



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Chondroblastoma and chondromyxoid fibroma: disentangling the neoplastic chondrogenesis of two rare cartilaginous tumours

Salvatore, R.

Citation

Salvatore, R. (2010, June 22). *Chondroblastoma and chondromyxoid fibroma: disentangling the neoplastic chondrogenesis of two rare cartilaginous tumours*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15712>

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/1887/15712>

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

Chapter 10

Nederlandse Samenvatting

I Het Spectrum van Fenotypische Differentiatie in Chondroblastoom en Chondromyxoid fibroom

II Signaaltransductieroutes die de Pathogenese van Chondroblastoom en Chondromyxoid fibroom sturen

III De Somatisch-genetische achtergrond van van Chondroblastoom en Chondromyxoid fibroom

Het doel van deze studie is om neoplastische chondrogenese aan de hand van twee zeldzame kraakbeentumoren te bestuderen: chondroblastoom en chondromyxoid fibroom. De daarmee samenhangende resultaten zijn samengevat en worden in drie delen behandeld:

- I. Het differentiatie spectrum van fenotypische differentiatie in chondroblastoom en chondromyxoid fibroom
- II. Het signaaltransductieroutes die de pathogenese van chondroblastoom en chondromyxoid fibroom sturen
- III De somatisch-genetische achtergrond van chondroblastoom en chondromyxoid fibroom.

I Het spectrum van Fenotypische Differentiatie in Chondroblastoom en Chondromyxoid fibroom

Chondroblastoom en chondromyxoid fibroom tonen een heterogeen morfologisch beeld binnen dezelfde tumor. In dit proefschrift is het spectrum van differentiatie uitgebreid gekarakteriseerd, met name de morfologie en het expressiepatroon werden vergeleken met de verschillende stadia van kraakbeendifferentiatie in vitro en in vivo.

De twee meest voorkomende benigne kraakbeentumoren - osteochondroom en enchondroom - tonen meestal kenmerken van hyaline kraakbeenvorming (samengevat in hoofdstuk 2). In chondroblastoom is duidelijk herkenbaar kraakbeen echter bijna altijd afwezig terwijl in chondromyxoid fibroom de kraakbeenmatrix niet geheel gedifferentieerd is. Als gevolg van het ontbreken van morfologisch bepalende kenmerken van kraakbeen is het onduidelijk of chondroblastoom beschouwd kan worden als kraakbeentumor. Met name Aigner et al.¹ suggereren - voornamelijk gebaseerd op de afwezigheid van collageen type II expressie - dat chondroblastoom een osteogeen karakter heeft. Een andere benadering wordt gebruikt in dit proefschrift: in plaats van te kijken naar de expressie van extracellulaire matrixeiwitten is er gekeken naar de expressie van de signaalmoleculen van de groeischijf die betrokken zijn bij PTHLH en FGF signalering aanwezig in chondroblastoom (hoofdstuk 3). Verder is uit genoom-brede expressie analyse²⁻⁴ (hoofdstuk 6) gebleken dat moleculen betrokken bij de vorming van kraakbeen, bijvoorbeeld sox9, collageen type II, aggrecan, fibromoduline en kraakbeen oligomeer matrixeiwit, tot expressie komen in zowel maligne als benigne kraakbeentumoren, waaronder ook het chondroblastoom. Deze bevindingen ondersteunen het kraakbeen-achtige karakter van chondroblastoom.

Recentelijk leverde Konishi et al. 2009⁵ verder bewijs van de kraakbeen-achtige aard van chondromyxoid fibroom en chondroblastoom door de expressie van het sox9 eiwit - een belangrijke regulator van kraakbeendifferentiatie - in deze tumoren aan te tonen. Een vergelijking tussen chondroblastoom en chondromyxoid fibroom toonde aan dat de genen, die niet strikt geïdentificeerd zijn als relevant voor de vorming van kraakbeen, aanzienlijk verschillend tot expressie komen. Met name de expressie van versican en perlecan komen specifiek lager tot expressie in chondroblastoom. Aangezien deze twee "niet-kraakbenige matrixmoleculen" betrokken zijn bij condensatie en differentiatie, kan hun verminderde expressie de oorzaak zijn van het ontbreken van een duidelijke kraakbeen-achtige morfologie in chondroblastoom.

Zowel chondroblastoom als chondromyxoid fibroom bevat vaak meerkernige reuscellen. Meerkernige reuscellen worden vaker en in grotere hoeveelheid in chondroblastoom dan in chondromyxoid fibroom gevonden. Daarom komen mo-

leculen waarvan bekend is dat ze vooral tot expressie komen in osteoclastische reuscellen - zoals superoxyde dismutase-1, acid fosfatase-5, tartrate resistent en cathepsine K- aanzienlijk hoger tot expressie in chondroblastoom. Een substantiële cathepsine K expressie, bepaald door middel van immunohistochemie, werd aangetoond in zowel de reuscellen van chondroblastoom als in die van chondromyxoid fibroom.

Een heterogene immunokleuring voor signaal- en cel-cyclus gerelateerde moleculen werd gezien in meerkernige reuscellen in chondroblastoom, wat een afspiegeling kan zijn van hun onderlinge verschillen: sommige zijn reactief en andere zijn neoplastisch (hoofdstuk 3 en 7). Aan de andere kant kunnen de verschillende niveaus van eiwitexpressie simpelweg het gevolg zijn van een verschillende functionele status. De kenmerken van meerkernige reuscellen in chondroblastoom zijn verder beschreven in hoofdstuk 7. Een index casus waarin de éénkernige cellen een t(5; 17) (p15; q22-23) translocatie bevatten, werd geïdentificeerd en onderzocht met interphase FISH om te beoordelen of dezelfde translocatie zich voordoet in de nuclei van meerkernige reuscellen. Omdat er geen translocatie in de kernen van de meerkernige reuscellen werd gevonden, wordt aangenomen dat ze in de laesies waarschijnlijk reactief zijn. De reuscellen kunnen worden gerecruteerd via RANK-ligand, dat aanwezig is op het oppervlak van de chondroblast-achtige cellen van chondroblastoom⁶, net als bij het aantrekken van reuscellen in reusceltumoren van bot.⁷

Bij chondromyxoid fibroom wordt een breed morfologisch spectrum van neoplastische cellen en extracellulaire matrix waargenomen (hoofdstuk 4). De aanwezige spoelvormige cellen en chondrocyt-achtige cellen zijn georganiseerd in lobules, die een soort differentiatiegradient lijken te laten zien: van hypercellulaire cellen aan de periferie (bestaande uit spoelvormige cellen met een lage concentratie verspreid extracellulaire matrix) naar een kern met cellen die morfologisch lijken op chondrocyten ingebed in een overvloedige kraakbeen-achtige matrix. Het patroon van een gesulfateerd proteoglycanen depositie, zoals aangetoond met Safranine-O kleuring, ondersteunt ook deze morfologisch zichtbare differentiatiegradient. De centrale gebieden van zowel de lobules van chondromyxoid fibroom als de in vitro gekweekte celpellets van articulaire chondrocyten kleuren intensief aan met Safranine-O en zijn daardoor rijk aan gesulfateerde proteoglycanen. Omdat er bloedvaten zijn aan de rand van de lobules, moeten zuurstof en voedingsstoffen zich via de extracellulaire matrix van de periferie naar het centrum dringen. De hierdoor ontstane gradiënt wordt verondersteld verantwoordelijk te zijn voor de waargenomen architectuur.

Het spectrum van kraakbeendifferentiatie in chondromyxoid fibroom werd verder onderzocht met behulp van genoom-brede expressie analyse (hoofdstuk 6). Chondromyxoid fibroom laat een hogere expressie van versican en perlecan zien, wat kan duiden op een duidelijker kraakbeen-achtig fenotype in vergelijking met chondroblastoom. Dit fenotype zou ook gestuurd kunnen worden door het in chondromyxoid fibroom gevonden hogere expressieniveau van COL4A2. Dit versterkt het concept dat kraakbeentumoren een homogene expressie van kraakbeen-gerelateerde moleculen delen en dat "niet-kraakbeen specifieke" moleculen van cruciaal belang zijn voor het sturen van de brede heterogeniteit binnen dezelfde tumor. Overeenkomstig zijn er, onder de moleculen die differentieel tot expressie komen in chondromyxoid fibroom (in vergelijking met hooggradig centraal chondrosarcoom), "niet-kraakbeen specifieke" moleculen die betrokken zijn

bij bijvoorbeeld de celcyclus regulatie en de cel-cel adhesie. Omdat de differentiële diagnose van chondromyxoid fibroom en hooggradig centraal chondrosarcoom wellicht in de praktijk lastig is, zou de immunohistochemische bepaling van sommige celcyclus gerelateerde moleculen en adhesiemoleculen (p16, CCND1 en ALCAM) een oplossing kunnen bieden.

Het differentiatiespectrum van chondroblastoom en chondromyxoid fibroom bevat ook andere kenmerken dan die betrokken bij kraakbeenvorming: expressie van epitheliale markers in chondroblastoom^{8,9} en de aanwezigheid van "gladde spiercel"-differentiatie in chondromyxoid fibroom.¹⁰ De "gladde spiercel" differentiatie komt vooral voor in spoelvormige cellen van chondromyxoid fibroom. De aard en de betekenis van dit "spiercel-achtige" fenotype is bestudeerd in hoofdstuk 5. In chondromyxoid fibroom is er geen volledig myofibroblastair fenotype aanwezig (kraakbeendifferentiatie is nog steeds aanwezig en er zijn geen "fibronexus junctions"). Ook wordt er geen volledige "gladde spiercel"-transdifferentiatie bereikt (omdat plaques, caveolae en lamina afwezig zijn en immunokleuring voor desmin en H-caldesmon negatief is). Opmerkelijk is dat, in in vitro en in vivo articulaire chondrocyten, de gladde actine-positieve cellen slank zijn en zich bevinden aan het oppervlak van gewrichtskraakbeen, of aan de rand van 3-dimensionale culturen.¹¹⁻¹³ Dit onderstreept dat chondrocyten onder de juiste omstandigheden kunnen transdifferentiëren naar een "gedeeltelijk myofibroblastair" fenotype.

II Signaaltransductieroutes die de Pathogenese van Chondroblastoom en Chondromyxoid fibroom sturen

Omdat kraakbeentumoren enigszins lijken op normaal kraakbeen, kan het onderzoek van moleculen die cruciaal zijn voor de vorming van kraakbeen, licht werpen op de pathogenese van chondroblastoom en chondromyxoid fibroom. In het bijzonder zijn hier PTHLH, FGF, TGF- β en geslachtshormoon gerelateerde moleculen onderzocht. Gezien de grote variatie in expressie binnen de tumoren heeft een immuno-histochemische aanpak de voorkeur vanwege de ruimtelijke informatie die deze techniek biedt. In het bijzonder werd het expressiepatroon van IHH/PTHLH-gerelateerde moleculen in chondroblastoom en chondromyxoid fibroom in zowel de matrix-rijke als de cellulaire gebieden geëvalueerd (hoofdstuk 3 en 4). Een actieve rol van kraakbeen signaalmoleculen PTHLH en FGF in chondroblastoom is aangetoond (hoofdstuk 3). Voor alle van de onderzochte eiwitten werd een trend naar meer uitgebreide en intensieve expressie in de cellulaire gebieden opgemerkt. Omdat de cellulaire gebieden een hoog aantal mitoses laat zien, lijken ze misschien meer op de proliferatieve zone van de kraakbeen groeischijf, terwijl de matrix-rijke gebieden meer te vergelijken zijn met de overgangs- / hypertrofe zone. Bovendien is het expressiepatroon in chondroblastoom vergelijkbaarder met chondrosarcoom dan met osteochondroom waarin IHH / PTHLH en FGF-signaalmoleculen meestal afwezig zijn¹⁴ (Fig.1).

Gezien de nauwe anatomische relatie tot de groeischijf en hun aanwezigheid voor het sluiten van de groeischijf, werd de rol van geslachtshormonen in chondroblastoom verder onderzocht (hoofdstuk 7). Steroïden versnellen lengte-groei in de puberteit.¹⁵ SRD5A1, een gen dat de omzetting van testosteron in dihydrotestosteron katalyseert, bleek betrokken te zijn bij een gebalanceerde translocatie in een index casus van het chondroblastoom. Dit leidde tot de studie van de expressie van SRD5A1 en van andere moleculen die betrokken zijn bij het

metabolisme en het signaleren van geslachtshormonen: androgene receptor (AR), aromatase (CYP19) en oestrogeen receptor-alpha (ESR1). Een diffuse ESR1 expressie werd gevonden in het chondroblastoom, zonder duidelijk verschil tussen matrix-rijke en cellulaire gebieden. Een diffuse expressie werd ook gevonden voor SRD5A1 en CYP19; AR vertoonde in enkele gevallen een verspreide expressie, voornamelijk bij mannen. Expressie van de moleculen die betrokken zijn bij het metabolisme en de signalering van geslachtshormonen suggereert dat dit een rol kan spelen bij het ontstaan van chondroblastoom.

Een duidelijk expressiepatroon van kraakbeendifferentiatie en celcyclus regulatoren werd ook gevonden in chondromyxoid fibroom (hoofdstuk 4). De meeste onderzochte eiwitten waren uitgebreider en intensiever aanwezig in de matrixrijke gebieden. Dit verschil zou bevorderlijk kunnen zijn voor zowel de afzetting van overvloedige specifieke extracellulaire matrix als het typisch cellulaire fenotype. N-cadherine, waarvan bekend is dat het een rol speelt bij de bevordering van mesenchymale condensatie via cel-cel interactie, kwam duidelijk hoger tot expressie in het cellulaire gebied van chondromyxoid fibroom. Ondanks de opvallende morfologische gelijkenis tussen chondromyxoid fibroom en chondrocyten gekweekt in 3D pellet, werd een ander expressiepatroon gevonden. De hogere expressie van PTHLH en PTHR1 in het chondrocyten pellet cultuursysteem leidde - misschien als gevolg van de kweekomstandigheden - tot een hogere expressie van het downstream-molecuul BCL2 in chondromyxoid fibroom. Dit opvallende verschil in BCL2 expressie wijst op een ander signaal / transductie mechanisme dat veroorzaakt kan worden door het effect van de aanwezigheid van andere mediators in vivo maar niet in vitro.¹⁶

TGF- β expressie, zowel op eiwit als mRNA niveau, is onderzocht in chondromyxoid fibroom (hoofdstuk 5). De activiteit van TGF- β 1 werd beoordeeld door middel van eiwit- en m-RNA expressie van downstream-molecuul PAI-1. Een diffuus en intens signaal voor PAI-1 eiwit in chondromyxoid fibroom, met een lokalisatie die overlapt met die van TGF- β 1, werd gevonden in neoplastische cellen, in het nabijgelegen normale bindweefsel en in de reuscellen. Bovendien correleerde PAI-1 m-RNA expressie significant met het niveau van TGF- β 1 wat de activiteit van TGF- β 1 voor de inductie van PAI-1 expressie bevestigt. Op basis van het TGF- β 1 en PAI-1 expressiepatroon is een model gemaakt van paracrine en autocrine signalering tussen neoplastische en niet-neoplastische stromale cellen. Een dergelijke signalering kan zowel een andere organisatie van de contractiele actines in de spoelvormige en ronde cellen bevorderen, alsook een andere productie van de extracellulaire matrix.

III De somatisch-genetische achtergrond van Chondroblastoom en Chondromyxoid fibroom

Ten slotte zijn de genetische achtergrond en de uiteindelijke ontstaans-mechanismen van chondroblastoom en chondromyxoid fibroom besproken in hoofdstuk 7 en 8. Geen enkele terugkerende chromosomale verandering is ooit eerder beschreven voor chondroblastoom (hoofdstuk 7).¹⁷⁻²¹ Een index casus die een nieuw gebalanceerd t (5;17) (p15;q22-23) bevatte, werd geïdentificeerd en de breekpunten FISH in kaart gebracht in de regio's grenzend aan de SRD5A1 en CA10 genen, gelegen op respectievelijk chromosoom 5 en 17. Aangezien er geen chimeer product werd gevonden en de breekpunten buiten de coderende regio lagen,

werden de mogelijke effecten op het niveau van expressie van CA10 en SRD5A1 geëvalueerd. Expressie van het SRD5A1 eiwit werd gevonden in alle geteste cases, evenals de voor het geslachtshormoon signaal-gerelateerde moleculen: oestrogeen receptor alfa en aromatase, terwijl androgeen receptor slechts in een paar gevallen werd aangetroffen in geïsoleerde cellen. Van koolzuuranhydrase X (CA10) werd geen expressie gevonden in de index casus en verminderde expressie in drie andere cases. Aantasting van het CA10 gen kan pathogenetisch relevant zijn en de diffuse expressie van SRD5A1 en geslachtshormoon signaal-gerelateerde moleculen bevestigt hun rol in neoplastische chondrogenese. In hoofdstuk 8 werd een groot cohort van chondromyxoid fibroom bestudeerd met chromosoom banderingsanalyse, aangevuld met multicolour FISH karyotyping, array-CGH, breekpunt mapping door middel van FISH met interfase FISH verificatie, PCR en immunohistochemie, om belangrijke onderliggende genetische mechanismen en de expressieniveaus van kandidaatgenen te identificeren. Translocatie van chromosoom 6 kwam voor in alle cases met een afwijkend karyotype. Twee nieuwe kandidaat regio's zijn onderzocht, namelijk 6q23.3 en 6q24. De eerste werd geïdentificeerd door FISH mapping van het breekpunt in een index casus, en voor 6q24, een regio die vaak bleek gedeleteerd in array-CGH experimenten, werden twee probes aan weerszijden van het tumor suppressor-gen utrophin gebruikt. Deze twee regio's en de onlangs toegevoegde regio 6q13²² bleken herhaaldelijk te zijn aangedaan. Omdat de translocaties echter heterogeen zijn, zou het gebruik van een enkel probe-set als aanvullend diagnose-instrument een lage gevoeligheid hebben, en de interpretatie zou worden gehinderd door de heterogeniteit van de translocaties. Tenslotte zou de specificiteit van het gebruik van een enkel FISH probe-set of van een combinatie van sets verder moeten worden geëvalueerd in een grote reeks van kraakbeentumoren. In feite verandert de chromosomale arm 6q vaak, met name ook in chondrosarcomen.^{6; 24-27}

De genetische mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van chondroblastoom en chondromyxoid fibroom blijven ongrijpbaar: een fusie-gen is niet gevonden in het chondromyxoid fibroom en het chondroblastoom en een beperkte expressie van CA10 is alleen te vinden in enkele gevallen van chondroblastoom. Daarom wordt aangenomen dat de waargenomen structurele veranderingen "passagiers" en niet "bestuurders" zijn, waarschijnlijk secundair aan ofwel een cryptische translocatie of een puntmutatie. Recent ontwikkelde technologie, zoals deep sequencing lijkt veelbelovend voor het ontrafelen van dergelijke gebeurtenissen.

Chondroblastoom en chondromyxoid fibroom delen een gemeenschappelijk kraakbeen-achtig expressieprofiel en lijken in verschillende mate op kraakbeen met de aanwezigheid van ook andere differentiatielijnen. Hoewel een aantal belangrijke moleculen voor de pathogenese van chondroblastoom en chondromyxoid fibroom zijn geïdentificeerd, zullen andere signaalroutes naar verwachting ook een rol spelen. Met name verandering van morphogeen-signalering is cruciaal gebleken voor benigne kraakbeentumoren. Naast de IHH en TGF- β -signalering, zou het interessant zijn om ook WNT signalering bij chondromyxoid fibroom en chondroblastoom in toekomstige studies te betrekken.

De signaalmoleculen die groeischijven van het bot reguleren zijn bestudeerd in chondroblastoom en chondromyxoid fibroom. Echter, omdat chondroblastoom voorkomt in de epifyse van de lange beenderen kan onderzoek van de signaalregulatie nuttig zijn. Omdat epifyse ontstaat door de vorming van secundaire

ossificatie zouden centrale pathways zoals VEGF die betrokken zijn bij deze regulatie kunnen veranderen.

Dit is vergeleken met het *in vitro* model: articulaire chondrocyten gekweekt in 3D pellets. Aangezien er geen cellijnen beschikbaar zijn van chondroblastoom en chondromyxoid fibroom, zijn mesenchymale stamcellen gedifferentieerd naar kraakbeen potentieel-interessant vergelijkingsmateriaal. Structurele chromosomale veranderingen zijn gevonden in chondroblastoom en in chondromyxoid fibroom. Echter, er is geen specifiek effect uit deze translocatie geïdentificeerd: dwz noch de identificatie van fusie-genen, noch promotor-uitwisseling. Hoewel een complex karyotype niet aanwezig is, herbergen chondroblastoom en chondromyxoid fibroom complexe translocaties met zowel gebalanceerde als ongebalanceerde veranderingen. Een interessante observatie is dat chondromyxoid fibroom genetisch ontvankelijk is voor accumulatie van structurele veranderingen op een specifiek chromosoom, chromosoom 6. De mechanismen die deze herhaaldelijke structurele veranderingen bepalen alsmede het effect daarvan zijn niet duidelijk. Een opvallend kenmerk van deze tumoren is het vrijwel ontbreken van maligne progressie. Met andere woorden: is er een genetisch mechanisme dat kan uitleggen waarom osteochondroom en enchondroom zich kunnen ontwikkelen tot maligniteiten terwijl dit bijna nooit voorkomt in chondroblastoom en chondromyxoid fibroom?

In conclusie, de bevindingen van deze studie en de relevante literatuur²³ stellen dat chondroblastoom en chondromyxoid fibroom afkomstig kunnen zijn van een mesenchymale stamcellen precursor. Een nog onbekende genetische gebeurtenis kan neoplastische transformatie veroorzaken en: 1) een signaalcascade activeren die cruciaal is voor de overleving van neoplastische cellen (dwz PTHLH, TGF- β , enz.) en cellen aan kraakbeen aanzetten (kraakbeenexpressie van specifieke moleculen), en 2) een separaat expressieprofiel activeren van "niet-specifieke kraakbeen" moleculen voor respectievelijk chondroblastoom en chondromyxoid fibroom (Fig.2). De structurele veranderingen ("passagiers") worden later verondersteld plaats te vinden.

Referenties

1. Aigner T, Loos S, Inwards C, Perris R, Perissinotto D, Unni KK, Kirchner T: Chondroblastoma is an osteoid-forming, but not cartilage-forming neoplasm. *J Pathol* 1999, 189: 463-469
2. Hameetman L, Rozeman LB, Lombaerts M, Oosting J, Taminiau AHM, Cleton-Jansen AM, Bovée JVMG, Hogendoorn PCW: Peripheral chondrosarcoma progression is accompanied by decreased Indian Hedgehog (IHH) signalling. *J Pathol* 2006, 209: 501-511
3. Rozeman LB, Hameetman L, van Wezel T, Taminiau AHM, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PCW, Bovée JVMG: cDNA expression profiling of central chondrosarcomas: Ollier disease resembles solitary tumors and alteration in genes coding for energy metabolism with increasing grade. *J Pathol* 2005, 207: 61-71
4. Henderson SR, Guiliano D, Presneau N, McLean S, Frow R, Vujovic S, Anderson J, Sebire N, Whelan J, Athanasou N, Flanagan AM, Boshoff C: A molecular map of mesenchymal tumors. *Genome Biol* 2005, 6: R76
5. Konishi E, Nakashima Y, Iwasa Y, Nakao R, Yanagisawa A: Immunohistochemical analysis for Sox9 reveals the cartilaginous character of chondroblastoma and chondromyxoid fibroma of the bone. *Hum Pathol* 2010, 41: 208-13
6. Huang L, Cheng YY, Chow LT, Zheng MH, Kumta SM: Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) is expressed in chondroblastoma: possible involvement in osteoclastic giant cell recruitment. *Mol Pathol* 2003, 56: 116-120

7. Forsyth RG, de BG, Baelde JJ, Taminiau AH, Uyttendaele D, Roels H, Praet MM, Hogen doorn PCW: CD33+ CD14- phenotype is characteristic of multinuclear osteoclast-like cells in giant cell tumor of bone. *J Bone Miner Res* 2009, 24: 70-77
8. Bousdras K, O'Donnell P, Vujovic S, Henderson S, Boshoff C, Flanagan AM: Chondroblastomas but not chondromyxoid fibromas express cytokeratins: an unusual presentation of a chondroblastoma in the metaphyseal cortex of the tibia. *Histopathology* 2007, 51: 414-416
9. Semmelink HJF, Pruszczynski M, Wiersma-van Tilburg AJM, Smedts F, Ramaekers FCS: Cytokeratin expression in chondroblastoma. *Histopathology* 1990, 16: 257-263
10. Nielsen GP, Keel SB, Dickersin GR, Selig MK, Bhan AK, Rosenberg AE: Chondromyxoid fibroma: a tumor showing myofibroblastic, myochondroblastic, and chondrocytic differentiation. *Mod Pathol* 1999, 12: 514-517
11. Kim AC, Spector M: Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human articular cartilage. *J Orthop Res* 2000, 18: 749-755
12. Kinner B, Spector M: Smooth muscle actin expression by human articular chondrocytes and their contraction of a collagen-glycosaminoglycan matrix in vitro. *J Orthop Res* 2001, 19: 233-241
13. Zaleskas JM, Kinner B, Freyman TM, Yannas IV, Gibson LJ, Spector M: Growth factor regulation of smooth muscle actin expression and contraction of human articular chondrocytes and meniscal cells in a collagen-GAG matrix. *Exp Cell Res* 2001, 270: 21-31
14. Bovée JVMG, Van den Broek LJCM, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PCW: Up-regulation of PTHrP and Bcl-2 expression characterizes the progression of osteochondroma towards peripheral chondrosarcoma and is a late event in central chondrosarcoma. *Lab Invest* 2000, 80: 1925-1933
15. Chagin AS, Savendahl L: Genes of importance in the hormonal regulation of growth plate cartilage. *Horm Res* 2009, 71 Suppl 2: 41-47
16. Amling M, Neff L, Tanaka S, Inoue D, Kuida K, Weir E, Philbrick WM, Broadus AE, Baron R: Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone related peptide in a signalling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J Cell Biol* 1997, 136: 205-213
17. Swarts SJ, Neff JR, Johansson SL, Nelson M, Bridge JA: Significance of abnormalities of chromosomes 5 and 8 in chondroblastoma. *Clin Orthop* 1998, 189-193
18. Mark J, Wedell B, Dahlenfors R, Grepp C, Burian P: Human benign chondroblastoma with a pseudodiploid stemline characterized by a complex and balanced translocation. *Cancer Genet Cytogenet* 1992, 58: 14-17
19. Bridge JA, Bhatia PS, Anderson JR, Neff JR: Biologic and clinical significance of cytogenetic and molecular cytogenetic abnormalities in benign and malignant cartilaginous lesions. *Cancer Genet Cytogenet* 1993, 69: 79-90
20. Sjogren H, Orndal C, Tingby O, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Stenman G: Cytogenetic and spectral karyotype analyses of benign and malignant cartilage tumours. *Int J Oncol* 2004, 24: 1385-1391
21. Van Zelderen-Bhola SL, Bovée JVMG, Wessels JW, Mollevangers P, Nijhuis JV, Taminiau AHM, Hogendoorn PCW: Ring chromosome 4 as sole anomaly in a chondroblastoma. A case report and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 1998, 105: 109-112
22. Yasuda T, Nishio J, Sumegi J, Kapels KM, Althof PA, Sawyer JR, Reith JD, Bridge JA: Aberrations of 6q13 mapped to the COL12A1 locus in chondromyxoid fibroma. *Mod Pathol* 2009, 22: 1499-1506
23. Aigner T: Towards a new understanding and classification of chondrogenic neoplasias of the skeleton--biochemistry and cell biology of chondrosarcoma and its variants. *Virchows Arch* 2002, 441: 219-230