



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Molecular pathology in bone and soft tissue tumors: a multifunctional key for diagnosis and prediction**

Lam, S.W.

### **Citation**

Lam, S. W. (2021, November 3). *Molecular pathology in bone and soft tissue tumors: a multifunctional key for diagnosis and prediction*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3238953>

Version: 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/1887/3238953>

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



# Appendices



Nederlandse samenvatting

Curriculum vitae

List of publications

Nawoord

## Nederlandse samenvatting

### Moleculaire pathologie van bot- en wekedelen tumoren

Bot- en wekedelen tumoren omvatten een brede groep van goedaardige en kwaadaardige tumoren en pathologen vinden deze diagnostiek vaak moeilijk. Deze tumoren zijn zeldzaam en onderscheid op basis van klassieke morfologie kan een uitdaging zijn vanwege de overlappende morfologie. Bovendien is traditionele immunohistochemie, om de differentiatielijn te identificeren, minder bruikbaar bij het onderscheiden van verschillende bottumoren in vergelijking met wekedelen tumoren. Sinds de opkomst van nieuwe moleculaire technieken zijn er talrijke nieuwe ontdekkingen gedaan op het gebied van genetische afwijkingen in bot- en wekedelen tumoren. De identificatie van nieuwe genetische veranderingen heeft geleid tot meer inzicht in de genetische achtergrond van deze tumoren, wat heeft geresulteerd in een prominentere rol van moleculaire diagnostiek in de dagelijkse pathologie praktijk. Het gebruik van moleculaire veranderingen in bot- en wekedelen tumoren in de diagnostiek beperkt zich niet alleen tot de verbetering van de diagnose, maar speelt ook een belangrijke rol bij de prognose en de identificatie van nieuwe targets voor doelgerichte therapie. In dit proefschrift worden de sleutelrollen van de moleculaire pathologie onderzocht in klinische-, pathologische-, immunohistochemische- en moleculaire studies in een reeks van verschillende bot- en wekedelen tumoren.

In **hoofdstuk 2** wordt de huidige kennis over genetische veranderingen in bottumoren samengevat. Op basis van het genetische profiel kunnen bottumoren grofweg in twee groepen verdeeld worden. De eerste groep bestaat uit tumoren met een complex karyotype zonder specifieke genetische veranderingen. De tweede groep bestaat uit tumoren met een eenvoudig karyotype, zoals tumoren met translocaties en tumoren met specifieke mutaties of amplificaties. De moleculaire veranderingen uit deze groep kunnen worden gebruikt als een diagnostische marker, hetzij middels moleculair onderzoek of surrogaat immunohistochemie. Door de snelle toename van nieuwe ontdekkingen op gebied van moleculair onderzoek is het te verwachten dat de moleculaire pathologie een steeds centralere rol zal spelen in de zorg voor sarcoom patiënten.

In **hoofdstuk 3** wordt de toepasbaarheid van een nieuwe methode voor translocatiedetectie, de zogenaamde "anchored multiplex PCR (AMP)-based targeted next-generation sequencing (NGS)" onderzocht in verschillende bot- en wekedelen tumoren. Met het Archer® Fusionplex sarcomen panel kunnen 26 genen die relevant zijn in bot- en wekedelen tumoren tegelijk worden geëvalueerd in paraffine materiaal. De resultaten zijn vergeleken met conventionele technieken, zoals fluorescentie *in-situ* hybridisatie (FISH), RT-PCR en immunohistochemie. De overeenstemming tussen de NGS methode en de conventionele methode was

90%, waarbij de NGS methode superieur was ten opzichte van de conventionele methodes. Een bijkomend voordeel van de NGS techniek is dat de fusiepartner tevens geïdentificeerd wordt, zonder dat voorafgaande kennis hiervan noodzakelijk is. In 14% van de casus was de NGS methode niet toepasbaar doordat het materiaal ongeschikt was, hetgeen waarschijnlijk te wijten is aan ontkalking en variabiliteit in weefsel- en fixatie omstandigheden. Ondanks deze tekortkoming laat de studie zien dat AMP-based targeted NGS een uiterst geschikte methode voor translocatiedetectie is in bot- en wekedelen tumoren.

**Hoofdstuk 4** illustreert de sleutelrol van moleculaire pathologie om de diagnostiek te verbeteren. Vijf casus waarin gebieden van conventioneel chondrosarcoom vermengd zijn met heldere cellen karakteristiek voor heldercellig chondrosarcoom werden klinisch, morfologisch en moleculair nader onderzocht. Alle vijf chondrosarcomen bestonden voornamelijk uit gebieden met conventioneel chondrosarcoom met verschillende maligniteitsgraden. Tot 20% van de tumor bestond uit gebieden met kenmerken van een heldercellig chondrosarcoom en in alle casus werd een geleidelijke overgang tussen beide componenten waargenomen. Moleculaire analyse van conventionele chondrosarcoom componenten toonde in twee gevallen een *IDH1* c.395G> T, p. (Arg132Leu) mutatie en in één geval een *IDH1* c.394C> T, p. (Arg132Cys) mutatie. In deze tumoren toonde de heldercellige component identieke *IDH* mutaties. De twee andere casus waren *IDH* wildtype. Met het aantonen van de *IDH* mutatie wordt de gedachte dat de heldercellige verandering een fenotypisch verschijnsel is in conventioneel chondrosarcoom ondersteund, aangezien conventionele chondrosarcomen *IDH* mutaties kunnen dragen en heldercellige chondrosarcomen niet. Dit fenomeen is niet eerder beschreven in de literatuur, maar kennis hierover is cruciaal. Pathologen kunnen dit fenomeen ten onrechte aanzien voor gedifferentieerd chondrosarcoom, heldercellig chondrosarcoom of chondroblastisch osteosarcoom, die elk verschillende behandelingen vereisen en een verschillende prognose hebben.

In **hoofdstuk 5** wordt onderzocht of immuunhistochemische expressie van FOS gebruikt kan worden als diagnosticum in osteoïd osteoom en osteoblastoom. Onlangs werden in deze tumoren FOS (87%) en FOSB (3%) translocaties gevonden. Sterke nucleaire expressie van FOS werd waargenomen in alle osteoïd osteomen (22/22), in 57% van de osteoblastomen (12/21) en in 2% van de overige bottumoren (3/197). De FOS-immunoreactiviteit verdween na >3 dagen ontkalking. FOS-translocaties waren aanwezig in 94% van de osteoïd osteomen en osteoblastomen met een concordantie van 86% tussen FISH en immuunhistochemie. Deze studie illustreert dat FOS-immuunhistochemie kan worden gebruikt in ontkalkte bipten om osteoïd osteoom en osteoblastoom te diagnosticeren, aangezien overexpressie werd waargenomen bij de meerderheid, terwijl dit zelden positief was in de controlegroep. Er wordt geadviseerd om FOS-immuunhistochemie niet

te gebruiken na langdurige ontkalking. Daarnaast kan zwakke focale expressie in andere laesies leiden tot diagnostische problemen. In dit geval kan men FISH of AMP-based targeted NGS gebruiken om de *FOS*-translocatie aan te tonen dan wel uit te sluiten.

Aangezien cementblastomen opvallende morfologische gelijkenis vertonen met osteoblastomen, wordt in **hoofdstuk 6** onderzocht of cementblastomen ook *FOS*-translocaties hebben met overexpressie van *FOS*. Zestien cementblastomen werden geanalyseerd op *FOS*-expressie middels immunohistochemie en op *FOS*-translocaties middels FISH. We observeerden sterke en diffuse kleuring van *FOS* in 71% van de cementblastomen en vonden een *FOS*-translocatie in alle drie gevallen die onderzocht konden worden met FISH. De morfologische overeenkomsten tussen cementblastoom, osteoïd osteoom en osteoblastoom tezamen met eenzelfde moleculaire afwijking suggereert dat deze tumoren binnen een spectrum van dezelfde ziekte vallen.

In **hoofdstuk 7** en **8** staat de predictieve rol van moleculaire pathologie centraal. **Hoofdstuk 7** richt zich op mismatch repair (MMR) deficiëntie als een predictieve marker voor potentiële therapie met immuun checkpoint remmers in een breed spectrum van bot- en wekedelen tumoren. Met immunohistochemie voor MMR-eiwitten MSH2, MSH6, MLH1 en PMS2 als eerste screeningsmethode, bleken acht van de 894 (1%) bot- en wekedelen tumoren MMR deficiënt te zijn. Dit waren vier leiomyosarcomen, twee rhabdomyosarcomen, één maligne perifere zenuwschede tumor en één stralings-gerelateerd sarcoom. Drie patiënten werden verdacht van het Lynch-syndroom. Literatuuronderzoek bracht 30 MMR-deficiënte sarcomen aan het licht, waarvan 33% niet-gedifferentieerde / niet-classificeerbare sarcomen. De meeste patiënten hadden een genetische aanleg. Deze resultaten tonen dat MMR deficiëntie in bot- en wekedelen tumoren zeldzaam is, maar dat er een grotere kans bestaat op het vinden van MMR-deficiënte tumoren als men zich richt op tumoren met spiercel differentiatie en patiënten met genetisch aanleg danwel meerdere tumoren.

In **hoofdstuk 8** worden *NTRK*-fusies in bottumoren onderzocht als predictieve marker voor TRK-remmers. Het wordt door het Wereld Sarcomen Netwerk (WSN) aanbevolen om screening in een klinische setting te richten op histologische subtypen waarin *NTRK*-fusies in hoge frequentie worden aangetroffen en diagnostisch zijn. Voor sarcoompatiënten met lokaal gevorderde en niet-reseceerbare of gemetastaseerde ziekte adviseert het WSN prescreening met pan-Trk immunohistochemie alleen voor sarcoomtypen met een complex karyotype (bijv. osteosarcoom). Bij sarcomen met genfusies (bijv. Ewing-sarcoom) of amplificaties als drivers wordt geadviseerd om *NTRK*-fusietesten alleen uit te voeren in een onderzoekssetting, aangezien tumoren met *NTRK*-fusies doorgaans

geen andere drivers bevatten. Echter, deze driedelige screeningsmethode is voornamelijk gebaseerd op de literatuur over wekedelen tumoren. In de 354 immuunhistochemisch onderzochte bottumoren werd in geen enkele tumor een *NTRK*-fusie gevonden. Dit was volgens verwachting, aangezien slechts enkele anekdotische gevallen van *NTRK*-fusies in primaire bottumoren in de literatuur worden beschreven. De kans op het vinden van een *NTRK*-fusie in reeds gekarakteriseerde bottumoren in de klinische praktijk is dus uiterst klein, zelfs in tumoren met een complex karyotype zonder drivers. Dit kan betekenen dat, als meer uitgebreide grootschalige moleculaire studies dit bevestigen, routinematige screening voor *NTRK* bij botsarcoom patiënten met gevorderde ziekte heroverwogen kan worden.

### **Concluderende opmerkingen**

Verschillende sleutelrollen van de moleculaire pathologie in bot- en wekedelen tumoren zijn behandeld in diverse hoofdstukken van dit proefschrift en hebben bewezen bij te kunnen dragen aan een nauwkeurigere diagnose en een betere classificatie van tumorentiteiten. Bovendien kunnen moleculaire veranderingen worden vertaald in aanvullende markers die behulpzaam zijn bij het diagnosticeren van tumoren, zoals FOS, en kunnen nieuwe kansen creëren voor additionele therapeutische opties. Toekomstige studies zullen verder bijdragen aan nieuwe ontdekkingen met behulp van technieken zoals whole genome sequencing en RNA-sequencing. Dit zal ongekende mogelijkheden bieden om ons begrip van moleculaire tumorbiologie te vergroten, hetgeen zeer waarschijnlijk zal leiden tot nieuwe therapeutische opties. Echter, de toegang tot moleculaire technieken is niet altijd zo vanzelfsprekend en daarom is de translatie van moleculaire bevindingen naar meer toegankelijke technieken, zoals immuunhistochemie, essentieel. Hierdoor is het mogelijk om pathologen over de hele wereld diagnostische hulpmiddelen te bieden om de diagnostiek van bot- en wekedelen tumoren te verbeteren.