

Kordomaya Moleküler Yaklaşımlar

Molecular Approaches to Chordoma

Emre Can TÜYSÜZ¹, Şükrü GÜLLÜOĞLU^{1,2}, Özlem TÜRKSOY¹, Ayşegül KUŞKUCU², Ömer Faruk BAYRAK², Uğur TÜRE³

¹Yeditepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Yeditepe Üniversitesi Hastanesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³Yeditepe Üniversitesi Hastanesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Kordoma, embriyonal notokord kalıntılarında köken alan, aksiyal iskelet boyunca yerleşim gösteren, genellikle düşük dereceli, kalsifiye olmuş ve lobüllerden meydana gelen kemik doku içinde yerleşimli bir iskelet tümörüdür. Bu derlemenin amacı kordoma tümör biyolojisi, tanı ve tedavisi konusunda modern genetik-moleküler biyolojik çalışmaların bulgularını özetlemektir. Kordoma moleküler biyolojisi konusundaki gelişmeler, hücre biyolojisini ilgilendiren farklı başlıklar altında ele alınmıştır. Kordomaların başlangıcında ve ilerlemesinde farklı çalışma gruplarının saptadığı genetik değişimler ve moleküler yollar üzerine ortaya çıkan görüşler açıklanmıştır. Kordomanın başlangıcı ve gelişimi konusundaki bilgimiz moleküler biyolojik yöntemlerin kullanımı sonrasında belirgin şekilde artmıştır. Fakat bu bilgi hastalığın daha etkin tedavisini sağlayabilecek noktaya gelmemiştir. Hastalığın daha iyi anlaşılabilmesi ve daha etkin tedavi yöntemlerinin uygulanabilmesi için kordomalardaki moleküler yolların daha kapsamlı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Gen ekspresyonu, Kordoma, Moleküler yolak, Moleküler patoloji

ABSTRACT

A chordoma originates from remnants of the embryonic notochord and is located along the axial skeleton. This is a tumor of the skeleton that is usually low grade and is made of calcified lobules within the bone. This paper aims to review current molecular biological advances on the tumor-biology, diagnosis and treatment of chordomas. Advances in chordoma molecular biology are reviewed under different headings corresponding to various processes of cellular biology. Genetic and molecular biological findings of various study groups and the current take on these findings are summarized. Our understanding on the origin and development of chordomas has increased substantially after the application of molecular biological technology. However, these advancements have not yet resulted in novel and effective treatment strategies. Further studies are required to design effective treatment strategies for chordomas.

KEYWORDS: Gene expression, Chordoma, Molecular pathway, Molecular pathology

■ GİRİŞ

Virchow kordomayı ilk kez 1857 yılında klivus tümörü olarak tanımlamıştır ve kıkırdaktan köken aldığına inandığı için “*ecchondrosis physaliphora spheno-occipitalis*” ismini vermiştir. İlk mikroskopik veriler bu tümörün vakuol içer-

diğini göstermiştir (101). Ulusal Kanser Enstitüsünün Gözetim, Epidemiyoloji ve Bitiş Sonuçları (SEER) programının verilerine göre kordomanın yıllık insidansı 100000 insanda 0,08'dir. Bu nedenle aksiyel iskelet üzerinde gelişen nadir bir kemik kanseri türü olarak sınıflandırılır. Yapılan çalışmalarda kordomaların



Yazışma adresi: Uğur TÜRE

E-posta: drture@yahoo.com

%29,1'inin sakral, %32,8'inin spinal ve %32'sinin ise kranial kaynaklı olduğu ve erkeklerde kadınlara göre iki kat daha fazla görüldüğü saptanmıştır (54,71).

Kordomalar ağırlıklı olarak musin salgılayan, lobüle, saydam, katı gri kütleli, kıkırdak tümörlerine benzer ve yapısal olarak kemikleşmiş ve kireçlenmiş olarak sınıflandırılabilir. Kordomalar psödokapsül içinde olduğu için tümör kitlesi yumuşak, sert veya miksoid olabilir (97). Mikroskop altında kordoma hücreleri iğsi ve kordomalara özgü "fizaliferöz-physaliphorous" yapıda gözlenir. Keratin 19 (CK19) ve S-100 kordoma tanısında histolojik boyamalarda kullanılır. Çalışmalardan elde edilen verilere göre kordomanın intraossöz notokordun malign transformasyonu sonucu oluşmuş olabileceği kaydedilmiştir. Kordoma oluşumu; embriyonik notokordlarla histolojik ve immünohistokimyasal olarak benzer olan notokord kalıntılarının insidansı ve lokasyonu ile ilişkilendirilmiştir (84).

Kordomalar kemoterapi ve radyoterapiye karşı oldukça dirençlidirler (17). Bu nedenle radikal cerrahi yöntemler ilk tercihtir (6). Kordoma hastalarının ortalama yaşam süresi 6 yıl olup 5 yıllık sağ kalım oranı %70, 10 yıllık sağ kalım oranı ise %40'tır (19).

Literatürde kordoma modeli olarak kullanılan ve karakterize edilmiş az sayıda kordoma hücre hatları mevcuttur. Kordoma Vakfı tarafından sadece beş adet hücre hattı "kordoma hücre hattı" olarak onaylanmıştır. Bu hücre hatları; U-CH1, U-CH2 ve MUG-Chor1 hücre hatları nüks sakrokoksigeal, JHC7 primer sakrokoksigeal kordomalardır ve UM-Chor1 ise klival orijinlidir.

■ KORDOMA SİTOGENETİĞİ

Tümör oluşumu, kromozomlardaki yapısal değişim ile direkt ilişkilidir. Yaklaşık olarak tüm kordoma tümörlerinin yarısında kromozomal anomaliler gözlenmiştir (86). Klasik G-bantlama, Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH), Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) teknikleri kordomalar-daki kromozomal anomalilerin saptanmasında kullanılmıştır (10,15,35,47,89).

Person ve ark. iki adet sakral kordomada yaptıkları çalışmada, bir tanesinin normal diğerinin ise iki farklı anormal klonu sahip olduklarını göstererek kordomalarda ilk kez sitogenetik anomaliyi saptamışlardır (75). Scheil ve ark. ise 16 kordoma olgusu üzerinde yaptıkları çalışmada, 3p (7 primer tümörün 5'inde, %50) ve 1p (%44) bölgelerinde deoksiribonükleik asit (DNA) kayıpları 20.kromozom, 7q, 5q ve 12q (Sırayla %50, %69, %38 ve %38) bölgelerinde ise DNA'da artış olduğunu tespit etmişlerdir (89). Beş sporadik ve dört kalıtsal kordoma olguları üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise 1p36 bölgesinde delesyon saptanmıştır (57).

2011 yılında Le ve ark. 21 tane sporadik kordoma örneğinde genom-boyu yüksek çözünürlüklü oligonükleotid mikrodizileme yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada, tekrarlayan ve olgu-özge olarak görülen kromozomal değişimleri belirlemişler ve kordomalarda genomik dengesizliğin yüksek olduğunu saptamışlardır (49).

■ HETEROZİGOTLUĞUN KAYBI (LOSS of HETEROZYGOSITY-LOH)

Heterozigotluğun kaybı (LOH) kanser olgularında en sık görülen anomalilerden biridir. Bu anomali sonucunda tümör baskılayıcı (supresor) genler kaybolarak hücre bölünme kontrolü sağlıklı olarak devam ettirilemez.

Kordomalarda Eisenberg ve ark. tarafından yedi sfeno-oksipital veya klival kordoma örneklerinde 13q14 (Rb lokusu) bölgesinde LOH tespit etmişlerdir (26). Ayrıca on iki sakral kordoma hastasında tümör baskılayıcı genlerin bulunduğu 17p, 9p ve 18q bölgelerinde kayıp olduğu gösterilmiştir (45).

Klinik bulgular ile birlikte yapılan analizlerde 9p bölgesinde görülen anomalinin (LOH) genel sağ kalım süresini azalttığı, 1p, 10q23 ve 17p13 bölgesindeki LOH'ların ise bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır (39).

Çoklu immünohistokimya (tissue microarray immunohistochemistry) yöntemi ile yapılan bir başka çalışmada ise sakral kordomaların %98'inde ve kafa tabanı kordomalarının %67'sinde FHIT (fragile histidine triad) proteininin ekspresyonunun azaldığı veya tamamen ortadan kalktığı rapor edilmiştir (23).

■ MOLEKÜLER BİYOBELİRTEÇLER ile KORDOMANIN AYIRICI TANISI

Kordomalar, kondrosarkom ile sık sık karıştırılır, fakat bu tümörlerin köken aldıkları dokular ve klinik tabloları ve tedavileri farklıdır (Tablo I). Kondrosarkomlar primitif mezenkimal hücrelerden veya kranium'un kıkırdak matriksinin embriyonik kalıntısından meydana gelirken, kafa tabanında bulunan kordoma, sfeno-oksipital sinkondrozda bulunan primitif notokord kalıntılarında ortaya çıkar. Ayrıca kordomalar ve kondrosarkomlar arasındaki en belirleyici fark olan Brachyury'nin ortaya çıkması ile birlikte kordoma tanısında altın standart olarak kullanılmaya başlanmıştır (7).

Diğer bağ doku kanserlerle karşılaştırdığımızda kordomalar; kollajen II, agrekan, fibromodulin, kıkırdak bağlama proteini ve kıkırdak oligomerik matriks proteini gibi ekstra-hücrel matriks ve hiyalin kıkırdaklarına özgün proteinleri yüksek seviyede sentezler. Ayrıca kondrojenik transkripsiyon faktörü Sox9, fibronektin, MMP9 ve MMP19 proteinleri de kordoma hücrelerinde fazlasıyla bulunur (36,91,103).

Kordomalar ile diğer kondroid neoplazmaların gen ifade profilleri karşılaştırarak yapılan çalışmada Brachyury, Sitokeratin 8, 15, 18 ve 19, CD24 antijeni, periplakin, diskoidin alanı reseptörü 1 kordomalarda mevcutken mitojen görevi gören PDGF-alfa, endoplazmik retikulum proteini sayılan reticulocalbin-3 ve kıkırdak kalsifikasyonunda rol alan Kollajen-10'un kordomalarda bulunmadığı gösterilmiştir (103).

■ KALITSAL KORDOMA OLGULARI

Kordomalar genellikle sporadik olsa da kalıtsal geçiş gösteren olgular da literatürde rapor edilmiştir. Kalıtsal özellik gösteren kordomalarda Kelley ve ark.; 7q33 lokusunun önemli olduğunu, Yang ve ark. ise brachyury genini içeren 6q27 bölgesinin duplikasyonunu keşfetmişlerdir (2,10,13,43,95,106).

Tablo I: Moleküler Belirteçlerin Kordomalardaki Rolü

Belirteç	Kromozomal Bölge	Çalışma Grubu	Kanserde Rolü
EMA	1q21	Walker ve ark. 1991	Tümör büyümesi, kemoterapötiklere karşı direnç ve invazyon artışı, apoptozun inhibisyonu
Galektin-3	14q22.3	Gotz ve ark. 1997	Malign transformasyon, tümör büyümesi, anjiogenez, invazyon ve metastaz
E-Kaderin	16q22.1	Naka ve ark. 2001	Tümör hücre adezyonu
Vimentin	10p13	Niwa ve ark. 1994	Metastaz, tümör büyümesi
CD24	6q21	Oakley ve ark. 2008	Tümör büyümesi, tümör hücresi invazyonu ve metastaz
CD44	11p13	Saad ve Collins 2005	Tümör büyümesi, tümör hücresi adezyonu, migrasyon, invazyon ve metastaz
Sitokeratin-19	17q21.2	Walker ve ark. 1991	Apoptozun engellenmesi ve metastaz
Sitokeratin-8	12q13	Vujovic ve ark. 2006	Tümör ilerlemesi, metastaz
Sitokeratin-13	17q12-q21.2	Schwab ve ark. 2009	Tümör büyümesi
Sitokeratin-15	17q21.2	Vujovic ve ark. 2006	Tümör ilerlemesi
Sitokeratin-18	12q13	O'hara ve ark. 1998	Tümör ilerlemesi
c-met	7q31	Naka ve ark. 1997	Tümör hücresi invazyonu ve metastaz
Brachyury	6q27	Romeo ve Hogendoorn 2006	Tümör ilerlemesi
FOSB	19q13.32	Schwab ve ark. 2009	Tümör ilerlemesi ve tümör hücresi invazyonu
IL-18	11q22.2-q22.3	Schwab ve ark. 2009	Tümör ilerlemesi, anjiogenez, migrasyon, metastaz, proliferasyon ve immün sistemden kaçış
FGF 1	5q31	Schwab ve ark. 2009	Tümör büyümesi, invazyon
Sindekan 4	20q12	Schwab ve ark. 2009	Tümör hücre migrasyonu, invazyon
İntegrin beta 4	17q25	Schwab ve ark. 2009	Tümör ilerlemesi, tümör hücre invazyonu
Stat3	17q21.31	Yang ve ark. 2010	Tümör ilerlemesi, anjiogenez, invazyon ve metastaz, apoptozun inhibisyonu
SRC	20q12-q13	Yang ve ark. 2010	Tümör ilerlemesi, metastaz
Bcl-xl	20q11.21	Yang ve ark. 2010	Kemoterapötiklere karşı direnç
MCL1	1q21	Yang ve ark. 2010	Kemoterapötiklere karşı direnç
Survivin	17q25	Chen ve ark. 2013	Apoptozun inhibisyonu
Periplakin	16p13.3	Vujovic ve ark. 2006	Tümör ilerlemesi
PDGF reseptör b	5q33.1	Negri ve ark. 2007	Tümör ilerlemesi, metastaz
KIT	4q11-q12	Negri ve ark. 2007	Tümör ilerlemesi
EGFR	7p12	Weinberger ve ark. 2005	Tümör ilerlemesi
TGF-alfa	2p13	Tamborini ve ark. 2010	Tümör ilerlemesi

Kırk kordoma hastasında ve 358 soy eşleştirilmiş kontrol grubunda yapılan bir başka çalışmada ise brachyury genindeki G>A tek nükleotid polimorfizmi gösterilmiştir. Bu bulgular ışığında brachyury genindeki bu varyasyon kordoma riskinin yükselmesine sebep olur (76). Kordomalarda ailesel geçişi göstermek için yapılan bir diğer çalışmada ise 1., 17., ve 19.kromozomlar ile kordoma arasında bir bağlantı olabileceği öngörülmüştür (46).

■ KORDOMANIN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Kordomalarda yapısal proteinler ve büyüme faktörlerinin etkileri üzerine yapılan çalışmalarda, tümörün ilerlemesine sebep olan östrojen reseptör alfa ve progesteron reseptör beta eksprese ettiği gösterilmiştir (16). Ayrıca transforme edici büyüme faktörü alfa (TGf α) ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ekspresyonunun yüksek oranda nükleus sebep olduğu ve yüksek fibronektin ekspresyonunun da kordomalarda agresifliği artırdığı gösterilmiştir (22). Membrana bağlı bir protein olan yüksek moleküler ağırlıklı melanoma ilişkili antijen (HMW-MAA) melanomalarda yüksek oranda eksprese edilir ve invazyon ile migrasyonda rol oynamaktadır. Kondroitin sülfat proteoglikan 4 (CSPG4) olarak da bilinen (HMW-MAA) 21 adet kordoma örneğinin %62'sinde varlığı tespit edilmiştir (92).

Scheil-Bertram ve ark. CD24, ECRG4, RARRES2, RAP1, HAI2, RAB38, IGFBP2, osteopontin, GalNAc-T3 ve VAMP8 genlerinin kordoma patogenezinde potansiyel aday genler olduklarını ve bu genlerin farklı ekspresyonlarının kordomanın gelişiminde önemli rol alabileceklerini ortaya koydular (88). El-Heliebi ve ark. ise kordomalarda morfolojik olarak farklı olan hücreleri birbirlerinden ayırarak moleküler genetik ve transkriptomik analizlerini yaptılar. Yaptıkları bu çalışma ile U-CH1 ve MUG-Chor1 hücre hatlarında bulunan büyük "physaliferous" hücrelerin *UCHL3* genini yüksek seviyede eksprese ettiğini belirlediler. Bununla birlikte, MUG-Chor1 hücre hatlarında bulunan "physaliferous" hücrelerinin ALG11 ve PPP2CB yüksek seviyede eksprese ettiğini ve TMEM144 ekspresyonunun farklı seviyede eksprese ettiğini gösterdiler. Yapılan bu çalışma ile farklı seviyede eksprese edilen bu genlerin kordoma gelişiminde rol alan aday genler olduğunu saptadılar (27).

Kordomalarda proteomik düzeyde yapılan tek çalışmada kordomalar ile komşu normal dokulardaki protein seviyelerini karşılaştırılmış ve 14 adet proteinin yüksek, 5 adet proteinin ise düşük seviyede olduğunu gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre PKM2, ENO1 ve gp96 proteinlerinin kordomalarda yüksek seviyede olduklarını ve nükleus tümörlerde primer tümörlere göre daha fazla olduklarını belirlenmiştir (108). Hücre siklusunun ilerlemesindeki kusurlar kalıcı hücre proliferasyonuna ve mutasyonlara sebep olur. Hücre siklusu protein siklin D1'in yüksek seviyede ekspresyonu hücre siklusu ilerlemesine sebep olarak tümörogeneze neden olabilir. Hücre proliferasyonunda önemli bir göreve sahip siklin D1 26 kordoma örneğinde yüksek oranda bulunduğu Kilgore ve Prayson tarafından tespit edilmiştir (44). Çeşitli kanserlerde yüksek oranda bulunan c-Met ve epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR)'nin kordomalarda da yüksek oranda bulunurken c-Erb-b2 (HER2/neu)'nin ise çeşitli oranlarda bulunduğu bilinmektedir

(104). Kordomalarda yüksek oranda fosforile platelet-kökenli büyüme faktörü reseptörü içermektedir ve bu sebepten dolayı kordomanın tedavisinde yeni kemoterapötik ilaçlar kullanılmaktadır (18,48,64,99).

■ HÜCRE ADEZYONU ve EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞ

Hücre adezyon proteinleri kanserin aşamalarında hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks ile etkileşiminde rol alırlar. Kordoma tümörü keratin pozitif bir kanserdir. CK8, CK19 ve keratin kokteyli AE1/AE3 sürekli olarak eksprese edilir (32,56,66,85). Hücre adezyon molekülü (HAM) proteinleri olan E-Kaderin, alfa-katenin, beta-katenin, ve gama-katenin ile sinir hücresi adezyon molekülleri (SHAM)'nin kordomalarda bulunduğu bilinmektedir (63). Horiguchi ve ark. E-Kaderin'in nükleer ekspresyonunun kordomanın karakteristik özelliği ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. E-Kaderin'in nükleus ile immünoaktivitesinin kordoma tümör hücrelerinde %68,8 oranında olurken, beta-kateninin normal lokalizasyona sahip olduğu bulunmuştur (40).

Epitelyal hücreler birbirlerine tutunma özelliklerini kaybederek migrasyon ve invazyon yeteneği kazanır ve mezenkimal hücrelere dönüşür. E-Kaderin ekspresyonunun azalması veya ortadan kalkması epitelyal-mezenkimal geçiş (EMG)'de kritik bir role sahiptir ve bu olay invazif ve metastatik fenotipi tetikler. N-Kaderin çoğu invazif kanserde yüksek seviyededir ve E-Kaderin ile ters orantılıdır. Klival kordomalarda yapılan bir çalışmada ise E-Kaderin ile N-Kaderin arasında ters korelasyon olduğu görülmüştür. E-Kaderinin ekspresyonunun azalması ve N-Kaderin'in ekspresyonunun artmasının tümör nüksü ve ölüm riskini artırdığı bulunmuştur (100). Buna göre EMG'nin kordomalarda rolü olduğunu söyleyebiliriz.

■ BRACHYURY (T)

Yunancada "kısa kuyruk" anlamına gelen Brachyury T-kutusu transkripsiyon ailesinin bir üyesidir ve mezodermal formasyon ile embriyonik aşamalarda görev alır (11,29,42). İlk kez 1991 yılında klonlanmıştır (38). Çok sayıda çalışma brachyury'nin farelerde kuyruk oluşumunda görev aldığını kanıtlamıştır (11,38,96). Son yıllarda ise brachyury'nin embriyonik kök hücrelerdeki varlığının ve etkisinin araştırılması üzerine yoğunlaşmıştır (21,67,90). Ayrıca, brachyury'nin teratomlarda eksprese edildiği bulunmuştur ve meme, kolon, akciğer ve prostat kanserlerinde de yüksek seviyede eksprese edildiği bilinmektedir (73,87,98). Mezenkimal tümörlerin gen ekspresyonu analizi üzerine yapılan bir çalışmada notokord için spesifik olan bir proteinin kordomalarda da bulunduğu tespit edilmiştir (36). Bu çalışmadan sonra mikrodizin ve immünohistokimyasal çalışmalar brachyury'nin kordomalarda yüksek seviyede bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Elde edilen bu sonuçlarla birlikte kordomanın notokord kökenli bir kanser türü olduğu gösterilmiş oldu (81,103). Bir transkripsiyon faktörü olan Brachyury proteininin 99 adet hedef genine direkt olarak bağlanır ve 64 genin ekspresyonunu da dolaylı olarak düzenler (65).

Pilay ve ark. 40 kordomalı bireyin germ hücrelerinden elde ettiği DNA'yı kullanarak T ekzonunun sekansını Sanger ve

tüm-ekzon sekanslama yöntemi ile belirlendi. Elde edilen bu veriler brachyury geninin RS2305089 bölgesindeki Tek-Nükleotid-Değişimi (SNP) ile kordoma oluşumu arasında sıkı bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu SNP'deki varyant genotip Brachyury'nin fonksiyonunu değiştirir ve bu gen tarafından regüle edilen bazı genlerin regülasyonunu bozabilir. Bu olay da kordomanın başlamasını ve ilerlemesini sağlayan mekanizmaları harekete geçirebilir (76).

Brachyury her ne kadar kordomaların diğer omurga tümörlerinden ayrılmasında geniş ölçüde kullanılsa da elde edilen bazı veriler Brachyury'nin hastalığındaki fonksiyonel prognostik rolü ile ters düşmektedir. Zhang ve ark. doku mikrodizileme yöntemi ile brachyury ekspresyon seviyesi ile genel sağ kalım oranlarını karşılaştırmışlardır ve brachyury ekspresyon seviyesi ile prognoz arasında bir korelasyon bulamamışlardır (107).

Adenoid kistik karsinomlarında yapılan bir çalışmada brachyury ekspresyonunun azalmasının kanser kök hücre ve epitel-yal-mezenkimal özelliklerinin geri döndüğünü göstermişlerdir (94). Brachyury'nin immünolojik özelliğini gösteren başka bir çalışmada ise spesifik olarak Brachyury eksprese eden hücrelere zarar veren CD8+ sitotoksik T hücrelerin çeşitli hücre hatlarından geliştirildiği gösterilmiştir. Ayrıca JHC7 kordoma hücre hattında Brachyury geninin shRNA ile susturulması ile hücrelerde büyümenin durdurulduğu gösterilmiştir (41). Buna göre Brachyury kordoma tedavisinin tedavisi için olası bir terapötik hedeftir diyebiliriz (68).

■ miRNA EKSPRESYONU

Duan ve ark. tarafından iki kordoma dokusu ve U-CH1 kordoma hücre hattı ile yapılan miRNA çalışmasında, miR-1 ve miR-206 ekspresyonlarının kordomalarda kas hücrelerine göre daha az seviyede olduğu kanıtlanmıştır (24). Bu çalışmanın devamı olarak 35 adet sporadik kordomanın %93,7'sinde miR-1'in az seviyede eksprese edildiği gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçların doğruluğunun gösterilmesi adına miR-1 ekspresyonu ile miR-1'in varsayılan hedeflerinden birisi olan Met ekspresyonu arasında ters korelasyon olduğu da ayrıca saptanmıştır. Bu çalışmalarda miR-1 seviyesinin hasta sağ kalımı ile ilişkili olduğu ve miR-1'in ektopik ekspresyonunun kordoma hücrelerinde hücre büyümesini ve proliferasyonunu azaltmasına sebep olmuştur (25).

Bayrak ve ark. yaptığı çalışmada ise sekiz adet taze kafa tabanı kordoma örneği ile U-CH1 hücre hattı kullanılarak miRNA profili belirlenmiştir. Bu çalışmada sekiz adet nukleus pulposus örneği sağlıklı kontrol olarak kullanılmıştır. Nukleus pulposus'un notokorddan kökenlendiğini gösteren verilerin hızla artmasından dolayı sağlıklı kullanılmıştır. Elli üç miRNA'nın kordomalarda farklı seviyede eksprese edildiği gösterilmiştir. En önemlisi ise çeşitli kanserlerin başlangıcında ve ilerlemesinde rol alan miR-31, miR-140-3p, miR-148a ve miR-221/222 ailesini içeren miRNA'ların da kordomalarda farklı seviyelerde eksprese edildiği saptanmıştır. Yapılan fonksiyonel çalışmalar neticesinde ise miR-31'in kordomalarda apoptozu tetiklediği ve c-MET ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (9).

Kordomanın patogenezinin mekanizmasını göstermek için yapılan bir başka çalışmada ise üç adet parafine gömülü kor-

doma örneği ile üç adet parafine gömülü embriyonik notokord örneklerinin miRNA ve mRNA profili çıkartılarak karşılaştırılmıştır. Otuz üç miRNA'nın ve 2791 mRNA'nın farklı seviyelerde eksprese edildiği bulunmuştur. Ayrıca, 911 mRNA'nın olası miRNA hedefleri ile eşleşti. KEGG yolak analizi ile kordomalarda MAPK yolağının aktivasyonunun arttığı ve miR-663a, miR-149-3p, miR-1908, miR-2861 ve miR-3185 miRNA'larının az seviyede ekspresyonunun bu yolda rol alan ilgili mRNA'ların ekspresyonunu artırması ile ilişkilendirilmiştir (51).

■ DNA METİLASYONU

Epigenetik bir değişim olan DNA metilasyonu memelilerde gelişimin önemli bir etmenidir. Gen spesifik kromozom bölgelerinde DNA'nın metillenme durumundaki değişiklikler hastalıkların ve tümörögenезin belirleyici unsurlarındandır.

Rinner ve ark. 10 kordoma örneğini kullanarak dizi CGH analizi yapmışlardır. XIST, FMR1, C3, HIC1, RARB, DLEC1, TACSTD2, RASSF1 ve KL gibi tümör baskılayıcı genlerin önemli bir şekilde farklı olarak metile edildiklerini göstermişlerdir (80). PTEN ve CDKN2A'nın metilasyon analizi Le ve ark. tarafından yapılmış ve CDKN2A mekanizmasının örneklerin küçük bir kısmına limitli olduğunu görmüşlerdir. PTEN'in sessizleştirilmesinde metilasyonun rolü ile ilgili veriler ise bir sonuç vermemiştir (49).

Sekiz sakral kordoma örneğinde X kromozomu inaktivasyonu protokolü ve X kromozomu üzerinde bulunan polimorfik insan androjen reseptörü geni belirteç olarak kullanılarak metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile klonalite çalışması yapılmıştır. Çalışılan örneklerin poliklonal kökenli olduğu ortaya çıkmıştır. Diğer solid tümörlerde olduğu gibi, bu poliklonalite kromozomal değişimlerin dengesizliğinden kaynaklanabilir ve hematopoetik maligniteler gibi monoklonal tümörlerle karşılaştırıldığında moleküler hedeflerin kullanılacağı tedavilerin kullanılmasını zorlaştırabilir (45).

■ TİROZİN KİNAZ RESEPTÖRLERİ

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) bir transmembran glikoproteinidir ve hücre yaşama, çoğalma ve farklılaşmada önemli bir rolü vardır. Tümör hücrelerinde kötü prognoza, sağ kalımın azalmasına ve kimyasal tedavi ile ışın tedavisine direnç sebep olur (37).

Shalaby ve ark. kordoma patogenezinde EGFR'nin etkisini çalışmış ve 160 hastadan 173 kordoma örneğini immünohistokimyasal yolla analiz etmişlerdir. Örneklerinin yaklaşık %40'ında EGFR geninin bulunduğu 7p12 bölgesinde yüksek seviyede kopya sayısının arttığı saptanmışlardır. Bununla beraber, örneklerinin %69'unda EGFR'nin total ekspresyonu bakımından pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle kordoma hastalarını EGFR-pozitif ve EGFR-negatif olarak sınıflandırmak faydalı olacaktır (93).

Bir başka çalışmada, reseptör tirozin kinaz sinyal transdüksiyon aktivitesinin immünohistokimyasal analizi 21 kordoma olgusunda yapılmıştır. HER2, KIT, EGFR ve PDGFR-β sırasıyla %0, %33, %67 ve %100 oranında saptanmıştır. Tirozin kinaz aktivitesini gösteren P44/42-mitojen-aktive protein kinazın fosforile izoformu, Akt ve STAT3 kordomaların çoğunda tespit

edilmiştir (28). Başka bir çalışma ise kordomaların %81'inde EGFR'nin ifade edildiğini göstermiştir (78).

Yeni yapılan bir çalışmada 52 primer ve 104 nüks lezyonda PDGFR-alfa, c-MET ve EGFR'nin ifadesi analiz edilmiş ve klinikopatolojik parametrelerle uyumu araştırılmıştır. PDGFR-alfa, EGFR ve c-MET'in sırayla primer tümörlerin %75, %83 ve %77 oranında eksprese edildiği saptanmıştır. Ayrıca, incelenen bütün tirozin kinaz reseptörlerin nüks örneklerde %97 oranında ifade edildiği bulunmuştur. Genç hastaların yaşı, daha yüksek PDGFR-alfa ve c-MET ekspresyonu ile ilişkili iken, PDGFR-alfa ve EGFR ekspresyonu ise kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (1).

■ APOPTOZ

p53 tümör baskılayıcı protein hemen hemen tüm kanser türlerinde çok önemli bir role sahiptir. P53 genindeki mutasyon, artan yarılanma süresinden dolayı yüksek seviyede protein varlığına sebep olur (79). p53 birikimi kordomalarda da gözlenmiştir (39,69,83). Yüksek seviyede p53'ün kordomalarda etkisini araştıran çalışmaların sonuçlarına göre nükseden ve nüksmeyen intrakraniyal kordomaların farklı çoğalma potansiyelleri olduğu ortaya konmuştur. Nükseden tümörlerin MIB-1 boyama indeksi nüksmeyen tümörlere göre daha yüksektir ve p53 ile siklin D1 gibi hücre döngüsü proteinlerinin pozitif boyanması tümörün nüksmesiyle ilgili yüksek seviyede ilişkilidir (53). G1-S kontrol noktasındaki genlerin ekspresyon seviyelerini araştıran başka bir çalışmada ise primer tümörlerin %10-%45'inin p53, MDM2, siklin D1 ve pRb protein düzeylerinde değişimler bulunmuştur. Tüm bunlar arasında G1-S kontrol noktasındaki protein değişimlerinde sadece p53 protein ekspresyonunun artması ile sağ kalım süresi arasında ters ilişki olduğu bulunmuştur. Sakral ve kafa tabanı kordomasının kullanıldığı bir başka çalışmada ise CDK4, p53, ve MDM2'nin yüksek ekspresyonunu sırasıyla %20, %28 ve %56 oranında saptanmıştır. CDK4 ve p53 ekspresyonu ile kötü sağ kalım arasında bir ilişki ortaya konulmuştur (105).

Park ve ark. kordoma ve notokord hücrelerinin apoptotik indeksini ve çoğalma potansiyellerini belirlemiş, NGF ve TrkA reseptörlerinin kordomalarda yüksek seviyede ifade edildiklerini ortaya koymuşlardır. Buna göre notokordal kalıntıların kordomaya transformasyon mekanizmasında p75 reseptörünün apoptotik sinyalini ortadan kaldırmasının rolü olduğu düşünülebilir. Cerrahi müdahaleden sonra alınan 10 sakral kordoma örneğinde ortalama çoğalma potansiyel indeksi notokord hücrelerinde daha yüksek iken ortalama apoptoz indeksi kordomalarda daha düşük olduğu belirlenmiştir (72).

Survivin apoptoz inhibitör gen ailesine ait bir gen dir. Bu gen apoptoza karşı tümörü güçlendirir ve kaspaz-bağımlı ve kaspaz-bağımlı-olmayan yollarla apoptozu engelleyebilir (30). Chen ve ark. 30 kordoma örneğinde yaptığı çalışmada survivin'in %70 oranında ifade edildiğini buldular. Ayrıca survivin ifadesi ile nüks arasında bir korelasyon olduğunu ortaya koyarak survivin'i potansiyel bir terapötik hedef olarak sunmuşlardır (20).

■ İNVAZYON ve METASTAZ

Kordomalar her ne kadar yavaş-büyüyen tümörler olarak düşünülse de bazı kordomalarda tümör çok agresiftir ve metastatiktir. Bu tümörler akciğere, kemiğe ve karaciğere metastaz yapabilir. Kordomalar genellikle lokal olarak invazivdir ve metastaz genellikle hastalığın son aşamasında ortaya çıkar. Kafa tabanı kordomalarında metastaz görülme oranı %10'dan az, spinal tümörlerde ise %20-40 arasındadır. Primer tümörler çoğunlukla karaciğere, akciğere, kemiğe ve deriye metastaz yaparlar. Ayrıca kas, retroperitoneal, plevra ve böbreküstü bezleri, dalak, pankreas, kalp, böbrekler ve mesane'ye de metastaz yapabilirler (4,12,31,34,55,74,102).

Yüksek oranda nüks olan kordoma tümörlerinde büyük bir kemik yıkımı gözlenir (31,52). Kordoma epitelyal ve mezenkimal karakteristik gösteren nadir bir kemik tümörüdür. Yapılan çeşitli çalışmalar kordomanın epitelyal özelliği ile invazivliği arasında bir ilişki olabileceğini göstermiştir. Matris metalloproteinaz 1 (MMP-1), matris metalloproteinaz 2 (MMP-2), doku inhibitörü metalloproteinaz-1 (TIMP-1), katepsin B ve ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) kordomalarda yüksek seviyededir. Bu moleküler özellikler birçok primer ve nüks kafa tabanı kordomasında konak kemik hücresinin tümör infiltrasyonu ile ilişkili olabilir. Ayrıca yüksek seviyede MMP-1 ile uPA kötü prognoz göstergesidir (62). Aynı grup tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise spinal kordoma hastalarında yüksek MMP-2 ekspresyonunun kötü prognoza sebep olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada, düşük-molekül-ağırlıklı sitokeratin (CAM5.2), kafa tabanı kordomasında TIMP-1, cathepsin B ve uPa ile spinal kordomada ise MMP-1, MMP2 ve uPA ile bağdaşmaktadır (59).

Epitelyal belirteç E-Kaderin ekspresyonu kordomalarda daha önce rapor edilmişti. Yedi kordoma olgusunda Ep-CAM, pan-sitokeratin ve E-Kaderin'in immünohistokimyasal olarak boyanması ile ortaya çıkan sonuçlara göre E-Kaderin'in özellikle hücre-hücre adezyonunun olduğu yerlerde eksprese edildiği ve bunun lokal invaziv tümör fenotipine sebep olduğu düşünülmektedir. Aynı çalışmada ise N-Kaderin'in ilerlemiş kordomalarda eksprese edildiği, nüksüz sağ kalım ile ilişkili olduğu ve E-Kaderin ile ters korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Aynı çalışma E-Kaderin ekspresyonunun düştüğünü ve bu durumun yüksek morbidite ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Elde edilen bu bilgiler Kaderin proteinlerinin kordoma tümör karakterinde ve hastalık seyrinde önemli bir role sahip olduğunu ortaya koymaktadır (40,58,63,64,100).

Bir integral plazma membran proteini olan MET hücrelerarası madde ve sitoplazma arasında sinyalizasyonda rol alan bir tirozin kinaz reseptörüdür. MET'in yüksek oranda ekspresyonu tümör büyümesini ve metastazı, hücre ayrışmasını ve doku infiltrasyonunu artırır (3,14). HGF/c-MET sinyalinin rolü çok kez incelenmiştir ve bu sinyalin çeşitli sarkoma ve karsinomlarda tümörögenez, kötü prognoz ve invazivlik ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (33,77,82). İki farklı çalışmada c-MET ekspresyonunun kordomaların büyük çoğunluğunda bulunduğu gösterilmiştir (60,104).

Yapılan çok sayıda çalışmada c-MET ile tümör habisliği arasında sıkı bir ilişki olduğu izlenmiştir. Naka ve ark. c-MET ve HGF'nin ekspresyonunun 46 primer ve 25 nüks kafa tabanı

kordomasında klinikopatolojik önemi, proliferasyon yeteneği, hücre farklılaşması, prognoz ve tümörün invaziv yeteneğiyle ilişkisini incelemiştir. Primer tümörlerin %70'inde, nüks tümörlerin ise %88'inde c-MET'in ifade edildiği gösterilmiştir. CAM5.2 ile c-MET ekspresyonu arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. uPA ekspresyonunun primer lezyonlarda yüksek seviyede c-MET ekspresyonu ile ilişkilendirilirken, nüks lezyonlarda yüksek seviyede c-MET ekspresyonu uPA, MMP-1, MMP-2, ve TIMP-1 ile ilişkilendirilmiştir. Tüm bu bulgulara rağmen yüksek seviyede c-MET ekspresyonuna sahip hastaların daha uzun yaşam süresine sahip oldukları gözlenmiştir (61).

İnvazyon ve metastaz ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı olsa da, bu alanda yapılan çalışmalar moleküler tekniklerin gelişmesiyle hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Gelecekte, kordomaların tanısında, prognozunda ve terapötik hedeflerin belirlenmesinde daha fazla ilerleme ve gelişme görülecektir.

■ KORDOMALARDA KANSER KÖK HÜCRESİ BENZERİ HÜCRELER

Kanser kök hücre teoremi, heterojen yapıya sahip kanser hücrelerinin alt grubunun kendini yenileme ve farklılaşma yeteneği gibi kök hücrelere özgü özellik göstermesinin belirlenmesi ile ortaya konmuştur. Bu alt grup kanser hücreleri tümör büyümesi, nüks, metastaz ve kemoterapiye direnç ile ilişkilendirilmiştir.

Kordomalarda yapılan ilk kanser kök hücre çalışması Aydemir ve ark. tarafından yapılmıştır. CD90 ve CD105 gibi kök hücre belirteçlerinin kafa tabanı kordomasında ve U-CH1 hücre hattında yüksek miktarda bulunduğu gözlemlenmiştir. Oct4, klf4, c-myc, sox2, embriyonik kök hücre belirteci CD15 ve nanog ekspresyonu örneklerde tespit edilmiştir. Osteojenik besiyerinde, kök hücre benzeri kanser hücreleri önemli morfolojik değişimler göstermiş ve alkalik fosfat aktivitesi artmıştır. Ayrıca bu alt grup hücrelerin yumuşak agar besiyerinde büyüdüğü gözlemlenmiştir. Bu büyüme kendini yenileme ile ilişkilendirilir. Farklılaştırma ajanları migrasyon hızını düşürmüştür (5,9). Ayrıca etoposid ve cisplatin kemoterapötiklerinin farklılaştırma ajanı olan retinoik asit ile kombine bir şekilde kullanılmasının U-CH1 hücre hattının büyümesini inhibe etmesi, kordomaların kemoterapötiklere olan direncini kanser kök hücre varlığı ile açıklanabilir (8). Kanser kök hücre belirteci olan ALDH, MUG-Chor1 hücre hattında çok az oranda olsa da gözlemlenmiştir (50).

Hsu ve ark. Brachyury, keratin, S-100 belirteçlerini ekspresyon eden JHC7 kordoma hücre hattını elde edildikten sonra kültüre edilen JHC7 hücre hattı hücreleri çeşitli sayılarda Obez Olmayan-Diyabetik (NOD)/Ağır Kombine Bağışıklık Yetmezliği (SCID) olan farelere subkutan olarak enjekte etmiş ve kordomaların fenotipik özelliği ile örtüşen tümörlerin oluşmasının mümkün olduğu belirlenmiştir (41). NOD/SCID farelerde oluşan bu tümörler de kordomalarda kanser kök hücrelerin kordomada varlığına bir işaret olarak yorumlanabilir.

Tümörögenizde ve metastazda kanser kök hücrelerin önemi ile görüşlerin giderek çoğalması ile kanser kök hücre alt grubunun tedavi için önemli bir hedef haline gelmesi beklenmektedir. Ancak, kordomalarda kanser kök hücrelerinin rolünün

araştırılması için daha fazla araştırma yapılması gereklidir. Kordomalardaki kök hücre benzeri kanser hücrelerinin rutin olarak temel araştırmalarda hastalık modeli ve hastalardan elde edilen kordoma modelleri olarak kullanılması ilaç tarama çalışmalarının ilerlemesine katkı sağlayacaktır.

■ GELECEK İÇİN YÖNLENDİRMELER

Kordomaların moleküler ve genetik yönlerinin araştırılması ile ilgili çok önemli çalışmalar olmasına rağmen, bu çalışmalar hastalıkta meydana gelen moleküler ve genetik değişimlerin hedeflenmesinde etkili tedavi için yeterli değildir. Dahası, kordomalarda mutasyonlu birçok genin fenotipik olarak nelere sebep olduğu şu ana kadar aydınlatılmamıştır. Kordomaların moleküler regülasyonu ve önemli belirteçlerin tanımlanması hakkındaki sorular, cevaplara göre çok daha fazladır ve günden güne artmaktadır (70).

Kanser kök hücreleri kordomaların onkogenezi ve orijini ortaya koymak için ön plana çıkmaktadır. Heterojen hücre popülasyonunun bu ilginç kemik tümörünün temel resmini tamamlamak için daha detaylı bir şekilde karakterize edilmesi gereklidir. Her tümörde bulunan neoplastik ve neoplastik olmayan hücrelerin geniş genetik, transkripsiyon, translasyon ve epigenetik karakterizasyonu her fenotip ve yapı için gereklidir. Kapsamlı karşılaştırma çalışmaları neoplastik hücrelerin azaltılması için yeni tedavi yaklaşımlarını sağlayacaktır. Daha sonra ise ayırt edici özellikler olan plastisite, agresiflik, kendini yenileme, dediferansiyasyon, çoklu potansiyel, geleneksel terapilere dirençli etkileştiren hücreler ve moleküler planlar hedeflenebilir.

Kordomalarda ortak moleküler modellerin belirlenmesinde yeni biyobelirteçlerin tanımlanması çok önemlidir. Bu adım şu an için moleküler tanı, prognoz ve terapötik tanımlar için mevcut değildir.

■ SONUÇ

Son yıllarda gelişme gösteren kordomanın moleküler karakterizasyonu, bu hastalığın anlaşılmasında önemli faydalar sağlamıştır. Buna rağmen bu tümörün nadir olarak görülmesi, yeterli sayıda *in vivo* ve *in vitro* modellerin olmaması ve hastalığın heterojenliği hastalığın anlaşılmasını ve etkili tedavilerin yapılmasını zorlaştırmaktadır. Yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, genomik, proteomik, hayvan modelleri ve klinik örnekler üzerinde yapılan çok sayıda moleküler ve entegre çalışmalara rağmen, kordoma biyolojisi üzerine çok daha yüksek çözümlü çalışmalar yapılması gerekmektedir. Yapılacak bu çalışmalar sınıflandırma, prognoz, tedavi tercihleri ve ortaya çıkan tedavilerin geliştirilmesine önemli katkı sağlayacaktır. Yaptığımız bu derlemenin kordoma çalışmalarına rehberlik edeceğini ve yeni araştırmaların yapılmasına yol gösterici olduğunu umuyoruz.

■ KAYNAKLAR

1. Akhavan-Sigari R, Gaab MR, Rohde V, Abili M, Ostertag H: Expression of PDGFR-alpha, EGFR and c-MET in spinal chordoma: A series of 52 patients. *Anticancer Res* 34(2):623-630, 2014

2. Al-Mefty KK, Pravdenkova S, Sawyer J, Al-Mefty O: Impact of cytogenetic abnormalities on the management of skull base chordomas. *J Neurosurg* 110(4):715-724, 2009
3. Appleman LJ: MET signaling pathway: A rational target for cancer therapy. *J Clin Oncol* 29(36):4837-4838, 2011
4. Auger M, Raney B, Callender D, Eifel P, Ordonez NG: Metastatic intracranial chordoma in a child with massive pulmonary tumor emboli. *Pediatr Pathol* 14(5):763-770, 1994
5. Aydemir E, Bayrak OF, Sahin F, Atalay B, Kose GT, Ozen M, Sevli S, Dalan AB, Yalvac ME, Dogruluk T, Ture U: Characterization of cancer stem-like cells in chordoma. *J Neurosurg* 116(4):810-820, 2012
6. Bailey CS, Fisher CG, Boyd MC, Dvorak MF: En bloc marginal excision of a multilevel cervical chordoma. Case report. *J Neurosurg Spine* 4(5):409-414, 2006
7. Barresi V, Ieni A, Branca G, Tuccari G: Brachyury: A diagnostic marker for the differential diagnosis of chordoma and hemangioblastoma versus neoplastic histological mimickers. *Dis Markers* 2014:514753, 2014
8. Bayrak OF, Aydemir E, Gulluoglu S, Sahin F, Sevli S, Yalvac ME, Acar H, Ozen M: The effects of chemotherapeutic agents on differentiated chordoma cells. *J Neurosurg Spine* 15(6):620-624, 2011
9. Bayrak OF, Gulluoglu S, Aydemir E, Ture U, Acar H, Atalay B, Demir Z, Sevli S, Creighton CJ, Ittmann M, Sahin F, Ozen M: MicroRNA expression profiling reveals the potential function of microRNA-31 in chordomas. *J Neurooncol* 115(2):143-151, 2013
10. Bayrakli F, Guney I, Kilic T, Ozek M, Pamir MN: New candidate chromosomal regions for chordoma development. *Surg Neurol* 68(4):425-430; discussion 430, 2007
11. Beddington RS, Rashbass P, Wilson V: Brachyury-a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis. *Dev Suppl* 1992:157-165
12. Bergh P, Kindblom LG, Gunterberg B, Remotti F, Ryd W, Meis-Kindblom JM: Prognostic factors in chordoma of the sacrum and mobile spine: A study of 39 patients. *Cancer* 88(9):2122-2134, 2000
13. Bhadra AK, Casey AT: Familial chordoma. A report of two cases. *J Bone Joint Surg Br* 88(5):634-636, 2006
14. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF: Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(12):915-925, 2003
15. Brandal P, Bjerkehagen B, Danielsen H, Heim S: Chromosome 7 abnormalities are common in chordomas. *Cancer Genet Cytogenet* 160(1):15-21, 2005
16. Camacho-Arroyo I, Gonzalez-Aguero G, Gamboa-Dominguez A, Cerbon MA, Ondarza R: Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. *J Neurooncol* 49(1):1-7, 2000
17. Carrabba G, Dehdashti AR, Gentili F: Surgery for clival lesions: Open resection versus the expanded endoscopic endonasal approach. *Neurosurg Focus* 25(6):E7, 2008
18. Casali PG, Messina A, Stacchiotti S, Tamborini E, Crippa F, Gronchi A, Orlandi R, Ripamonti C, Spreafico C, Bertieri R, Bertulli R, Colecchia M, Fumagalli E, Greco A, Grosso F, Olmi P, Pierotti MA, Pilotti S: Imatinib mesylate in chordoma. *Cancer* 101(9):2086-2097, 2004
19. Casali PG, Stacchiotti S, Sangalli C, Olmi P, Gronchi A: Chordoma. *Curr Opin Oncol* 19(4):367-370, 2007
20. Chen C, Yang HL, Chen KW, Wang GL, Lu J, Yuan Q, Gu YP, Luo ZP: High expression of survivin in sacral chordoma. *Med Oncol* 30(2):529, 2013
21. Christoforou N, Miller RA, Hill CM, Jie CC, McCallion AS, Gearhart JD: Mouse ES cell-derived cardiac precursor cells are multipotent and facilitate identification of novel cardiac genes. *J Clin Invest* 118(3):894-903, 2008
22. Deniz ML, Kilic T, Almaata I, Kurtkaya O, Sav A, Pamir MN: Expression of growth factors and structural proteins in chordomas: Basic fibroblast growth factor, transforming growth factor alpha, and fibronectin are correlated with recurrence. *Neurosurgery* 51(3):753-760; discussion 760, 2002
23. Diaz RJ, Guduk M, Romagnuolo R, Smith CA, Northcott P, Shih D, Berisha F, Flanagan A, Munoz DG, Cusimano MD, Pamir MN, Rutka JT: High-resolution whole-genome analysis of skull base chordomas implicates FHIT loss in chordoma pathogenesis. *Neoplasia* 14(9):788-798, 2012
24. Duan Z, Choy E, Nielsen GP, Rosenberg A, Iafrate J, Yang C, Schwab J, Mankin H, Xavier R, Hornicek FJ: Differential expression of microRNA (miRNA) in chordoma reveals a role for miRNA-1 in Met expression. *J Orthop Res* 28(6):746-752, 2010
25. Duan Z, Shen J, Yang X, Yang P, Osaka E, Choy E, Cote G, Harmon D, Zhang Y, Nielsen GP, Spentzos D, Mankin H, Hornicek F: Prognostic significance of miRNA-1 (miR-1) expression in patients with chordoma. *J Orthop Res* 32(5):695-701, 2014
26. Eisenberg MB, Woloschak M, Sen C, Wolfe D: Loss of heterozygosity in the retinoblastoma tumor suppressor gene in skull base chordomas and chondrosarcomas. *Surg Neurol* 47(2):156-160; discussion 160-161, 1997
27. El-Heliebi A, Kroneis T, Wagner K, Meditz K, Kolb D, Feichtinger J, Thallinger GG, Quehenberger F, Liegl-Atzwanger B, Rinner B: Resolving tumor heterogeneity: Genes involved in chordoma cell development identified by low-template analysis of morphologically distinct cells. *PLoS One* 9(2):e87663, 2014
28. Fasig JH, Dupont WD, LaFleur BJ, Olson SJ, Cates JM: Immunohistochemical analysis of receptor tyrosine kinase signal transduction activity in chordoma. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34(1):95-104, 2008
29. Fehling HJ, Lacaud G, Kubo A, Kennedy M, Robertson S, Keller G, Kouskoff V: Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development* 130(17):4217-4227, 2003
30. Fukuda S, Pelus LM: Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* 5(5):1087-1098, 2006
31. Gay E, Sekhar LN, Rubinstein E, Wright DC, Sen C, Janecka IP, Snyderman CH: Chordomas and chondrosarcomas of the cranial base: Results and follow-up of 60 patients. *Neurosurgery* 36(5):887-896; discussion 896-897, 1995
32. Gotz W, Kasper M, Miosge N, Hughes RC: Detection and distribution of the carbohydrate binding protein galectin-3 in human notochord, intervertebral disc and chordoma. *Differentiation* 62(3):149-157, 1997

33. Grigioni WF, Fiorentino M, D'Errico A, Ponzetto A, Crepaldi T, Prat M, Comoglio PM: Overexpression of c-met protooncogene product and raised Ki67 index in hepatocellular carcinomas with respect to benign liver conditions. *Hepatology* 21(6):1543-1546, 1995
34. Guedes A, Barreto BG, Barreto LG, de Oliveira Araujo IB, Queiroz AC, Athanzio DA, Athanzio PR: Metastatic parachordoma. *J Cutan Pathol* 36(2):270-273, 2009
35. Hallor KH, Staaf J, Jonsson G, Heidenblad M, Vult von Steyern F, Bauer HC, Ijszenga M, Hogendoorn PC, Mandahl N, Szuhai K, Mertens F: Frequent deletion of the CDKN2A locus in chordoma: Analysis of chromosomal imbalances using array comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer* 98(2):434-442, 2008
36. 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* 6(9):R76, 2005
37. Herbst RS: Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59 Suppl 2:21-26, 2004
38. Herrmann BG: Expression pattern of the Brachyury gene in whole-mount TWis/TWis mutant embryos. *Development* 113(3):913-917, 1991
39. Horbinski C, Oakley GJ, Cieply K, Mantha GS, Nikiforova MN, Dacic S, Seethala RR: The prognostic value of Ki-67, p53, epidermal growth factor receptor, 1p36, 9p21, 10q23, and 17p13 in skull base chordomas. *Arch Pathol Lab Med* 134(8):1170-1176, 2010
40. Horiguchi H, Sano T, Qian ZR, Hirokawa M, Kagawa N, Yamaguchi T, Hirose T, Nagahiro S: Expression of cell adhesion molecules in chordomas: An immunohistochemical study of 16 cases. *Acta Neuropathol* 107(2):91-96, 2004
41. Hsu W, Mohyeldin A, Shah SR, ap Rhys CM, Johnson LF, Sedora-Roman NI, Kosztowski TA, Awad OA, McCarthy EF, Loeb DM, Wolinsky JP, Gokaslan ZL, Quinones-Hinojosa A: Generation of chordoma cell line JHC7 and the identification of Brachyury as a novel molecular target. *J Neurosurg* 115(4):760-769, 2011
42. Kavka AI, Green JB: Tales of tails: Brachyury and the T-box genes. *Biochim Biophys Acta* 1333(2):F73-84, 1997
43. Kelley MJ, Korczak JF, Sheridan E, Yang X, Goldstein AM, Parry DM: Familial chordoma, a tumor of notochordal remnants, is linked to chromosome 7q33. *Am J Hum Genet* 69(2):454-460, 2001
44. Kilgore S, Prayson RA: Apoptotic and proliferative markers in chordomas: A study of 26 tumors. *Ann Diagn Pathol* 6(4):222-228, 2002
45. Klingler L, Shooks J, Fiedler PN, Marney A, Butler MG, Schwartz HS: Microsatellite instability in sacral chordoma. *J Surg Oncol* 73(2):100-103, 2000
46. Korczak JF, Kelley MJ, Allikian KA, Shah AA, Goldstein AM, Parry DM: Genomic screen for linkage in a family with autosomal dominant chordoma. *Am J Hum Genet* 61(4):A400-A400, 1997
47. Kuzniacka A, Mertens F, Strombeck B, Wiegant J, Mandahl N: Combined binary ratio labeling fluorescence in situ hybridization analysis of chordoma. *Cancer Genet Cytogenet* 151(2):178-181, 2004
48. Lagonigro MS, Tamborini E, Negri T, Staurengo S, Dagrada GP, Miselli F, Gabanti E, Greco A, Casali PG, Carbone A, Pierotti MA, Pilotti S: PDGFRalpha, PDGFRbeta and KIT expression/activation in conventional chondrosarcoma. *J Pathol* 208(5):615-623, 2006
49. Le LP, Nielsen GP, Rosenberg AE, Thomas D, Batten JM, Deshpande V, Schwab J, Duan Z, Xavier RJ, Hornicek FJ, Iafrate AJ: Recurrent chromosomal copy number alterations in sporadic chordomas. *PLoS One* 6(5):e18846, 2011
50. Lohberger B, Rinner B, Stuendl N, Absenger M, Liegl-Atzwanger B, Walzer SM, Windhager R, Leithner A: Aldehyde dehydrogenase 1, a potential marker for cancer stem cells in human sarcoma. *PLoS One* 7(8):e43664, 2012
51. Long C, Jiang L, Wei F, Ma C, Zhou H, Yang S, Liu X, Liu Z: Integrated miRNA-mRNA analysis revealing the potential roles of miRNAs in chordomas. *PLoS One* 8(6):e66676, 2013
52. Maira G, Pallini R, Anile C, Fernandez E, Salvinelli F, La Rocca LM, Rossi GF: Surgical treatment of clival chordomas: The transphenoidal approach revisited. *J Neurosurg* 85(5):784-792, 1996
53. Matsuno A, Sasaki T, Nagashima T, Matsuura R, Tanaka H, Hirakawa M, Murakami M, Kirino T: Immunohistochemical examination of proliferative potentials and the expression of cell cycle-related proteins of intracranial chordomas. *Hum Pathol* 28(6):714-719, 1997
54. McMaster ML, Goldstein AM, Bromley CM, Ishibe N, Parry DM: Chordoma: Incidence and survival patterns in the United States, 1973-1995. *Cancer Causes Control* 12(1):1-11, 2001
55. McPherson CM, Suki D, McCutcheon IE, Gokaslan ZL, Rhines LD, Mendel E: Metastatic disease from spinal chordoma: A 10-year experience. *J Neurosurg Spine* 5(4):277-280, 2006
56. Meis JM, Giraldo AA: Chordoma. An immunohistochemical study of 20 cases. *Arch Pathol Lab Med* 112(5):553-556, 1988
57. Miozzo M, Dalpra L, Riva P, Volonta M, Macciardi F, Pericotti S, Tibiletti MG, Cerati M, Rohde K, Larizza L, Fuhrman Conti AM: A tumor suppressor locus in familial and sporadic chordoma maps to 1p36. *Int J Cancer* 87(1):68-72, 2000
58. Mori K, Chano T, Kushima R, Hukuda S, Okabe H: Expression of E-cadherin in chordomas: Diagnostic marker and possible role of tumor cell affinity. *Virchows Arch* 440(2):123-127, 2002
59. Naka T, Boltze C, Kuester D, Schulz TO, Samii A, Herold C, Ostertag H, Roessner A: Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-9, cathepsin B, and urokinase plasminogen activator in non-skull base chordoma. *Am J Clin Pathol* 122(6):926-930, 2004
60. Naka T, Iwamoto Y, Shinohara N, Ushijima M, Chuman H, Tsuneyoshi M: Expression of c-met proto-oncogene product (c-MET) in benign and malignant bone tumors. *Mod Pathol* 10(8):832-838, 1997
61. Naka T, Kuester D, Boltze C, Scheil-Bertram S, Samii A, Herold C, Ostertag H, Krueger S, Roessner A: Expression of hepatocyte growth factor and c-MET in skull base chordoma. *Cancer* 112(1):104-110, 2008

62. Naka T, Kuester D, Boltze C, Schulz TO, Samii A, Herold C, Ostertag H, Roessner A: Expression of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9; tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1 and -2; cathepsin B; urokinase plasminogen activator; and plasminogen activator inhibitor, type I in skull base chordoma. *Hum Pathol* 39(2):217-223, 2008
63. Naka T, Oda Y, Iwamoto Y, Shinohara N, Chuman H, Fukui M, Tsuneyoshi M: Immunohistochemical analysis of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, gamma-catenin, and neural cell adhesion molecule (NCAM) in chordoma. *J Clin Pathol* 54(12):945-950, 2001
64. Negri T, Casieri P, Miselli F, Orsenigo M, Piacenza C, Stacchiotti S, Bidoli P, Casali PG, Pierotti MA, Tamborini E, Pilotti S: Evidence for PDGFRA, PDGFRB and KIT deregulation in an NSCLC patient. *Br J Cancer* 96(1):180-181, 2007
65. Nelson AC, Pillay N, Henderson S, Presneau N, Tirabosco R, Halai D, Berisha F, Flicek P, Stemple DL, Stern CD, Wardle FC, Flanagan AM: An integrated functional genomics approach identifies the regulatory network directed by brachyury (T) in chordoma. *J Pathol* 228(3):274-285, 2012
66. O'Hara BJ, Paetau A, Miettinen M: Keratin subsets and monoclonal antibody HBME-1 in chordoma: Immunohistochemical differential diagnosis between tumors simulating chordoma. *Hum Pathol* 29(2):119-126, 1998
67. Paige SL, Osugi T, Afanasiev OK, Pabon L, Reinecke H, Murry CE: Endogenous Wnt/beta-catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells. *PLoS One* 5(6):e11134, 2010
68. Palena C, Plev DE, Tsang KY, Fernando RI, Litzinger M, Krukovskaya LL, Baranova AV, Kozlov AP, Schlom J: The human T-box mesodermal transcription factor Brachyury is a candidate target for T-cell-mediated cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 13(8):2471-2478, 2007
69. Pallini R, Maira G, Pierconti F, Falchetti ML, Alvino E, Cimino-Reale G, Fernandez E, D'Ambrosio E, Larocca LM: Chordoma of the skull base: Predictors of tumor recurrence. *J Neurosurg* 98(4):812-822, 2003
70. Pamir MN, Ozduman K: Tumor-biology and current treatment of skull-base chordomas. *Adv Tech Stand Neurosurg* 33:35-129, 2008
71. Papagelopoulos PJ, Mavrogenis AF, Galanis EC, Savvidou OD, Boscaiños PJ, Katonis PG, Sim FH: Chordoma of the spine: Clinicopathological features, diagnosis, and treatment. *Orthopedics* 27(12):1256-1263; quiz 1264-1265, 2004
72. Park JB, Lee CK, Koh JS, Lee JK, Park EY, Riew KD: Overexpressions of nerve growth factor and its tropomyosin-related kinase A receptor on chordoma cells. *Spine (Phila Pa 1976)* 32(18):1969-1973, 2007
73. Park JC, Chae YK, Son CH, Kim MS, Lee J, Ostrow K, Sidransky D, Hoque MO, Moon C: Epigenetic silencing of human T (brachyury homologue) gene in non-small-cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 365(2):221-226, 2008
74. Perasole A, Infantolino D, Spigariol F: Aspiration cytology and immunocytochemistry of sacral chordoma with liver metastases: A case report. *Diagn Cytopathol* 7(3):277-281, 1991
75. Persons DL, Bridge JA, Neff JR: Cytogenetic analysis of two sacral chordomas. *Cancer Genet Cytogenet* 56(2):197-201, 1991
76. Pillay N, Plagnol V, Tarpey PS, Lobo SB, Presneau N, Szuhai K, Halai D, Berisha F, Cannon SR, Mead S, Kasperaviciute D, Palmen J, Talmud PJ, Kindblom LG, Amary MF, Tirabosco R, Flanagan AM: A common single-nucleotide variant in T is strongly associated with chordoma. *Nat Genet* 44(11):1185-1187, 2012
77. Pisters LL, Troncoso P, Zhou HE, Li W, von Eschenbach AC, Chung LW: c-met proto-oncogene expression in benign and malignant human prostate tissues. *J Urol* 154(1):293-298, 1995
78. Ptaszynski K, Szumera-Cieckiewicz A, Owczarek J, Mrozkowiak A, Pekul M, Baranska J, Rutkowski P: Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in chordoma. *Pol J Pathol* 60(2):81-87, 2009
79. Reich NC, Oren M, Levine AJ: Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol* 3(12):2143-2150, 1983
80. Rinner B, Weinhaeusel A, Lohberger B, Froehlich EV, Pulverer W, Fischer C, Meditz K, Scheipl S, Trajanoski S, Guelly C, Leithner A, Liegl B: Chordoma characterization of significant changes of the DNA methylation pattern. *PLoS One* 8(3):e56609, 2013
81. Romeo S, Hogendoorn PC: Brachyury and chordoma: The chondroid-chordoid dilemma resolved? *J Pathol* 209(2):143-146, 2006
82. Rong S, Jeffers M, Resau JH, Tsarfaty I, Oskarsson M, Vande Woude GF: Met expression and sarcoma tumorigenicity. *Cancer Res* 53(22):5355-5360, 1993
83. Sakai K, Hongo K, Tanaka Y, Nakayama J: Analysis of immunohistochemical expression of p53 and the proliferation marker Ki-67 antigen in skull base chordomas: Relationships between their expression and prognosis. *Brain Tumor Pathol* 24(2):57-62, 2007
84. Salisbury JR: Embryology and pathology of the human notochord. *Ann Pathol* 21(6):479-488, 2001
85. Salisbury JR, Isaacson PG: Demonstration of cytokeratins and an epithelial membrane antigen in chordomas and human fetal notochord. *Am J Surg Pathol* 9(11):791-797, 1985
86. Sandberg AA, Bridge JA: Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. Synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 133(1):1-23, 2002
87. Sangoi AR, Dulai MS, Beck AH, Brat DJ, Vogel H: Distinguishing chordoid meningiomas from their histologic mimics: An immunohistochemical evaluation. *Am J Surg Pathol* 33(5):669-681, 2009
88. Scheil-Bertram S, Kappler R, von Baer A, Hartwig E, Sarkar M, Serra M, Bruderlein S, Westhoff B, Melzner I, Bassaly B, Herms J, Hugo HH, Schulte M, Moller P: Molecular profiling of chordoma. *Int J Oncol* 44(4):1041-1055, 2014
89. Scheil S, Bruderlein S, Liehr T, Starke H, Herms J, Schulte M, Moller P: Genome-wide analysis of sixteen chordomas by comparative genomic hybridization and cytogenetics of the first human chordoma cell line, U-CH1. *Genes Chromosomes Cancer* 32(3):203-211, 2001

90. Schubert FR, Fainsod A, Gruenbaum Y, Gruss P: Expression of the novel murine homeobox gene *Sax-1* in the developing nervous system. *Mech Dev* 51(1):99-114, 1995
91. Schwab J, Antonescu C, Boland P, Healey J, Rosenberg A, Nielsen P, Iafrate J, Delaney T, Yoon S, Choy E, Harmon D, Raskin K, Yang C, Mankin H, Springfield D, Hornicek F, Duan Z: Combination of PI3K/mTOR inhibition demonstrates efficacy in human chordoma. *Anticancer Res* 29(6):1867-1871, 2009
92. Schwab JH, Boland PJ, Agaram NP, Socci ND, Guo T, O'Toole GC, Wang X, Ostroumov E, Hunter CJ, Block JA, Doty S, Ferrone S, Healey JH, Antonescu CR: Chordoma and chondrosarcoma gene profile: Implications for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 58(3):339-349, 2009
93. Shalaby A, Presneau N, Ye H, Halai D, Berisha F, Idowu B, Leithner A, Liegl B, Briggs TR, Bacsi K, Kindblom LG, Athanasou N, Amary MF, Hogendoorn PC, Tirabosco R, Flanagan AM: The role of epidermal growth factor receptor in chordoma pathogenesis: A potential therapeutic target. *J Pathol* 223(3):336-346, 2011
94. Shimoda M, Sugiura T, Imajyo I, Ishii K, Chigita S, Seki K, Kobayashi Y, Shirasuna K: The T-box transcription factor *Brachyury* regulates epithelial-mesenchymal transition in association with cancer stem-like cells in adenoid cystic carcinoma cells. *BMC Cancer* 12:377, 2012
95. Stepanek J, Cataldo SA, Ebersold MJ, Lindor NM, Jenkins RB, Unni K, Weinshenker BG, Rubenstein RL: Familial chordoma with probable autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet* 75(3):335-336, 1998
96. Stott D, Kispert A, Herrmann BG: Rescue of the tail defect of *Brachyury* mice. *Genes Dev* 7(2):197-203, 1993
97. Sundaresan N, Rosen G, Boriani S: Primary malignant tumors of the spine. *Orthop Clin North Am* 40(1):21-36, 2009
98. Takei H, Powell SZ: Novel immunohistochemical markers in the diagnosis of nonglial tumors of nervous system. *Adv Anat Pathol* 17(2):150-153, 2010
99. Tamborini E, Miselli F, Negri T, Lagonigro MS, Staurengo S, Dagrada GP, Stacchiotti S, Pastore E, Gronchi A, Perrone F, Carbone A, Pierotti MA, Casali PG, Pilotti S: Molecular and biochemical analyses of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) B, PDGFRA, and KIT receptors in chordomas. *Clin Cancer Res* 12(23):6920-6928, 2006
100. Triana A, Sen C, Wolfe D, Hazan R: Cadherins and catenins in clival chordomas: Correlation of expression with tumor aggressiveness. *Am J Surg Pathol* 29(11):1422-1434, 2005
101. Virchow R: Untersuchungen über die Entwicklung des Schädelgrundes im Gesunden und Krankhaften Zustande, und über den Einfluss Derselben auf Schädelform, Gesichtsbildung und Gehirnbau. Berlin: G. Reimer, 1857
102. Volpe R, Mazabraud A: A clinicopathologic review of 25 cases of chordoma (a pleomorphic and metastasizing neoplasm). *Am J Surg Pathol* 7(2):161-170, 1983
103. Vujovic S, Henderson S, Presneau N, Odell E, Jacques TS, Tirabosco R, Boshoff C, Flanagan AM: *Brachyury*, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas. *J Pathol* 209(2):157-165, 2006
104. Weinberger PM, Yu Z, Kowalski D, Joe J, Manger P, Psyrrri A, Sasaki CT: Differential expression of epidermal growth factor receptor, c-Met, and HER2/neu in chordoma compared with 17 other malignancies. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 131(8):707-711, 2005
105. Yakkoui Y, Temel Y, Creyten D, Jahanshahi A, Fleischeuer R, Santegoeds RG, Van Overbeeke JJ: A comparison of cell-cycle markers in skull base and sacral chordomas. *World Neurosurg* 82(1-2):e311-318, 2014
106. Yang XR, Ng D, Alcorta DA, Liebsch NJ, Sheridan E, Li S, Goldstein AM, Parry DM, Kelley MJ: T (*brachyury*) gene duplication confers major susceptibility to familial chordoma. *Nat Genet* 41(11):1176-1178, 2009
107. Zhang L, Guo S, Schwab JH, Nielsen GP, Choy E, Ye S, Zhang Z, Mankin H, Hornicek FJ, Duan Z: Tissue microarray immunohistochemical detection of *brachyury* is not a prognostic indicator in chordoma. *PLoS One* 8(9):e75851, 2013
108. Zhou H, Chen CB, Lan J, Liu C, Liu XG, Jiang L, Wei F, Ma QJ, Dang GT, Liu ZJ: Differential proteomic profiling of chordomas and analysis of prognostic factors. *J Surg Oncol* 102(7):720-727, 2010