromen uit groep I waren hoger wanneer deze werden vergeleken met enchondromen uit groep II (**hoofdstuk 5**).

RNA expressie analyse is met behulp van cDNA microarray analyse (**hoofdstuk 6**) uitgevoerd op 3 enchondromen van groep I en 19 chondrosarcomen uit groep II. Over het algemeen bevonden de expressie niveaus van de enchondromen uit groep I zich tussen die van de graad I en graad III chondrosarcomen.

In **hoofdstuk 7** is aangetoond dat het aantal genomische veranderingen in enchondromen uit groep I beperkt is, zowel in grootte als in aantal.

De verminderde expressie van de PTHLH die enkele van de tumoren uit groep I vertonen zou dus een oorzaak kunnen zijn van hun relatief gunstige prognose. Een aanwijzing dat er mogelijk een biologisch verschil ten grondslag aan het verschillend klinisch gedrag zou kunnen liggen is de geringe hoeveelheid genomische veranderingen.

IV.b. Tumoren in de context van enchondromatose

Enchondromatose wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van meerdere enchondromen op verschillende locaties in één patiënt. Gedurende dit onderzoek is in **hoofdstuk 4-7** onderzocht of de tumoren van patiënten met enchondromatose verschillende moleculaire kenmerken hebben ten opzichte van solitaire tumoren. Deze resultaten zouden mogelijk aanwijzingen kunnen geven die leiden tot het vinden van de oorzaak van dit syndroom. Daarnaast zou er mogelijk een verklaring gevonden kunnen worden voor feit dat de histologie een slechte voorspeller is voor gedrag in patiënten met enchondromatose.

In **hoofdstuk 4** is gekeken naar de aanwezigheid van een eerder in de literatuur beschreven mutatie in het gen *PTHR1* (c.448C>T, p.R150C). Hiervoor zijn enchondromen en chondrosarcomen van 31 patiënten uit drie verschillende Europese landen verzameld die gediagnosticeerd waren met enchondromatose. De hierboven genoemde mutatie is niet gevonden in 31 (100%) van de geteste patiënten, noch is er enige aanwijzing gevonden voor aanwezigheid van een andere mutatie in dit gen. In **hoofdstuk 7** is de aanwezigheid van grote genomische veranderingen (>~1 Mb) onderzocht in 4 tumoren van patiënten met M. Ollier. Hoewel er in de individuele tumoren wel veranderingen zijn gevonden, waren geen

van deze aanwezig in alle onderzochte tumoren, noch waren er specifieke afwijkingen in tumoren in de context van M. Ollier.

Met behulp van de onderzoeken zoals beschreven in de **hoofdstukken 4 en 5** zijn er geen aanwijzing gevonden dat veranderingen in de PTHLH signaaltransductie regelkring, of specifiek veranderingen in het *PTH1R* gen, verantwoordelijk zouden zijn voor het ontstaan van enchondromatose. RNA expressie studies (**hoofdstuk 6**) lieten zien dat er alleen zeer kleine (niet significante) verschillen zijn tussen graad II tumoren van patiënten met M. Ollier en solitaire graad II tumoren, hoewel sommige van deze verschillen mogelijk wel van betekenis zouden kunnen zijn als de groepen groter zouden worden gemaakt.

Uiteindelijk is er in geen van de uitgevoerde experimenten een verschil gevonden tussen enchondromatose gerelateerde tumoren en solitaire tumoren, wat erop wijst dat in beide gevallen dezelfde regelkringen zijn aangedaan.

De oorzaak van enchondromatose is nog altijd niet bekend. Het syndroom is niet erfelijk en het feit dat in sommige patiënten alleen bepaalde gedeeltes van het lichaam zijn aangedaan (bijvoorbeeld alleen de rechterkant) suggereert dat de oorzaak mogelijk in de vroeg embryonale ontwikkeling ligt. In dat geval zou in een vroeg stadium één cel kunnen veranderen, bijvoorbeeld een mutatie. Deze cel zou potentieel kunnen uitgroeien tot cellen die deel uitmaken van een bepaald deel van het lichaam wat ook wel mosaïcisme genoemd wordt. Dit fenomeen wordt waargenomen bij andere aandoeningen zoals het McCune-Albright syndroom. De veranderde cellen zouden kwetsbaarder zijn voor een volgende verandering die zou kunnen leiden tot de ontwikkeling van enchondromen (Figuur 8.2). Nader onderzoek is nodig om deze hypothese te testen. De mutaties in het gen verantwoordelijk voor het McCune-Albright syndroom werden ontdekt door het zoeken naar klinische en biochemische overeenkomsten tussen dit syndroom en erfelijke aandoeningen. Hierbij kwam men uit bij Albright osteodystrophie, waarvan de veroorzakende mutaties reeds bekend waren. In beide aandoeningen bleek een en hetzelfde gen aangedaan te zijn namelijk *GNAS1*.

Helaas zal het moeilijk zijn om op dezelfde manier te werk te gaan in het geval van enchondromatose. Hoewel er wel overeenkomsten zijn met erfelijke aandoeningen, zijn deze syndromen nog zeldzamer dan M. Ollier of het Maffucci syndroom. Daarom is het waarschijnlijker dat de oorzaak zal worden gevonden aan de hand van uitgebreide studies naar RNA en eiwit expressie niveaus gebruikmakend van een grotere hoeveelheid M. Ollier gerelateerde tumoren dan in dit proefschrift gebruikt zijn.

V. Conclusies en samenvatting

Het doel van dit proefschrift was het onderzoeken van de moleculaire processen betrokken bij de ontwikkeling en progressie van enchondromen en conventionele centraal-gelegen chondrosarcomen, inclusief de subgroepen van M. Ollier gerelateerde tumoren en die gelokaliseerd in de botten van vingers en tenen.

Hoewel er duidelijk klinische verschillen te vinden zijn tussen deze subgroepen (M. Ollier gerelateerd, tumoren gelokaliseerd in de botten van vinger en tenen en de solitaire tumoren elders) zijn er geen duidelijke verschillen op moleculair niveau. Tumoren geassocieerd met M. Ollier zijn op moleculair niveau niet significant verschillend van solitaire tumoren. In het

geval van de tumoren van vingers en tenen vertoonde een gedeelte van de tumoren een verminderde PTHLH eiwitexpressie.

Ons doel was het verder verduidelijken van een stapsgewijs model voor tumorvorming en het identificeren van diagnostische en progressie gerelateerde moleculaire kenmerken.

Er is een model voor tumorvorming gemaakt, waarin de veranderingen aangaande maligne transformatie, progressie en die gerelateerd aan slechtere prognoses, zoals gevonden in dit proefschrift zijn verwerkt (Figuur 8.1). Gerelateerd met transformatie is een verhoogde eiwitexpressie van JUNB gevonden in laaggradige chondrosarcomen ten opzichte van enchondromen. Een slechtere prognose (en hogere histologische graad) gaat gepaard met hogere expressie niveaus van eiwitten in de PTHLH regelkring, alsmede hogere expressie van glycolyse geassocieerde genen gecombineerd met verlaagde expressie van oxidatieve fosforylering gerelateerde genen.

De analyse van de genomische veranderingen gecombineerd met de uitgebreide RNA niveau analyse leidde tot de identificatie van de kandidaat genen *RPS6* en *CDK4*. Deze genen maken deel uit van verder onderzoek, om hun rol in de pathogenese van enchondromen en conventionele centrale chondrosarcomen te verduidelijken.

