ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΜΗΜΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΠΜΣ: «ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ»

Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας:

Επιγενετικές Τροποποιήσεις στο Οστεοσάρκωμα

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ Β. ΣΑΜΕΛΗΣ

ΙΑΤΡΟΣ - ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤ. ΦΟΙΤΗΤΗΣ

samelis_takis@yahoo.com

ΑΘΗΝΑ, 2015

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ

που απονέμει η Ιατρική Σχολή του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Πηνελόπη Κορκολοπούλου (επιβλέπουσα)	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, 1ο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή - ΕΚΠΑ	
Αγγελική Σαέττα	Βιολόγος, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, 1ο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή - ΕΚΠΑ	
Γεώργιος Αγρογιάννης	Παθολογοανατόμος, Πανεπιστημιακός Υπότροφος, 1ο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή - ΕΚΠΑ	

ΑΦΙΕΡΩΝΕΤΑΙ ΣΤΗ ΣΥΖΥΓΟ ΜΟΥ,

ΜΑΙΡΗ ΜΑΤΣΑΓΓΟΥΡΑ

Ευχαριστώ

τον ομότιμο Καθηγητή Ορθοπαιδικής ΕΚΠΑ, Ιδρυτή και Διευθυντή του Ορθοπαιδικού Κέντρου Έρευνας και Εκπαίδευσης του νοσοκομείου «Αττικόν»,

Παναγιώτη Ν. Σουκάκο

και

τη νοσηλεύτρια – εκπαιδεύτρια Μικροχειρουργικής,

Πόπη Καλογερά

για τις γνώσεις που μου προσέφεραν

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ Β. ΣΑΜΕΛΗΣ

ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΟΣ

ΠΜΣ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ: Επιγενετικές τροποποιήσεις στο Οστεοσάρκωμα

Αθήνα, 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

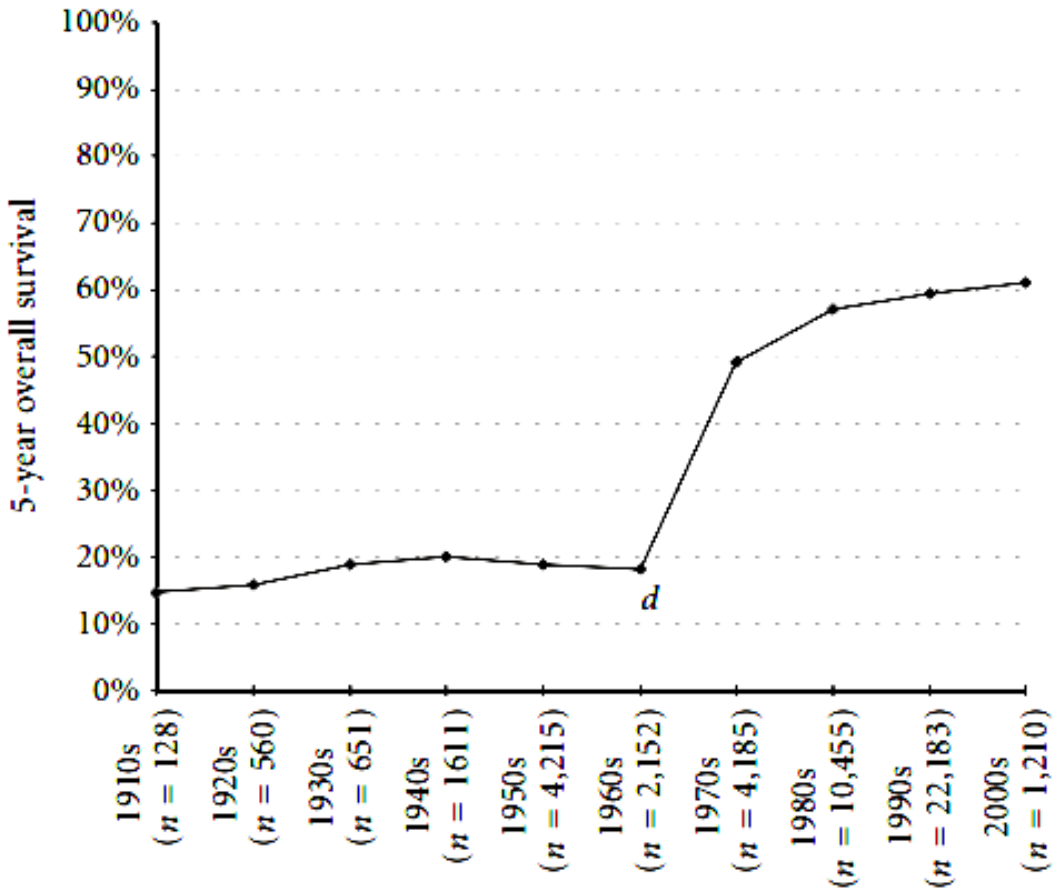
	σελίδα
Α. Εισαγωγή	1
Β. Αιτιοπαθογένεια: του Οστεοσαρκώματος	4
Γ. Ιστολογική εικόνα του Οστεοσαρκώματος	5
Δ. Το Οστεοσάρκωμα ως νόσος διαφοροποίησης	8
Ε. Χρωμοσωμικές – γονιδιακές διαταραχές του Οστεοσαρκώματος	11
1. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο Οστεοσάρκωμα: χρωμόθρυψη	12
2. Γονιδιακές διαταραχές στο Οστεοσάρκωμα: καταιγίδα	12
3. Γενικά επιγενετικά φαινόμενα στο Οστεοσάρκωμα - (μεθυλίωση DNA, ιστονικές τροποποιήσεις, microRNA)	13
i. Μεθυλίωση του DNA	13
ii. Ιστονικές τροποποιήσεις – κώδικας ιστονών	15
iii. microRNA (miRNA)	18
ΣΤ. Επιγενετικές τροποποιήσεις σε Γονίδια και Σηματοδοτικές Οδούς που συμβάλλουν στην ογκογένεση του Οστεοσαρκώματος	18
1. p53	19
2. HIC1	21
3. P21	22
4. GADD45	22
5. Rb	23
6. DOCK5 - TNFRSF10A	24
7. Γονιδιακός τόπος 3q13.31 - LSAMP	24
8. RUNX2	24
9. SPP1 (IBSP, OPN)	26
10. RECQL4	26
11. Το γονίδιο INK4a: p16INK4a - p14ARF	26
12. RASSF1A	28
13. H3K27me	28
14. FGF	29
15. PI3K/Akt	29
16. HIPPO	31
17. Wnt	33
18. Ο ρόλος του WIF1	35
19. PTEN	37
20. IGF2 - H19	38
21. LSD 1	39
22. Άλλα γονίδια που εμπλέκονται στο Οστεοσάρκωμα	39
23. Ενεργοποιημένα ογκογονίδια προκαλούν επιγενετική σίγαση ογκοκατασταλτικών γονιδίων!	40
Ζ. Micro RNA και Οστεοσάρκωμα	41
1. Ογκοκατασταλτικά microRNAs	44

2. MicroRNAs σε ρόλο ογκογονιδίου	45
3. Τα miRNA στη γονιδιακή περιοχή 14q32	45
4. Πρότυπα έκφρασης miRNA στο Οστεοσάρκωμα	48
5. miRNA σχετιζόμενα με το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53	51
6. miRNA σχετιζόμενα με τη σηματοδοτική οδό PI3K/Akt - PTEN	52
7. miRNA και σηματοδότηση Notch	54
Η. miRNA και χημειοθεραπεία	54
Θ. Επιγενετικός καθορισμός της μεταστατικής ικανότητας στο Οστεοσάρκωμα	56
1. Μεθυλίωση του DNA και μετάσταση	56
2. Ακετυλίωση ιστονών και μετάσταση	56
3. Επιγενετική ρύθμιση της αντίστασης στην ανοικία	58
4. miRNA και μετάσταση	58
Ι. Η επιγενετική στην μελλοντική αντιμετώπιση του ΟΣ	61
1. Επιγενετικοί Βιοδείκτες στο Οστεοσάρκωμα: διάγνωση, πρόγνωση, θεραπεία, πρόβλεψη, υποτροπή, μετάσταση	61
2. Βασιζόμενη στα miRNA θεραπευτική παρέμβαση στο Οστεοσάρκωμα	64
3. Θεραπεία διαφοροποίησης στο Οστεοσάρκωμα	65
ΙΑ. Περίληψη	69
ΙΒ. Abstract	70
ΙΓ. Βιβλιογραφία	71

Α. Εισαγωγή

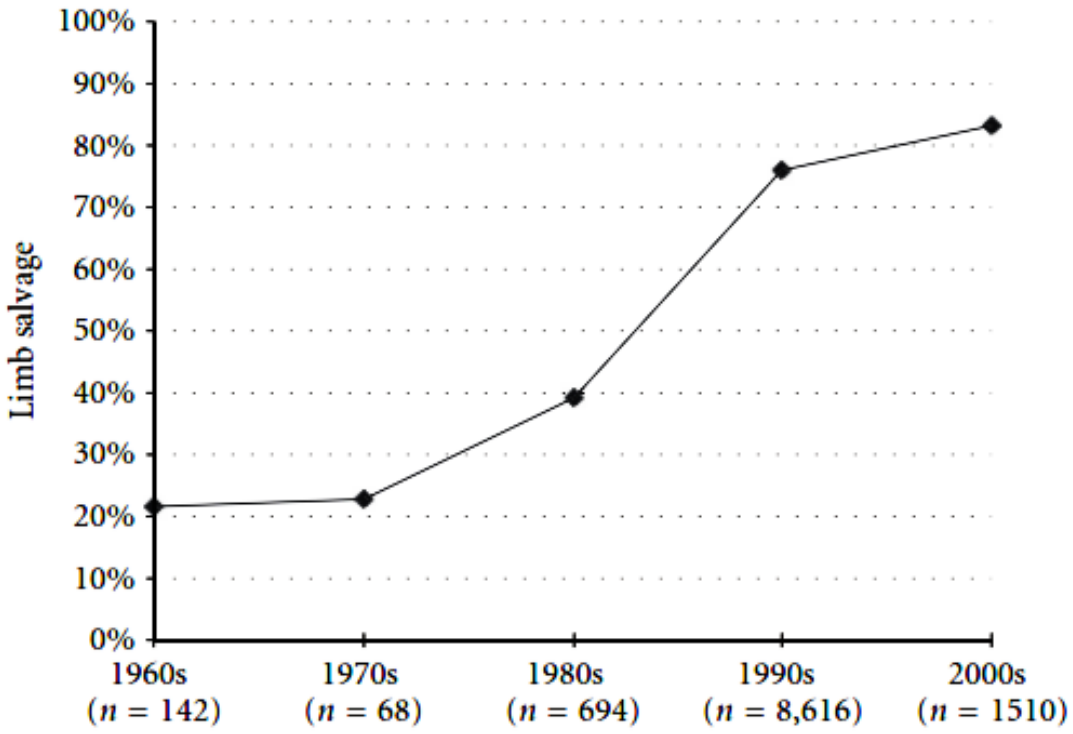
Το οστεοσάρκωμα (ΟΣ) είναι σχετικά σπάνιος όγκος. Αποτελεί λιγότερο από το 0,2% του συνόλου των καρκίνων στις ΗΠΑ (Tang 2008, DeVita 2011, Fujiwara 2014, Weiss 2014, Zhang 2015). Ωστόσο είναι ο συχνότερος πρωτοπαθής κακοήθης όγκος των οστών σε παιδιά και εφήβους, με μεγαλύτερη συχνότητα σε αγόρια και αφρο-αμερικάνικής καταγωγής παιδιά, αποτελώντας το 20% των κακοήθων οστικών όγκων και το 2,4% του συνόλου των κακοηθειών στις ηλικίες αυτές. Αποτελεί την 5η πιο συχνή κακοήθεια στις ηλικίες 15-19 ετών και τη 2η συχνότερη στην εφηβεία (μετά το λέμφωμα). Ευθύνεται για το 9% των θανάτων από καρκίνο στην παιδική ηλικία. Έχει δικόρυφη ηλικιακή κατανομή. Η πρώτη κορυφή παρατηρείται στην 2η 10ετία της ζωής και η δεύτερη σε μεγαλύτερης ηλικίας ενήλικες. Αποτελεί όγκο με μεγάλη επιθετικότητα, δίνοντας μεταστάσεις κυρίως στους πνεύμονες (Haikang 2015). Οι πιο συχνές εντοπίσεις στα νέα άτομα αφορούν περιοχές με ταχεία οστική ανάπτυξη, πχ περιφερικός μηρός, εγγύς κνήμη και εγγύς βραχίονας. Η περιοχή του γόνατος περιλαμβάνει το 50% των περιπτώσεων. Ενώ η συχνότητα του ανθρώπινου ΟΣ είναι 2-5: 1.000.000 (Botter 2014), είναι ενδιαφέρον ότι στα σκυλιά παρατηρείται εξαιρετικά συχνά (1:10.000) (Scott 2011, Sarver 2013).

Ο συνδυασμός συστηματικής θεραπείας με παράγοντες όπως μεθοτρεξάτη, cisplatin, δοξορουβικίνη και χειρουργικής εκτομής όλων των μεταστατικών εστιών θεωρείται ως η πρότυπη θεραπεία του ΟΣ. (Weiss 2014). Μετά την εισαγωγή νεοεπικουρικής (neoadjuvant) χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας η 5ετής επιβίωση των πασχόντων ανήλθε στο επίπεδο του 60–70%, ενώ το 40% καταλήγει από πνευμονικές μεταστάσεις (Haikang 2015). Αναφέρεται ότι ΟΣ χωρίς μεταστάσεις που μπορεί να ελεγχθεί τοπικά και λάβει συστηματική χημειοθεραπεία παρουσιάζει πλήρη 5ετή ύφεση στο 70% (Weiss 2014). Ωστόσο υπάρχουν και πιο απαισιόδοξες μελέτες, οι οποίες αναφέρουν υψηλά ποσοστά υποτροπής της νόσου (80%) με τη μορφή πνευμονικής μετάστασης, σε ασθενείς που θα υποβληθούν σε χειρουργική εκτομή πρωτοπαθούς όγκου (Basu-Roy 2013).



Εικόνα 1: Η προοδευτική βελτίωση της 5ετους επιβίωσης (5 year survival) των ασθενών με ΟΣ και η οροφή της επιβίωσης μετά το 1980 (Allison 2012).

Η πρόοδος στην ανάπτυξη χημειοθεραπευτικών σχημάτων, στην ακτινοθεραπεία και στη χειρουργική οδήγησε σε σημαντική βελτίωση στην επιβίωση των πασχόντων από το 1960 έως το 1980, φτάνοντας έκτοτε σε ένα επίπεδο, πέρα από το οποίο η ανάπτυξη χημειοαντίστασης, παρενεργειών (καρδιοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα), υποτροπής και μεταστάσεων δεν επιτρέπει την περαιτέρω αύξηση της επιβίωσης (DeVita 2011, Mu X 2014). Έτσι, μετά το 1980, η εξέλιξη της τεχνολογίας των υλικών και των χειρουργικών τεχνικών οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επεμβάσεων διάσωσης μέλους (limb salvage), ωστόσο δεν έχει συντελεστεί καμία πρόοδος στην επιβίωση του ΟΣ και μάλιστα ίσως έχει μειωθεί ελαφρά η επιβίωση ελεύθερη νόσου (disease free survival) στα 3, 5 και 10 χρόνια (εικόνες 1 και 2) (Allison 2012).



Εικόνα 2: Η αύξηση των επεμβάσεων διάσωσης (limb salvage) μετά το 1980 (Allison 2012).

Κατά τους συγγραφείς ένα από τα αίτια είναι το γενονός ότι η χρονιότητα μιας νόσου δίνει περισσότερο κέρδος στη φαρμακοβιομηχανία από την ίασή της (Allison 2012). Επομένως το μειωμένο ερευνητικό ενδιαφέρον ήταν άμεση συνέπεια του μειωμένου επενδυτικού ενδιαφέροντος από τις φαρμακευτικές εταιρίες. Η οροφή στην επιβίωση ασθενών από ΟΣ αναγνωρίζεται από όλες τις μελέτες σχετικά με το ΟΣ (Rao-Bindal 2011, Allison 2012, Botter 2014, Weiss 2014). Η επιβίωση μειώνεται δραματικά (20%) σε ασθενείς με μετάσταση ή υποτροπή, καθ΄ότι ο μεταστατικός όγκος αποτελεί πιο επιθετική κυτταρογενετική μορφή της νόσου, ανθεκτική στη χημειοθεραπεία (DeVita 2011, Kresse 2012, Basu-Roy 2013, Botter 2014, Mu X 2014, Zhang 2015, Foley 2015). Παράγοντες, όπως η σπανιότητα του όγκου, αλλά και η μεγάλη μοριακή ποικιλομορφία του, δυσχεραίνουν την αποτελεσματικότητα της κλασσικής χημειοθεραπείας και επιβάλλουν την ανεύρεση καινοτόμων στοχευμένων θεραπευτικών επιλογών (Botter 2014).

Επομένως η οποιαδήποτε περαιτέρω πρόοδος στην αντιμετώπιση του ΟΣ θα εξαρτηθεί από την ανεύρεση νέων θεραπειών, ιδιαίτερα αυτών που θα μειώσουν την πιθανότητα υποτροπής και μετάστασης, ενώ θα παρουσιάζουν μικρότερη κυτταροτοξικότητα και συστηματικές παρενέργειες (DeVita 2011, Mu 2014).

Β. Αιτιοπαθογένεια του ΟΣ

Η αιτιολογία του ΟΣ δεν είναι γνωστή. Η εμφάνιση ΟΣ ακολουθεί σποραδικό πρότυπο, αν και υπάρχει συσχέτιση με μερικές γενετικές προδιαθεσικές καταστάσεις, πχ σύνδρομο Li-Fraumeni. Η ανάπτυξη ΟΣ σε πειραματόζωα έχει συσχετιστεί με έκθεση σε οξείδιο του βηρυλλίου, ορθοπαιδικά εμφυτεύματα και τον ιό FBJ (Finkel, Biskis, Jinkins Virus). DNA του ιού SV40 έχει βρεθεί στο 50% των ΟΣ, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι ο SV40 παίζει ρόλο στην ογκογένεση. Η έκθεση σε θεραπευτική ακτινοβολία σχετίζεται με ανάπτυξη ΟΣ πολλά χρόνια μετά και επομένως η ακτινοβολία μάλλον αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα του δευτερογενούς ΟΣ και όχι του συμβατικού (Tang 2008).

Η παθογένεση του ΟΣ σχετίζεται με διάφορους μηχανισμούς, όπως διαταραχες των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, διαταραχές ογκοκατασταλτικών σηματοδοτικών οδών, καθώς και άλλες γενετικές διαταραχές, πχ προσθήκες, απώλειες ή μεταθέσεις χρωμοσωμικών περιοχών. Όμως οι περισσότερες από αυτές τις διαταραχές, με εξαίρεση τις διαταραχές του p53 και του RB, δεν βρίσκονται σταθερά στην πλειοψηφία των οστεοσαρκωμάτων (Botter 2014, Baker 2015).

Ως όγκος το ΟΣ παρουσιάζει εξαιρετική ετερογένεια (Kuijjer 2013), η οποία διακρίνεται σε 3 επίπεδα: μεταξύ ασθενών (interpatient), μεταξύ όγκων (intertumor) και εντός του ίδιου όγκου (intratumor).

- Interpatient: διάφοροι υπότυποι ιστολογικά και ακτινολογικά
- Intertumor: μεγάλη γονιδιακή ετερογένεια, «καταιγίδα», ανώμαλοι καρυότυποι, χρωμοθρυψία (βλ. Ε.1, Ε.2, σελ. 12).

- Intratumor: ετερογένεια στο μικροπεριβάλλον του όγκου (στρώμα), η παρουσία νεόπλαστων αγγείων, η ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού (Sadikovic 2008, Botter 2014, Baker 2015).

Οι γενετικές διαταραχές επεκτείνονται και στο μιτοχονδριακό DNA, κάτι που παρατηρείται άλλωστε στο 60% των ανθρώπινων νεοπλασιών. Μεταλλάξεις παρατηρούνται τόσο σε κωδικές όσο και σε μη κωδικές περιοχές του mtDNA και κυρίως πρόκειται για missense ή frameshift mutations. Οι μεταλλάξεις αυτές πιθανώς σχετίζονται με την ογκογένεση του ΟΣ. Τέλος, στο ΟΣ το mtDNA παρουσιάζεται μειωμένο και φαίνεται να σχετίζεται με την μεταστατική ικανότητα του όγκου (Man Yu 2013).

Μελέτες σε σκυλιά έδειξαν **δυο μοριακούς υπότυπους ΟΣ** (Scott 2011): Στον ένα υπότυπο παρατηρούνται διαταραχές σε γονίδια που ελέγχουν το σημείο ελέγχου G2/M καθώς και το σημείο ελέγχου βλάβης του DNA, ενώ ο άλλος υπότυπος περιλαμβάνει διαταραχή γονιδίων που σχετίζονται με το μικροπεριβάλλον και το στρώμα (αγγειογένεση, μετανάστευση). Οι δυο μοριακοί υπότυποι έχουν διαφορετική επιβίωση, με τον πρώτο τύπο να παρουσιάζει μεγαλύτερη χημειοανθεκτικότητα και μεταστατική ικανότητα. Φαίνεται ότι η διαταραχή των μηχανισμών ελέγχου των βλαβών του DNA σχετίζεται με παρουσία περισσότερων αρχέγονων καρκινικών κυττάρων (Cancer Stem Cells) και tumor-initiating cells. Ο υπότυπος αυτός δεν εξαρτάται από τις συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος, αλλά έχει εγγενή ικανότητα ανάπτυξης στη μεταστατική εστία, δηλαδή δεν έχει ανάγκη από συνθήκες «φωλέας» (niche).

Γ. Ιστολογική εικόνα του ΟΣ

Το ΟΣ ως κακοήθης οστεογενετικός όγκος των οστών. Έχει ευρύ φάσμα ιστολογικών εμφανίσεων. Κοινό χαρακτηριστικό είναι η παρουσία των υψηλά πολλαπλασιαζόμενων κακοήθων αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων και η παραγωγή οστεοειδούς ή/και οστού από τα κύτταρα του όγκου. Υπάρχουν διάφοροι ιστολογικοί υπότυποι, οι οποίοι

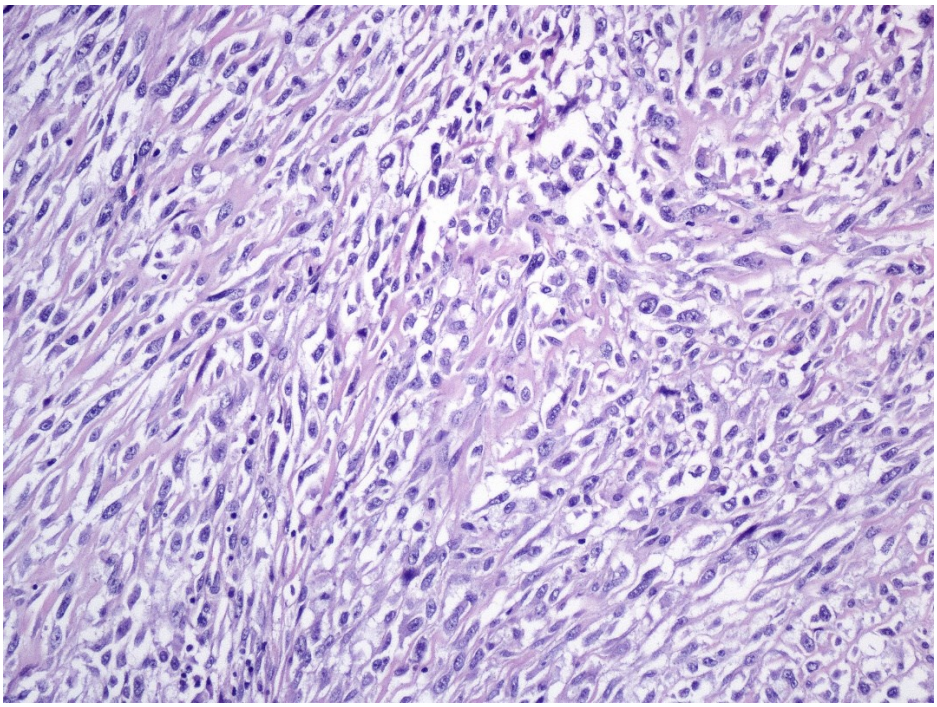
παρουσιάζουν διαφορετική συμπεριφορά από πλευράς πρόγνωσης και πρόβλεψης. Στον πίνακα 1 αναφέρεται η τελευταία (2013) ταξινόμηση των οστεοσαρκωμάτων σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (World Health Organization – WHO) (Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F, editors. Lyon: IARC Press; 2013. World Health Organization, classification of tumours: Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone).

Πίνακας 1: η ταξινόμηση των οστεοσαρκωμάτων σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (World Health Organization – WHO 2013)

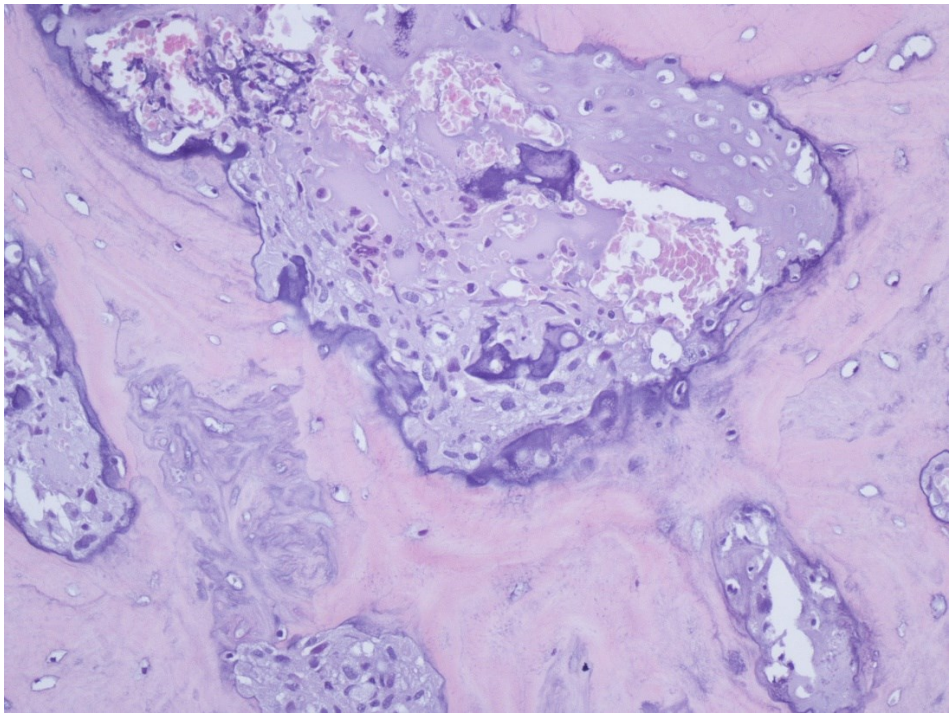
1. Χαμηλόβαθμο κεντρικό ΟΣ (Low-grade central osteosarcoma)
2. Συμβατικό ΟΣ (Conventional osteosarcoma, υψηλόβαθμο κεντρικό ΟΣ - high-grade central osteosarcoma,)
    i. Χονδροβλαστικό ΟΣ (Chondroblastic osteosarcoma)
    ii. Ινοβλαστικό ΟΣ (Fibroblastic osteosarcoma)
    iii. Οστεοβλαστικό ΟΣ (Osteoblastic osteosarcoma)
3. Τηλεαγγειεκτατικό (Telangiectatic osteosarcoma)
4. Μικροκυτταρικό ΟΣ (Small cell osteosarcoma)
5. Δευτεροπαθές ΟΣ (Secondary osteosarcoma)
6. Παροστικό ΟΣ (Parosteal osteosarcoma)
7. Περιοστικό ΟΣ (Periosteal osteosarcoma)
8. Υψηλόβαθμο επιφανειακό ΟΣ (High-grade surface osteosarcoma)

Πιο συχνό είναι το **συμβατικό οστεοβλαστικό ΟΣ** (70%), ενώ ακολουθούν τα: χονδροβλαστικό (10%) και ινοβλαστικό ΟΣ (10%), αναπλαστικό, τηλεαγγειεκτατικό, πλούσιο σε γιγαντοκύτταρα, μικροκυτταρικό. Το συμβατικό ΟΣ είναι ένας πρωτογενής ενδομυελικός υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκος (Tang 2008).

Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται η ιστολογική εικόνα ενός Συμβατικού Ενδομυελικού Οστεοσαρκώματος Υψηλής Κακοήθειας (χρώση Α-Η): Παρατηρείται αυξημένη κυτταροβρίθεια, πλειομορφισμός καθώς και παραγωγή άμορφης εξωκυττάριας ουσίας και οστεοειδούς. Στην εικόνα 4 παρουσιάζεται η ιστολογική εικόνα Χονδροβλαστικού Ενδομυελικού Οστεοσαρκώματος Υψηλής Κακοήθειας.



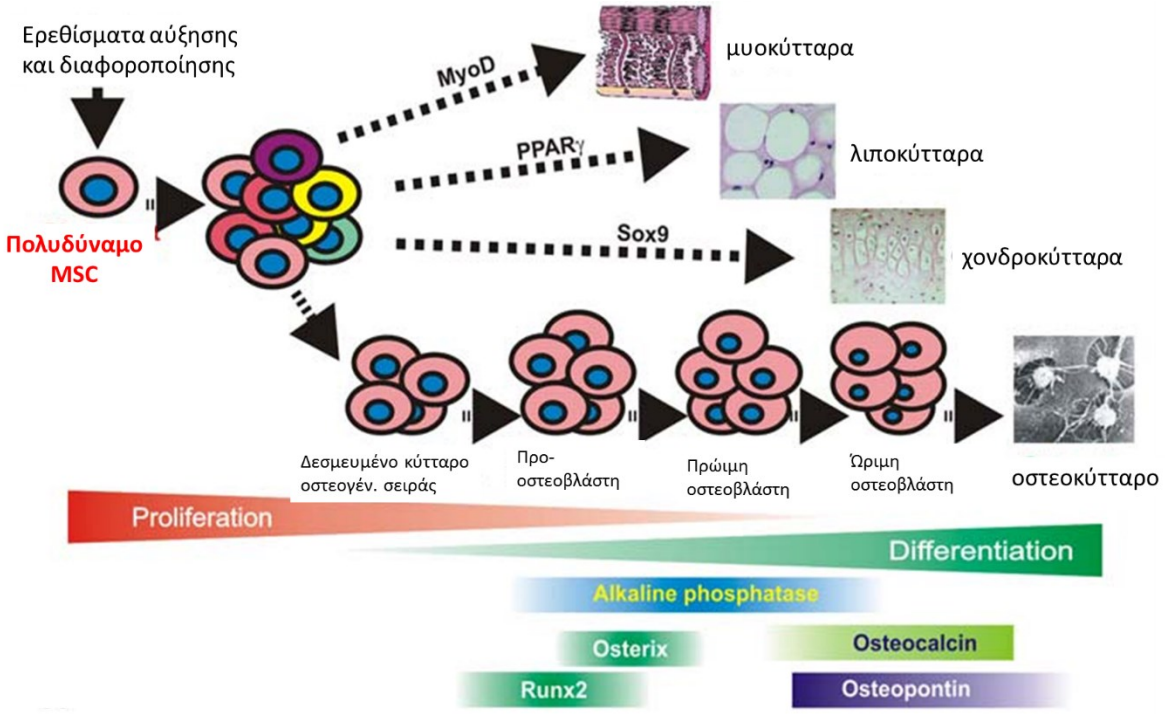
Εικόνα 3: Συμβατικό ενδομυελικό οστεοσάρκωμα υψηλής κακοήθειας. Αυξημένη κυτταροβρίθεια, πλειομορφισμός. Παραγωγή άμορφης εξωκυττάριας ουσίας –οστεοειδούς (Φωτογραφία: Γ. Αγρογιάννης, 1ο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή - ΕΚΠΑ).



Εικόνα 4: Χονδροβλαστικό Ενδομυελικό Οστεοσάρκωμα Υψηλής Κακοήθειας (Φωτογραφία: Γ. Αγρογιάννης, 1ο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή - ΕΚΠΑ).

Δ. Το ΟΣ ως νόσος διαφοροποίησης

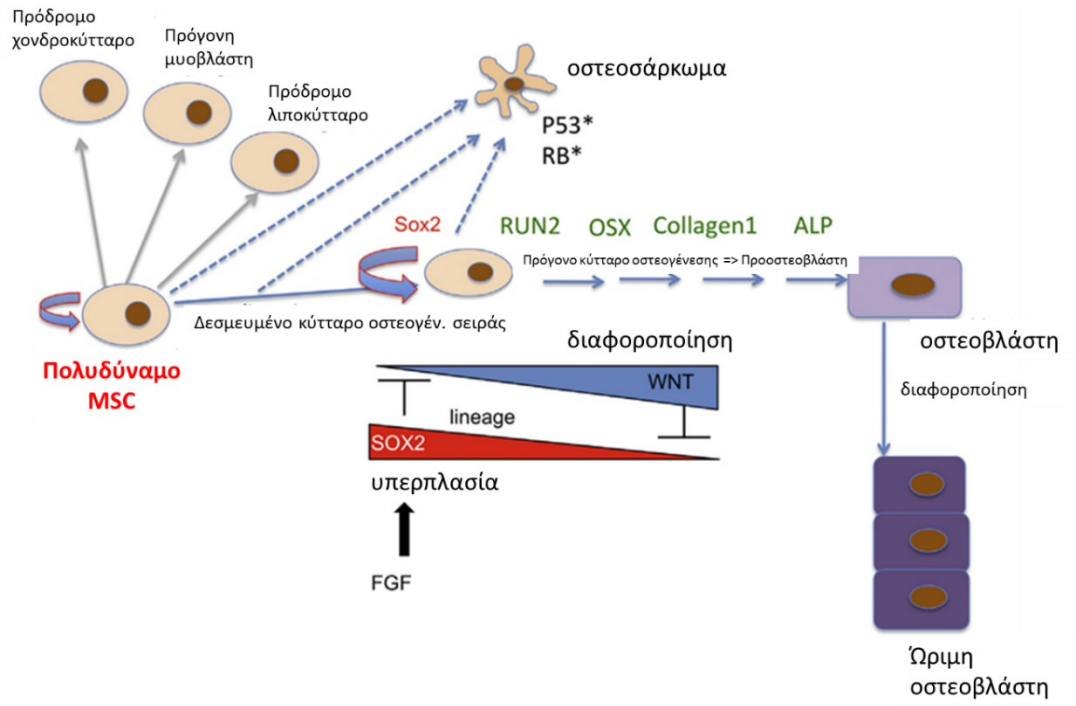
Η φυσιολογική διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων προς τους διάφορους τύπους συνδετικού ιστού επιτυγχάνεται με τη δράση ειδικών ρυθμιστών για κάθε σειρά διαφοροποίησης όπως πχ MyoD, PPARc, Sox9, ή Runx2/Osterix, οι οποίοι ενεργοποιούν και κατευθύνουν τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα (Mesenchymal stem cells - MSCs) προς την κατεύθυνση της μυογένεσης, χονδρογένεσης, λιπογένεσης και οστεογένεσης (εικόνα 5). Η συντονισμένη αυτή διαδοχική ενεργοποίηση και αδρανοποίηση σηματοδοτικών οδών ελέγχεται από επιγενετικούς μηχανισμούς.



Εικόνα 5: η φυσιολογική διαφοροποίηση των διαφόρων μορφών συνδετικού ιστού. Η οστεογενετική διαφοροποίηση καθοδηγείται από παράγοντες όπως οι Runx2, osterix (osx), collagen1, alkaline phosphatase (ALP) και μπορεί να παρακολουθηθεί χρησιμοποιώντας ως πρώιμο δείκτη την αλκαλική φωσφατάση και ως όψιμο δείκτη την οστεοκαλσίνη και οστεοποντίνη (Tang 2008).

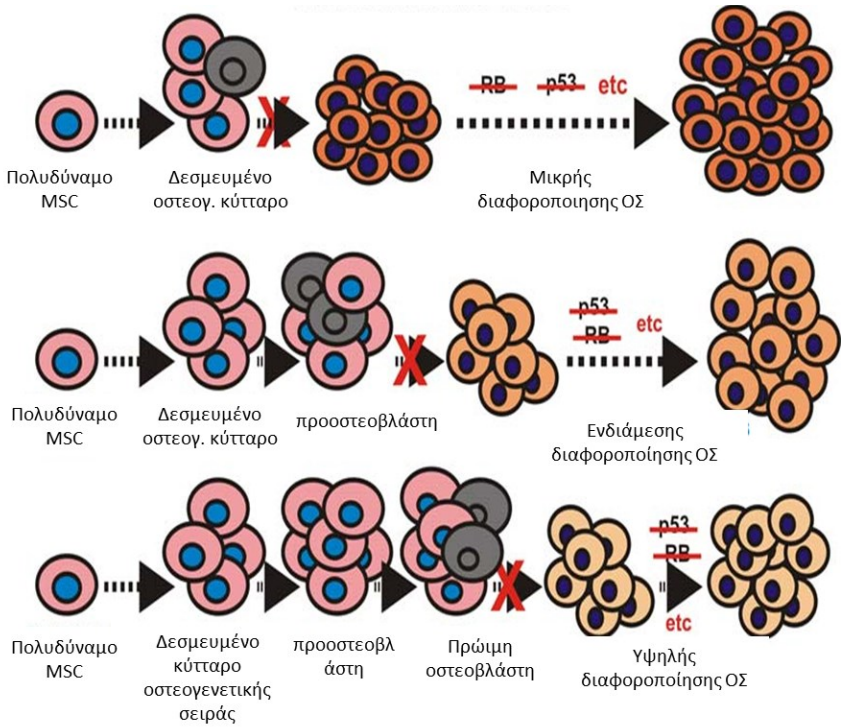
Ειδικότερα, η οστεογενετική διαφοροποίηση καθοδηγείται από παράγοντες όπως οι Runx2, osterix (osx), collagen1, alkaline phosphatase (ALP) και μπορεί να παρακολουθηθεί χρησιμοποιώντας ως πρώιμο δείκτη την **αλκαλική φωσφατάση** και ως όψιμο δείκτη την

οστεοκαλσίνη και **οστεοποντίνη** (Basu-Roy 2013, Vrtačnik 2013). Καθώς προχωρά η διαφοροποίηση η σηματοδότηση Sox2 (εκφράζεται στα MSC και σε ανώριμα πρόδρομα οστεοκύτταρα) μειώνεται ενώ η σηματοδότηση Wnt αυξάνεται (εικόνα 6), με συνέπεια μείωση της αυτοανανέωσης (selfrenewal, maintenance) των MSC και πρόγονων κυττάρων της οστεογενετικής σειράς, και παραγωγή πρωτεϊνών του εξωκυττάριου χώρου (θεμέλιας ουσίας), κυρίως κολλαγόνου I (Tang 2008). Η διαφοροποίηση καταλήγει στο σχηματισμό των ώριμων οστεοβλαστών, οι οποίοι παράγουν οστεοκαλσίνη.



Εικόνα 6: Το ΟΣ ως νόσος διαφοροποίησης αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων. Η δέσμευση των MSC και η διαφοροποίηση της οστεογενετικής σειράς καθοδηγείται από την επίδραση παραγόντων όπως οι Runx2, osterix (osx), collagen1, alkaline phosphatase (ALP). Η αυτοανανέωση (selfrenewal, maintenance) των MSC και πρόγονων κυττάρων της οστεογενετικής σειράς (κυρτά βέλη): η Sox2 μειώνεται και η σηματοδότηση Wnt αυξάνεται καθώς προχωρά η διαφοροποίηση. Η Sox2 (sex determining region Y-box 2) εκφράζεται στα MSC και σε ανώριμα πρόδρομα οστεοκύτταρα. Καθώς προχωρά η διαφοροποίηση, τα κύτταρα σταματούν να πολλαπλασιάζονται και αρχίζουν να παράγουν πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου (θεμέλιας ουσίας), κυρίως κολλαγόνο τύπου I. Η διαφοροποίηση καταλήγει στο σχηματισμό των ώριμων οστεοβλαστών, οι οποίοι παράγουν οστεοκαλσίνη. Το ΟΣ προέρχεται από πολυδύναμα MSC ή από πρόδρομα κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς που όμως είναι αμφιδύναμα (bipotent). Η αδρανοποίηση του Rb και p53 ευνοούν την εμφάνιση του ΟΣ. Βασικό χαρακτηριστικό του ΟΣ, εκτός από την κυτταρική υπερπλασία, είναι η *καθήλωση σε πρώιμα στάδια διαφοροποίησης της οστεοβλάστης* (Basu-Roy 2013).

Η ετερογενής φύση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος δείχνει ότι τα κύτταρα αυτά είναι καθηλωμένα σε διάφορα στάδια της οστεογενετικής διαφοροποίησης του αρχέγονου μεσεγχυματικού κυττάρου και παρουσιάζουν χαρακτηριστικά ανώριμης οστεοβλάστης, η οποία απέτυχε να διαφοροποιηθεί φυσιολογικά (Mortus 2014), κάτι που επιβεβαιώνεται από μελέτες MSC. Τα στάδια διαφοροποίησης αντιστοιχούν σε φάσεις ταχείας ανάπτυξης του οστού και αυτό ερμηνεύει την συχνότερη εμφάνιση πρωτοπαθούς ΟΣ σε μικρές ηλικίες και την εφηβεία και μάλιστα σε περιοχές ταχείας αύξησης, πχ πέριξ του γόνατος (Basu-Roy 2013).



Εικόνα 7: Γενετικές (πχ ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων p53 και RB) και επιγενετικές διαταραχές μπορούν να συμβούν σε διάφορα στάδια της οστεογενετικής διαφοροποίησης. Διαταραχές σε πρώιμα στάδια οδηγούν στην ανάπτυξη λιγότερο διαφοροποιημένων και πιο επιθετικών μορφών ΟΣ και το αντίθετο. Τα κύτταρα με μαύρο χρώμα αποτελούν κύτταρα που μετατρέπονται σε καρκινικά (Tang 2008).

Η διαταραχή της διαφοροποίησης είναι απότοκος γενετικών και επιγενετικών διαταραχών, μεταξύ των οποίων κεντρική θέση κατέχουν οι σηματοδοτικές οδοί p53 και Rb. Η απώλεια της διαφοροποίησης οδηγεί σε επιθετικότερο όγκο και μείωση της επιβίωσης (Gibbs 2005, Thomas 2006, Tang 2008, Basu-Roy 2013). Θα μπορούσε να υποτεθεί ότι

διαταραχές σε πρώιμα στάδια οδηγούν στην ανάπτυξη πιο επιθετικών και μη διαφοροποιημένων μορφών ΟΣ και το αντίθετο (εικόνα 7, Tang 2008).

Ε. Χρωμοσωμικές – γονιδιακές διαταραχές στο ΟΣ

Γενετικές και **επιγενετικές** διαταραχές ευθύνονται για την μεταμόρφωση φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά. Η προοδευτική άθροιση αυτών των αλλαγών καταλήγει στην αποσταθεροποίηση του γονιδιώματος, απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και ενεργοποίηση ογκογόνων σηματοδοτικών οδών. Η αποκάλυψη των διαταραχών αυτών μπορεί να έχει διαγνωστική, προγνωστική και θεραπευτική εφαρμογή (Sadikovic 2010).

Τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά του ΟΣ είναι **χαοτικά**. Το ΟΣ χαρακτηρίζεται από σύνθετες χρωμοσωμικές διαραραχές, οι οποίες ποικίλουν από κύτταρο σε κύτταρο. Οι όγκοι αυτοί παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό ανευπλοειδίας, γονιδιακή ενίσχυση και πολλαπλές μη ισορροπημένες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (Tang 2008, Sadikovic 2008).

Δεν υπάρχει σαφής συσχέτιση των κυτταρογενετικών αυτών χαρακτηριστικών με κάποια συγκεκριμένη μετάλλαξη ή κάποιο ογκογονίδιο ή χρωμοσωμική διαταραχή. Φαίνεται πιθανό ότι πολλές από τις διαταραχές του γονιδιώματος δεν προσδίδουν κάποιο πλεονέκτημα και αποτελούν απλώς «γενετικό θόρυβο» (genetic noise). Τέτοιος θόρυβος θα ήταν ανεκτός σε περιοχές πτωχές σε γονίδια, δεν μπορεί όμως να εξηγήσει την ενίσχυση περιοχών πλούσιων σε γονίδια, που φαίνεται να έχει μεγαλύτερη σχέση με την ογκογένεση (Kresse 2012).

Οι χρωμοσωμικές και γονιδιακές διαταραχές στο ΟΣ περιγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία με δύο αρκετά λογοτεχνικούς ελληνικούς όρους: **χρωμόθρυψη** (θραύση και πολλαπλές αναδιατάξεις χρωμοσωμάτων) και **καταιγίδα** (πολλαπλές μεταλλάξεις) αντίστοιχα.

Ε.1. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο ΟΣ: χρωμόθρυψη

Με τον όρο **«χρωμόθρυψη» (chromothripsis) περιγράφεται** μια καταστροφική γενωμική αστάθεια, όπου εκατοντάδες γενωμικές επαναδιατάξεις οδηγούν σε ανακατασκευή ενός ή περισσοτέρων χρωμοσωμάτων (2013 Kuijjer, 2014 Botter, Chen 2014). Αυτό έχει ως συνέπεια την δημιουργία *εκατοντάδων* **γονιδίων σύντηξης** και επομένως και **πρωτεϊνών σύντηξης**. Η χρωμόθρυψη μπορεί να ερμηνεύσει την αιφνίδια εμφάνιση του ΟΣ καθώς περιγράφεται ως μονήρες συμβάν στη ζωή ενός κυττάρου και όχι ως χρόνια άθροιση γενετικών βλαβών (Kuijjer 2013). Χρωμόθρυψη παρατηρείται στο 2–3% των καρκίνων, ωστόσο στο ΟΣ (και το χόρδωμα) παρατηρείται περίπου στο 25% των περιστατικών, προσβάλλοντας αρκετά χρωμοσώματα (Kresse 2012). Ελάχιστες από τις χρωμοσωμικές διαταραχές που έχουν παρατηρηθεί στο ΟΣ αποτελούν σταθερό εύρημα, και συνήθως είναι μεταβολές στις περιοχές 6p, 8q, 13q και 17p. Συνήθως διαπιστώνονται ποικίλες χρωμοσωμικές διαταραχές, οι οποίες σχετίζονται αιτιολογικά με ΟΣ, ωστόσο δεν χαρακτηρίζουν ειδικούς τύπους ΟΣ. Για το λόγο αυτό δεν υπάρχουν και αξιόπιστοι διαγνωστικοί δείκτες που θα καθορίσουν την επιλογή θεραπευτικού σχήματος.

Ε.2. Γονιδιακές διαταραχές στο ΟΣ: καταιγίδα

Με τον όρο **«καταιγίδα»** (**kataegis**) περιγράφονται πολλαπλές μεταλλάξεις γονιδίων του τύπου SNV (single nucleotide variation) σε σωματικά χρωμοσώματα, οι οποίες παρατηρούνται πολύ συχνά, μέχρι και στο 50% των ΟΣ (Chen 2014, Baker 2015). Το υψηλό ποσοστό των μεταλλάξεων δυσχεραίνει τη διάκριση της αιτιολογικής σειράς με την οποία εμφανίστηκαν (οδηγοί-driver vs επιβάτες-passenger μεταλλάξεις, Chen 2014). Σε ότι αφορά στην χρονολογική σειρά εμφάνισης της καταιγίδας στο φάσμα των γενωμικών διαταραχών του ΟΣ, η καταιγίδα φαίνεται ότι προηγείται της εμφάνισης ανευπλοϊδικών διαταραχών (Chen 2014).

Ε.3. Γενικά επιγενετικά φαινόμενα στο ΟΣ - (μεθυλίωση DNA, ιστονικές τροποποιήσεις, μη κωδικά RNA)

Η εμπλοκή των επιγενετικών φαινομένων στην οστεοσαρκωματογένεση είναι είτε **άμεση** (ενεργοποίηση πρωτοογκογονιδίων ή σίγαση ογκοκατασταλτικών γονιδίων) είτε **έμμεση** (μέσω γονιδιακής αστάθειας).

Τα επιγενετικά φαινόμενα που έχουν μελετηθεί στο οστεοσάρκωμα περιλαμβάνουν τη *5-μεθυλίωση της κυτοσίνης* του DNA, τις *ιστονικές τροποποιήσεις* και τα *microRNA* (υποκατηγορία των *μη κωδικών – non coding – RNA*). Οι συνδυασμοί μεθυλίωσης DNA και ιστονικών τροποποιήσεων περιγράφονται συλλογικά ως **επιγενετικός κώδικας**.

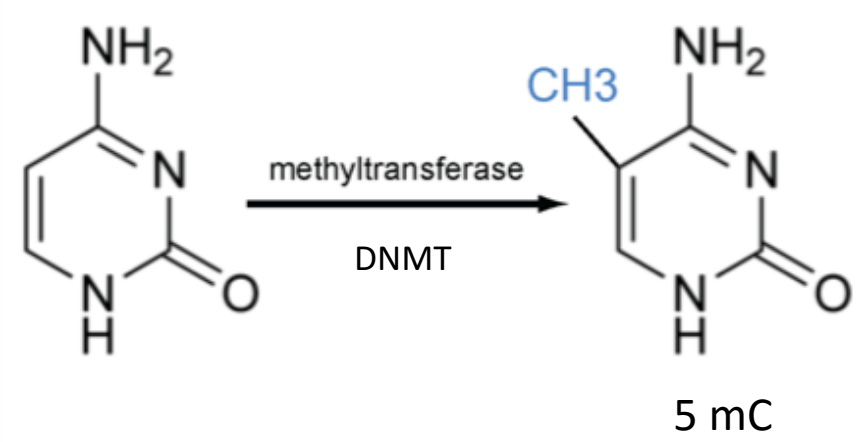
Ε.3.1. Μεθυλίωση του DNA (DNA methylation)

Ως μεθυλίωση του DNA περιγράφεται η ομοιοπολική προσθήκη μιας μεθυλομάδας (CH3) στην θέση 5’ του δακτυλίου κυτοσίνης που αποτελεί μέρος δινουκλεοτιδίου CpG, δηλαδή διαδοχικού ζεύγους κυτοσίνης – γουανίνης (το p συμβολίζει φωσφορικό δεσμό), με συνέπεια το σχηματισμό της 5-μεθυλοκυτοσίνης (5-mC). (εικόνα 8). Οι περιοχές πλούσιες σε δινουκλεοτίδια CpG διακρίνονται σε δύο είδη: **νησίδια** CpG (CpG islands) και **διάσπαρτα** (scattered) CpG.

Τα νησίδια CpG αποτελούν περίπου το 1% του DNA, συναντωνται στο 50% των γονιδίων κατά προτίμηση στην περιοχή των υποκινητών (promoter, transcriptional start site), όπου συνήθως **δεν** είναι μεθυλιωμένα. Η μεθυλίωση της κυτοσίνης στα νησίδια CpG οδηγεί σε αναστολή της μεταγραφής (Jones 2009). Η μεταγραφική αποσιώπηση (silencing) ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω μεθυλίωσης των νησιδίων CpG των υποκινητών αποτελεί σημαντικό σταθμό στην ογκογένεση (Esteller 2007). Η 5-μεθυλοκυτοσίνη αποτελεί περίπου το 1,5% του γονιδιακού DNA στον άνθρώπο (Lister 2009).

Τα διάσπαρτα δινουκλεοτίδια CpG εντοπίζονται στα εξώνια, τα εσώνια και τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία, όπου σε υγιή κύτταρα συνήθως παρουσιάζονται μεθυλιωμένα. Η μεθυλίωση εκτός νησιδίων CpG έχει σχέση με τη σταθερότητα του γονιδιώματος, (Jones 2009) την αποτροπή χρωμοσωμικής αστάθειας, διαμεταθέσεων και διαταραχή γονιδίων

μέσω επανενεργοποιησης «παρασιτικών» αλληλουχιών. Η γενικευμένη υπομεθυλίωση του DNA πιθανώς ευθύνεται για τις ευρείας κλίμακας διαταραχές του DNA που παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα (Esteller 2007).



Εικόνα 8: η μεθυλίωση της κυτοσίνης (http://www.ks.uiuc.edu/Research/methylation/)

Τα ένζυμα που καταλύουν την προσθήκη μεθυλομάδων στο DNA ονομάζονται *DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyltransferases - DNMTs)*. Υπάρχουν τρία είδη μεθυλοτρανσφερασών: DNMT1, DNMT3a και DNMT3b. Η DNMT1 είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση (maintenance) προϋπαρχόντων προτύπων μεθυλίωσης, ενώ οι DNMT3a και 3b ευθύνονται για de novo μεθυλίωση του DNA (Jones 2009).

Οι διαταραχές της μεθυλίωσης του DNA αφορούν τόσο γονιδιακές, όσο και μη γονιδιακές περιοχές:

Διαταραχές μεθυλίωσης γονιδίων: Η επιγενετική - μέσω μεθυλίωσης -απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης εκδηλώνεται ως **υπερέκφραση** (υπομεθυλίωση) ή **υποέκφραση** (υπερμεθυλίωση) γονιδίων.

Μεταβολές στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA και κυρίως η **υπομεθυλίωση**, μπορεί να οδηγήσουν στην **αποσταθεροποίηση** της χρωματίνης, να προάγουν τη γονιδιακή αστάθεια και να απορρυθμίσουν έτσι την γονιδιακή έκφραση (Sadikovic 2008, Basu-Roy

2013). Η **υπο**μεθυλίωση αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό στην πλειοψηφία των γονιδίων που παρουσίασαν αστάθεια, ενίσχυση και υπερέκφραση. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια εντοπίζονται σε περιοχές που παρουσιάζονται ενισχυμένες (amplified) στο ΟΣ, όπως τα χρωμοσώματα 6p, 8q, 9p και 17p, και έχουν παρατηρηθεί σε όγκους και κυτταρικές σειρές ΟΣ. Αυτά τα δεδομένα συνδέουν την **υπομεθυλίωση του DNA** με περιοχές **γονιδιακής αστάθειας και ανισορροπίας** (genomic instability, genomic imbalance), κάτι που έχει αναφερθεί και σε άλλους κ αρκίνους (Sadikovic 2008). Μεταξύ των γονιδίων που παρουσιάζουν **υπερέκφραση** λόγω **υπομεθυλίωσης** είναι το ογκογονίδιο ***c-MYC*.**

Διαταραχές μεθυλίωσης επαναλαμβανόμενων στοιχείων: Εκτός από τις μεταβολές της μεθυλίωσης (υπερ-υπο) γονιδίων, μεταβολές στη μεθυλίωση παρατηρούνται και σε μεγάλες περιοχές του DNA, οι οποίες σχετίζονται με **επαναλαμβανόμενα στοιχεία** (genomic repeats, Sadikovic 2008). Η υπομεθυλίωση σχετίζεται ισχυρά με ενίσχυση του γονιδιώματος (gain), ενώ η ενίσχυση του γονιδιώματος σχετίζεται με υπερέκφραση. Σε περιοχές ενίσχυσης του γονιδιώματος οι επιγενετικές τροποποιήσεις (υπερ-υπομεθυλίωση) αποτελούν ρυθμιστή της γονιδιακής έκφρασης, ενώ σε περιοχές απώλειας γονιδιώματος παρατηρείται μειωμένη γονιδιακή έκφραση. Κατά την εξέλιξη ενός όγκου, η υπομεθυλίωση και η ενίσχυση του γονιδιώματος μπορεί να συνεργάζονται για να αυξήσουν την γονιδιακή έκφραση. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις και η μεταβολή του αριθμού των αντιγράφων ενός γονιδίου έχουν *αθροιστικό* ρόλο στην απορρύθμιση ομάδων γονιδίων (gene networks) που εμπλέκονται στην ογκογένεση του ΟΣ (Sadikovic 2008).

Ε.3.2. Ιστονικές τροποποιήσεις – κώδικας ιστονών

Οι ιστόνες είναι πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν βασικό παράγοντα οργάνωσης της χρωματίνης στα ευκαρυωτικά κύτταρα και μπορούν να υποστούν μετα-μεταφραστικές (posttranslational) τροποποιήσεις, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την αλληλεπιδρασή τους με το DNA (επιτρέποντας ή αποκλείοντας τη μεταγραφή του) καθώς και με άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες.

Οι ιστόνες Η3 και Η4 έχουν μακρές ουρές που προέχουν από το νουκλεόσωμα και μπορούν να τροποποιηθούν ομοιοπολικά σε διάφορα σημεία. Οι τροποποιήσεις αυτές είναι

διάφορες και περιλαμβάνουν μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, ουμπικουιτίνωση, sumoylation, citrullination, και ADP-ribosylation. Οι τροποποιήσεις πραγματοποιούνται στο αμινοτελικό άκρο της ουράς και οδηγούν σε ανακατασκευή της δομής του νουκλεοσώματος σε μια πιο ανοικτή ή κλειστή διαμόρφωση, περισσότερο ή λιγότερο προσβάσιμη σε μεταγραφικά σύμπλοκα. Τροποποιήσεις μπορεί να υποστεί και η ιστόνη H2A.

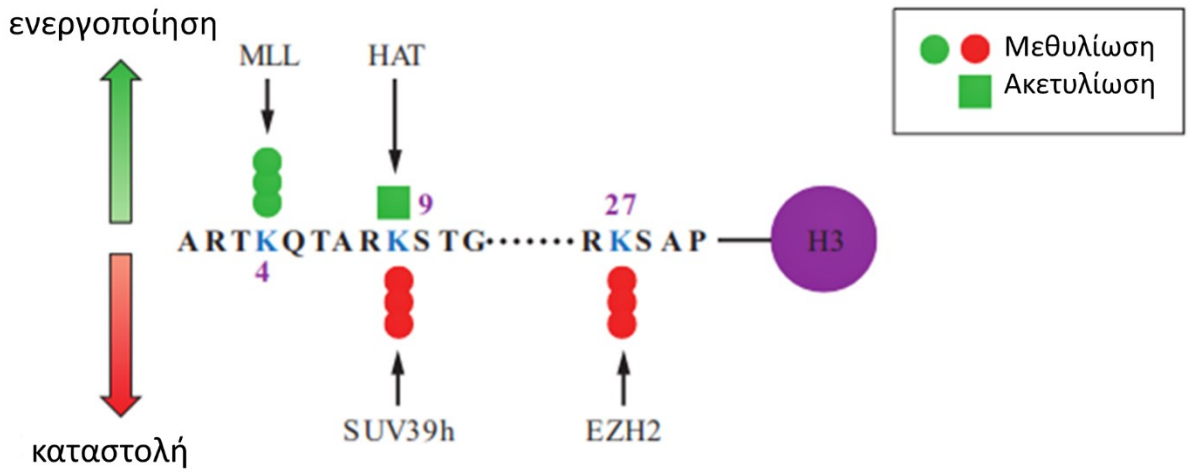
Στην κλινική πράξη μεγαλύτερη σημασία έχει η ακετυλίωση – αποακετυλίωση (Histone Acetylation/Deacetylation) και η μεθυλίωση (methylation) των ιστονών, οι οποίες αποτελούν πιθανό θεραπευτικό στόχο.

Ακετυλίωση – αποακετυλίωση των ιστονών: Η **ακετυλίωση** των ιστονών πραγματοποιείται με την προσθήκη μια ακετυλομάδας (COCH3) από το ακετυλοσυνένζυμο Α. Η ακετυλίωση των καταλοίπων (residues) λυσίνης αδρανοποιεί το θετικό τους φορτίο, μειώνοντας έτσι την έλξη των ιστονών για το DNA. Αυτό οδηγεί σε αποσυσπείρωση της χρωματίνης και ευχέρεια πρόσβασης μεταγραφικών παραγόντων στο DNA (Siddiqi 2010). Η ακετυλίωση των ιστονών είναι στενά συνδεδεμένη με τη ρύθμιση πολλών κυτταρικών διεργασιών, όπως: μεταβολές της χρωματίνης, μεταγραφή, σίγαση γονιδίων, πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, απόπτωση, διαφοροποίηση, αντιγραφή του DNA, επιδιόρθωση του DNA, μεταφορά ουσιών στον πυρήνα (nuclear import), νευρωνική καταστολή. Τα ένζυμα που ακετυλιώνουν τις ιστόνες ονομάζονται *ιστονικές ακετυλοτρανσφεράσες (histone acetyltransferases - HATs)* και παίζουν βασικό ρόλο στον έλεγχο της ακετυλίωσης των ιστονών H3 και H4. (Kuo 1998). Η ακετυλίωση των H3 και H4 σε καίρια αμινοξέα σχετίζεται με ενεργό χρωματίνη σε περιοχές του DNA που περιέχει υποκινητές γονιδίων, ενώ η απουσία ακετυλίωσης σχετίζεται με καταστολή και σίγαση γονιδίων (Siddiqi 2010).

Η αντίθετη αντίδραση (**αποακετυλίωση**) καταλύεται από τις *ιστονικές αποακετυλάσες (Histone Deacetylases, HDACs).* Οι HDACs αποακετυλιώνουν τα κατάλοιπα λυσίνης από τις πολυπεπτιδικές ουρές των ιστονών, οδηγώντας σε συσπείρωση της χρωματίνης (κλειστή χρωματίνη), με συνέπεια μεταγραφική καταστολή (Siddiqi 2010).

Η ισορροπία μεταξύ HAC και HDAC καθορίζει την κατάσταση συσπείρωσης της χρωματίνης, την προσβασιμότητα μεταγραφικών παραγόντων στο DNA και τελικά την ισορροπία της γονιδιακής έκφρασης. Η διαταραχή της ισορροπίας ακετυλίωσης των ιστονών έχει συσχετισθεί με ογκογένεση και εξέλιξη του καρκίνου.

Μεθυλίωση των ιστονών: Η μεθυλίωση αποτελεί μια άλλη μετα-μεταφραστική τροποποίηση των ιστονών. Διάφοροι βαθμοί μεθυλίωσης ειδικών λυσινών των ιστονών σχετίζονται με *ενεργοποίηση* ή *καταστολή* της μεταγραφής. Ως μεθυλίωση των ιστονών περιγράφεται η μεταφορά μιας, δυο ή τριών μεθυλομάδων από την S-αδενοσυλο-L-μεθειονίνη σε κατάλοιπα λυσίνης ή αργινίνης των ιστονών. Τα ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά αυτή ονομάζονται *ιστονικές μεθυλοτρανσφεράσες (HMTs).* Οι HMTs ρυθμίζουν την μεταγραφική καταστολή ή ενεργοποίηση του DNA μέσω ελέγχου της δομής της χρωματίνης (Greer 2012).



Εικόνα 9: Τροποποιήσεις της ιστόνης H3, μεθυλίωση και ακετυλίωση, οι οποίες αποτελούν πιθανό θεραπευτικό στόχο. Αυτές οι τροποποιήσεις, ιδιαίτερα η τριμεθυλίωση της λυσίνης 4 (K4me3) και η ακετυλίωση της λυσίνης 9 (K9ac) εντοπίζονται πολύ συχνά κοντά στα σημεία έναρξης της μεταγραφής γονιδίων και σχετίζονται με ενεργό μεταγραφή (activation). Αντίθετα η μεθυλίωση της λυσίνης 9 (K9me3) ή της λυσίνης 27 (K27me3) σχετίζονται με γονιδιακή καταστολή (repression). Η ισορροπία μεταξύ των τροποποιήσεων αυτών καθορίζουν τη μεταγραφική δράστηριότητα ενός γονιδίου. MLL, histone 3 lysine 4 trimethyltransferase; HAT, histone acetyltransferase; SUV39h, histone 3 lysine 9 trimethyltransferase; EZH2, histone 3 lysine 27 trimethyltransferase. (DeVita 2011, Primer of the Molecular Biology of Cancer).

Οι μεθυλιωμένες ιστόνες απαντώνται ως μονο-, δι- και τριμεθυλιωμένες. Η μονο-μεθυλίωση συνήθως σχετίζεται με ανοικτή χρωματίνη και μεταγραφική ενεργοποίηση, ενώ η τριμεθυλίωση σχετίζεται με συμπυκνωμένη χρωματίνη και μεταγραφική καταστολή. Η αύξηση της μεθυλίωσης πιστεύεται ότι προάγει τη συγγένεια της ιστόνης προς ανιόντα όπως είναι το DNA, με συνέπεια την μεταγραφική καταστολή (Siddiqi 2010).

Στην εικόνα 9 απεικονίζονται τροποποιήσεις της ιστόνης H3, καθώς και η επίδρασή τους στην μεταγραφή.

Το σύνολο των επιγενετικών τροποποιήσεων των ιστονών αποτελεί τον **κώδικα ιστονών**, η αποκρυπτογράφηση του οποίου θα μπορούσε να συμβάλλει στην κατανόηση της επιγενετικής ρύθμισης γονιδίων και την ανάπτυξη στοχευμένων φαρμάκων. Η αναστολή των HDACs έχει σημαντική επίδραση στην απόπτωση, παύση του κυτταρικού κύκλου και διαφοροποίηση σε καρκινικά κύτταρα. Οι **αναστολείς των HDACs** (HDAC inhibitors, HDACi) χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Dokmanovic 2007).

Ε.3.3. microRNA (miRNA):

Ο σχηματισμός και ο μηχανισμός επιγενετικής δράσης των micro-RNA θα αναφερθούν στο κεφάλαιο των miRNA (σελ 41).

ΣΤ. Επιγενετικές τροποποιήσεις σε Γονίδια και Σηματοδοτικές Οδούς που συμβάλλουν στην ογκογένεση του ΟΣ

Αν και τα ΟΣ έχουν ευρύ φάσμα γενετικών και μοριακών διαταραχών, οι περισσότερες διαταραχές δεν μπορούν να διαπιστωθούν σταθερά στη μεγάλη πλειοψηφία των οστεοσαρκωμάτων. Ο καθορισμός των γενετικών και επιγενετικών διαταραχών στα οστεοσαρκώματα δυσχεραίνεται αφενός από την μεγάλη ποικιλία τους, αφετέρου από την σπανιότητα των δειγμάτων οστεοσαρκώματος (Tang 2008). Ωστόσο, το γεγονός ότι το ΟΣ

είναι πολύ πιο συχνό στα σκυλιά, και το ότι υπάρχει ευχέρεια καλλιέργειας γενετικά ομοιογενών απογόνων, μπορεί να προσφέρει στην έρευνα αξιόπιστο υλικό για μοριακή μελέτη του ΟΣ (Scott 2011).

Η κατανόηση των μοριακών διαταραχών του ΟΣ μπορεί να ερμηνεύσει την ποικιλία των κλινικών εκδηλώσεων του ΟΣ, όπως οι λυτικοί ή βλαστικοί φαινότυποι, η επιθετικότητα ή η τάση του ΟΣ να οστεοποιείται αντί να συρρικνώνεται μετά από θεραπεία, ενώ αποτελεί τη βάση τόσο για τη διάγνωση, όσο και για την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπειών (Mortus 2014, Poos 2014).

Αν και απαιτείται άθροιση πολλών γενετικών διαταραχών, φαίνεται ότι *το ΟΣ οφείλεται κυρίως στην απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων, παρά στην ενεργοποίηση ογκογονιδίων* (Chou 2006, Chen 2014), με προεξέχουσα την απώλεια των γονιδίων ***Rb*** και ***p53***, τα οποία αποτελούν τον φύλακα άγγελο της ακεραιότητας του DNA. Εξάλλου είναι γνωστή η ισχυρή συσχέτιση της συγγενούς έλλειψης *p53* (σύνδρομο Li-Fraumeni) και της ανάπτυξης ΟΣ (Basu-Roy 2013, Baker 2015).

ΣΤ.1. p53

Το γονίδιο *p53* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17p13.1 και αποτελεί ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Έχει σχέση με την απόπτωση, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και την επιδιόρθωση του DNA. Είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στους ανθρώπινους καρκίνους.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, όταν παρουσιαστεί βλάβη του DNA, η πρωτεΐνη p53 αυξάνει την έκφραση του WAF/CIP με συνέπεια την αύξηση της πρωτεΐνης p21 (ή αλλιώς CDKN1A, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A). Η p21 συνδέεται με τις G1-S/CDK και S/CDK και αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο. Εάν η βλάβη δεν μπορεί να επιδιορθωθεί, η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιεί την απόπτωση (Rao-Bindal 2011, Sadikovic 2010).

Το *p53* έχει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση του ΟΣ, καθώς διαταραχές της σηματοδοτικής του οδού παρατηρούνται σχεδόν σε όλα τα οστεοσαρκώματα (Weiss 2014).

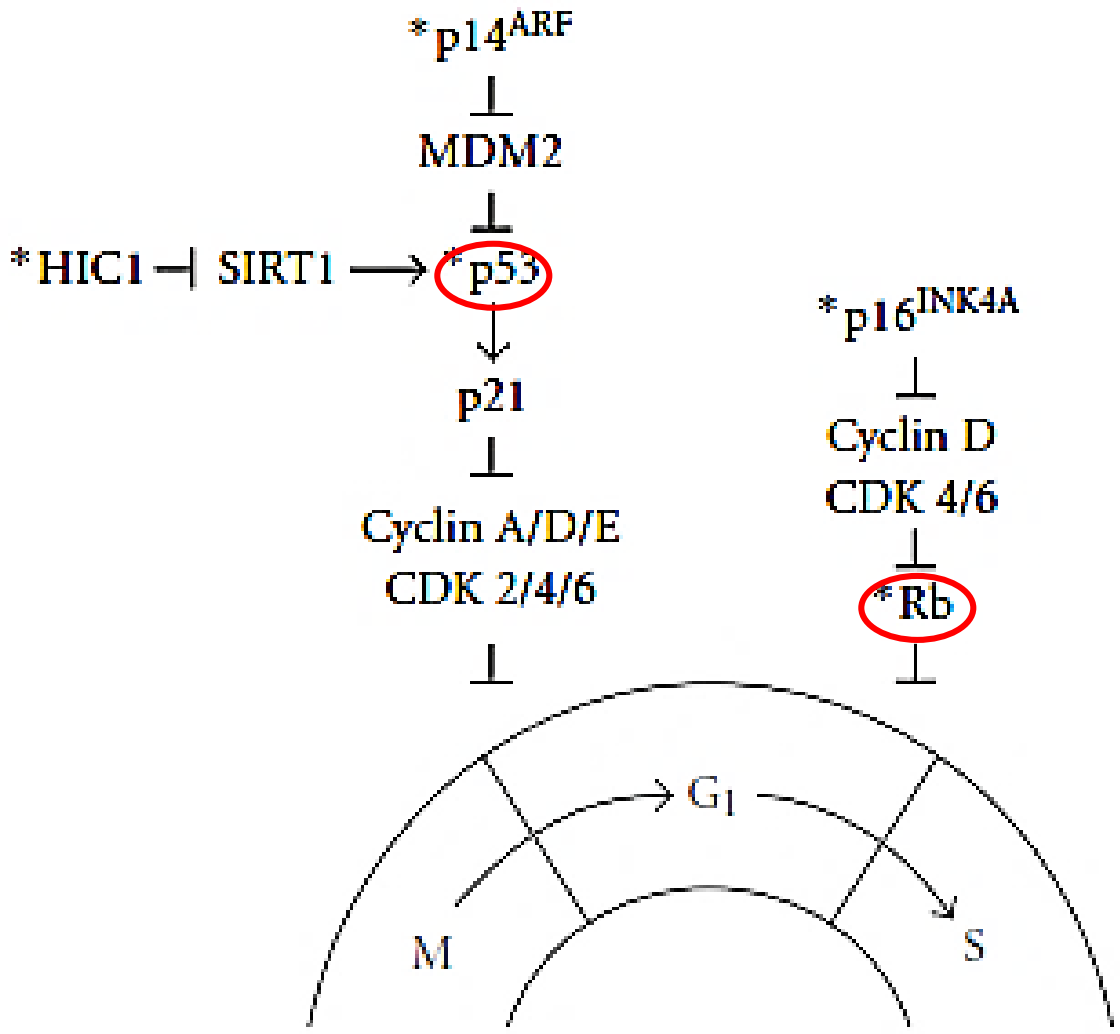
Η συχνότητα των διαταραχών του ποικίλλει από εστιακές μεταλλάξεις (κυρίως μη συνώνυμες-missense, 30%), απώλεια αλληλόμορφου (80%), διαμεταθέσεις γονιδίου (10%–20%), ενώ σπάνια (3%) παρατηρείται σε σποραδικό ΟΣ μετάλλαξή του p53 στα γεννητικά (germline) κύτταρα (Rao-Bindal 2011).

Στο ΟΣ παρατηρείται μειωμένη έκφραση του p53, που οδηγεί σε υποέκφραση του γονιδίου CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, κωδικοποιεί την p21) με συνέπεια την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου πέραν του σημείου ελέγχου G1/S (Sadikovic 2010) παρά την ύπαρξη διαταραχών του DNA, με συνέπεια τη διαιώνισή τους στα θυγατρικά κύτταρα (εικόνα 10).

Αν και στη βιβλιογραφία αναφέρεται επιγενετική αποσιώπηση του *p53* στο πειραματικές σειρές κακοήθων κυττάρων (μέσω κατασταλτικών ιστονικών τροποποιήσεων στην περιοχή του υποκινητή και όχι μέσω μεθυλίωσης CpG, Soto-Reyes 2010), ωστόσο στο ΟΣ η επιγενετική διαταραχή της λειτουργίας του *p53* φαίνεται ότι επιτελείται έμμεσα, μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων γονιδίων που επηρεάζουν αναρροϊκά (upstream) τη δράση του.

Οι μεταλλάξεις του *p53* δεν σχετίζονται αποδεδειγμένα με το στάδιο της νόσου ή την πιθανότητα μεταστάσεων (Tang 2008), ωστόσο φαίνεται ότι σχετίζονται με μειωμένη επιβίωση (Li 2014).

Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι ότι το *p53* ρυθμίζει την μεθυλίωση υποκινητών άλλων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το *RASSF1A*. Σε καρκινικά κύτταρα με φυσιολογικό (wild) τύπο *p53* παρατηρήθηκε η δημιουργία ενός μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης *P53-RASSF1A-MDM2*. Λόγω αυτού του μηχανισμού προκαλείται υπερμεθυλίωση του *RASSF1A*, υπερέκφραση του *MDM2* και αναστολή του *p53* με συνέπεια την προαγωγή της ογκογένεσης και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με φυσιολογικό τύπο *p53*. Σε κύτταρα οστεοσαρκώματος με φυσιολογικό τύπο *p53*, η πρωτεΐνη *RASSF6* (μέλος της οικογένειας *RASSF*) παίζει σταθεροποιητικό ρόλο για το *p53* και τη ρύθμιση της απόπτωσης (Li 2014).



Εικόνα 10: Επιγενετικά φαινόμενα που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο στο οστεοσάρκωμα: Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *p53* και του *Rb* αν και συχνή σε άλλους καρκίνους, μάλλον **δεν** παίζει σημαντικό ρόλο στο ΟΣ. Τα *p53* και *Rb* επηρεάζονται από τις επιγενετικές τροποποιήσεις αναρροϊκών γονιδίων όπως τα *p16INK4A*, *p14ARF* και *HIC1*. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η παράκαμψη του σημείου ελέγχου G1/S, η απορρύθμιση του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και η προαγωγή της ογκογένεσης (Rao-Bindal 2011).

ΣΤ.2. HIC1

Το γονίδιο *HIC1* (Hypermethylated in Cancer 1) αποτελεί ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο ρυθμίζει την εξαρτώμενη από το p53 απάντηση σε βλάβη του DNA (απόπτωση, αναστολή κυτταρικού κύκλου, εικόνα 10). Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *HIC1* έχει διαπιστωθεί σε διάφορους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου του ΟΣ, όπου παρατηρήθηκε

σε συχνότητα μέχρι και 17% (Rao-Bindal 2011). Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης του *HIC1*, υπερέκφραση της αποακετυλάσης SIRT1, και τελικά σε καταστολή έκφρασης του *p53*. Η αδρανοποίηση του *p53* οδηγεί σε παράκαμψη της απόπτωσης, με συνέπεια την επιβίωση του κυττάρου παρά τη βλάβη του DNA, με συνέπεια την προαγωγή της ογκογένεσης (Li 2014).

Η απώλεια της πρωτεΐνης HIC1 λόγω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *HIC1*, σχετίζεται με ανάπτυξη ΟΣ (Rao-Bindal 2011, Li 2014). Επιπλέον, το *HIC1* ρυθμίζει τη μεταγραφή του υποδοχέα της χημειοκίνης CXCR7, η οποία προάγει την ογκογένεση (Li 2014).

ΣΤ.3. P21

Το *p21* αποτελεί γονίδιο στόχο του *p53*. Το p21 αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1/S μέσω αναστολής του συμπλόκου cyclin-CDK (εικόνα 10). Η μειωμένη έκφραση του *p21* σε πολλούς καρκίνους σχετίζεται με υποακετυλίωση των ιστονών. Η μεθυλίωση της αργινίνης των ιστονών από την *μεθυλοτρανσφεράσης της αργινίνης* (protein arginine methyltransferase 6, PRMT6) αναστέλλει άμεσα την έκφραση του *p21* σε κύτταρα ΟΣ. Η αγωγή με decitabine οδηγεί σε αύξηση της πρωτεΐνης p21, κάτι που σημαίνει ότι το *p21* ελέγχεται από πολλαπλούς επιγενετικούς μηχανισμούς (Li 2014).

ΣΤ.4. GADD45

Το *GADD45* (Growth Arrest and DNA Damage) αποτελεί γονίδιο που αναστέλλει την αύξηση και επάγεται από την βλάβη του DNA. Κωδικοποιεί μια σημαντική πρωτεΐνη, η οποία δρα καταρροϊκά (downstream) του *p53* και έχει βασικό ρόλο στην απόπτωση. Η υπερέκφραση του *GADD45* οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στο σημείο G2-M (Li 2014). Η πρωτεΐνη GADD45, καταστέλλεται συνεργιστικά από τα *Myc* και *PI3K/Akt* μέσω επιγενετικών μηχανισμών. Σε κύτταρα ΟΣ έχει βρεθεί μεθυλίωση του πρώτου εσωνίου του *GADD45*. Το κατασταλμένο *GADD45* μπορεί να είναι υπεύθυνο για την ανώμαλη μεθυλίωση ογκοκατασταλτικών γονιδίων στο οστεοσάρκωμα. Η αγωγή με απομεθυλιωτικό παράγοντα οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του *GADD45* και επαγωγή απόπτωσης σε κύτταρα ΟΣ. Εκτός

αυτού, το ίδιο το *GADD45* μπορεί να προκαλέσει ενεργό απομεθυλίωση του DNA μετά από διάφορα ερεθίσματα διαφοροποίησης, όπως είναι η οστεογένεση (Li 2014).

ΣΤ.5. Rb

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *Rb* (Ρετινοβλάστωμα) αδρανοποιείται σε διάφορους καρκίνους. Ελέγχει τη μετάβαση της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου στη φάση S (σημείο ελέγχου G1/S). Η απώλεια της εκφρασής της σχετίζεται με το ΟΣ (Sadikovic 2010). Η παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 περιλαμβάνει αναστολή της cyclin D/cdk4 και cyclin D/cdk6 από το *p16 INK4A*., οι οποίες φυσιολογικά φωσφορυλιώνουν το *Rb* (εικόνα 10). Για το λόγο αυτό, μεταβολές στο *Rb*, *cyclin D, cdk4/6,* ή *p16INK4A* μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια του σημείου ελέγχου G1/S, με συνέπεια την άθροιση γενετικών βλαβών και συμβολή στην ογκογένεση (Rao-Bindal 2011).

Διαταραχές του *Rb* παρουσιάζει το 70% των πρωτογενών ανθρώπινων ΟΣ, ενώ άτομα ετερόζυγα που έχουν κληρονομική απώλεια ενός αλληλόμορφου *Rb* έχουν 1000-πλάσια πιθανότητα να αναπτύξουν ΟΣ σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Οι περισσότερες διαταραχές αφορούν απαλοιφές, μεταλλάξεις και δομικές ανακατατάξεις (Rao-Bindal 2011). Η αδρανοποίηση του *Rb* (απώλεια ελέγχου φάσης G1/S) επιτυγχάνεται: **1**. Μέσω απώλειας ετεροζυγωτίας (συνήθως, 60-70%, κακός προγνωστικός παράγοντας), είτε σπανιότερα λόγω δομικής αναδιάταξης (30%) ή σημειακής μετάλλαξης (10%), **2**. Μέσω ενίσχυσης του γονιδίου *CDK4* ή της κυκλίνης D1 (η CDK4 δημιουργεί σύμπλοκο με την κυκλίνη D1 και φωσφορυλιώνει την Rb). **3**. Μέσω αδρανοποίησης *p16Ink4a* => αύξηση CDK4 => φωσφορυλίωση Rb => αποδέσμευση E2F => μεταγραφή, η φάση G1 του κυτταρικού κύκλου προχωρά στη φάση S (Tang 2008).

Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *Rb*, αν και συχνή σε άλλους καρκίνους, μάλλον δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του ΟΣ (Rao-Bindal 2011).

Η πρωτεΐνη Rb αυξάνει την μεταγραφική δραστηριότητα του *RUNX2*, αυξάνοντας την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Η απώλεια του pRb αναστέλλει την τελική οστεοβλαστική διαφοροποίηση in vitro. Το *Rb* είναι επίσης πιθανό να επηρεάζει την διαφοροποίηση των

οστεοβλαστών μέσω άλλων μηχανισμών που περιλαμβάνουν τη δομή της χρωματίνης (Tang 2008).

Η κατάσταση μεταλλάξεων του *Rb* και του *TP53* θα μπορούσε να είναι χρήσιμος **προβλεπτικός δείκτης** για την αντίσταση του ΟΣ στη χημειοθεραπεία (Tang 2008).

ΣΤ.6. DOCK5 - TNFRSF10A

Το γονίδιο *DOCK5* (Dedicator of cytokinesis 5) εμπλέκεται στην οστεογενετική διαφοροποίηση. Η απώλειά του σχετίζεται με το ΟΣ. Το *DOCK5* εντοπίζεται στην περιοχή, 8p21.2-p21.3, η οποία στο ΟΣ σχετίζεται με απώλεια αντιγράφου (copy number loss), μαζί με το γονίδιο *TNFRSF10A* (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 10a), το οποίο επίσης παρουσιάζει μειωμένη έκφραση στο ΟΣ. Ο TNFRSF10A είναι ένας υποδοχέας που ενεργοποιείται από τον TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand TNFSF10A) και εμπλέκεται στη μεταγωγή του σήματος κυτταρικού θανάτου και την επαγωγή απόπτωσης ανεξάρτητα από τη σηματοδότηση *p53* (Sadikovic 2010).

ΣΤ.7. Γονιδιακός τόπος 3q13.31 - LSAMP

Μια σημαντική περιοχή απώλειας αντιγράφου έχει διαπιστωθεί στη θέση 3q13.31. Αυτή η περιοχή απώλειας αντιγράφου σχετίζεται με απώλεια έκφρασης και υπερμεθυλίωση του γονιδίου *LSAMP* (limbic system-associated membrane protein), το οποίο πιθανώς έχει δράση ογκοκατασταλτικού γονιδίου στο ΟΣ (Kresse 2009).

ΣΤ.8. RUNX2

Ο RUNX2 (Runt-related transcription factor 2, γνωστός και ως core-binding factor subunit alpha-1 - CBF-alpha-1, εικόνα 5 και 6) αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς ρυθμιστές της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη

του ΟΣ. Είναι μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων Runx και αποτελείται από τους RUNX1, RUNX2 και RUNX3, τα οποία έχουν σχέση με την ανάπτυξη διαφόρων ιστών.

Η έκφραση του *RUNX2* ελέγχει τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών αρχέγονων κυττάρων σε άωρους και ώριμους οστεοβλάστες, ενώ το ίδιο ελέγχεται από διάφορες σηματοδοτικές οδούς, όπως η BMP (bone morphogenic protein), Wnt/β-catenin, FGF (fibroblast growth factor), και PKC (protein kinase C) (Mortus 2014).

Η έκφραση του RUNX2 μειώνεται κατά την ωρίμανση των αναπτυσσομένων οστεοβλαστών (εικόνα 2) (Tang 2008). Τα επίπεδα και η λειτουργία του RUNX2 σχετίζονται με αυξημένη μετάβαση G1/S σε οστεοβλάστες. Ο RUNX2 υπερφωσφορυλιώνεται από την CDK1/cyclin B κατά τη διάρκεια της μίτωσης, ενώ υποφωσφορυλιώνεται από την PP1/PP2A μετά την μίτωση, και ασκεί μεταμιτωτική ρύθμιση σε γονίδια στόχους της RUNX2 (Tang 2008). Η κατασταλτική δράση που ασκείται από τον RUNX2 και την ιστονική αποακετυλάση 3 (**HDAC3**) οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της **οστικής σιαλοπρωτεΐνης** (γλυκοπρωτεΐνη της οστικής θεμέλιας ουσίας, της οποίας η έκφραση συμπίπτει με την τελική οστεοβλαστική διαφοροποίηση και την εμφάνιση της εφαλάτωσης) στα διαφοροποιούμενα οστεοβλαστικά κύτταρα (Tang 2008).

Η υπερέκφραση του RUNX2 συνεπάγεται υψηλότερο ρυθμό οστικού μεταβολισμού(Sadikovic 2010).

Οι RUNX1 και RUNX2 σχετίζονται με την ογκογένεση. Προκαλούν υπερέκφραση της LGALS3 (galectin-3), μιας πρωτεΐνης που καταστέλλει την **ανοικία** και την φαρμακευτικά επαγόμενη **απόπτωση**, και η έκφραση της οποίας σχετίζεται με την ανάπτυξη **μεταστάσεων** στο ΟΣ (Sadikovic 2010).

Στο ΟΣ η υπερέκφραση του γονιδίου *RUNX2* (λόγω γονιδιακής ενίσχυσης στην περιοχή 6p21.1) σχετίζεται με **πτωχή ανταπόκριση** του ΟΣ στη **χημειοθεραπεία** (Sadikovic 2010). Επίσης το *Runx2* επάγει το *p27KIP1*, το οποίο αναστέλλει την CDK2 και οδηγεί σε έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο, κάτι που είναι απαραίτητο για την φυσιολογική οστική ανάπτυξη. Η λειτουργία του χάνεται σε αποδιαφοροποιημένο ΟΣ (Sadikovic 2010).

Μια πιο πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι η μέσω RUNX2 ενεργοποίηση του γονιδίου *Bax* αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων του οστεοσαρκώματος στην **απόπτωση**, κάτι που δείχνει ότι ο RUNX2 δρα ως αποπτωτικός (pro-apoptotic) παράγοντας στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος (Tang 2008).

ΣΤ.9. SPP1 (IBSP, OPN)

Το γονίδιο *SPP1*, μέσω της αντίστοιχης πρωτεΐνης (secreted phosphoprotein 1, bone sialoprotein I [BSP-1 ή BNSP ή IBSP], οστεοποντίνη, osteopontin), αποτελεί - όπως και το *RUNX2* - μέλος της οικογένειας γονιδίων που συμμετέχουν στη σηματοδότηση της BMP. Αποτελεί δείκτη τελικής διαφοροποίησης του οστίτη ιστού.

Σε φυσιολογικούς οστεοβλάστες η RUNX2 και η HDAC3 καταστέλλουν την IBSP, ωστόσο σε κύτταρα ΟΣ παρατηρείται υπερέκφραση της SPP1 (OPN, IBSP), πράγμα που σημαίνει κάποια διαταραχή στην τελική διαφοροποίηση της οστεογενετικής σειράς. Η αδρανοποίηση του mRNA της SPP1 οδηγεί σε αναστολή της ογκογένεσης σε ποντίκια (Sadikovic 2010).

ΣΤ.10. RECQL4

Η πρωτεΐνη του γονιδίου *RECQL4* (ATP-dependent DNA helicase Q4) εμπλέκεται στην επιδιόρθωση DSB (double stranded break) του DNA και υπερεκφράζεται στο ΟΣ. Η απορρύθμιση της έκφρασής του σχετίζεται ισχυρά με τη γονιδιακή αστάθεια που παρατηρείται στο ΟΣ και επομένως σχετίζεται με την ογκογένεση στο ΟΣ (Sadikovic 2010).

ΣΤ.11. Το γονίδιο INK4a: p16INK4a - p14ARF

Το γονίδιο *INK4a* (ή *CDKN2A*) εντοπίζεται στην γονιδιακή περιοχή 9p21 (Tang 2008) και κωδικοποιεί:

Την **πρωτεΐνη p16INK4a**, η οποία μέσω καταστολής της CDK4 οδηγεί σε παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Η απαλοιφή του INK4A οδηγεί σε πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 10).

Την **πρωτεΐνη p14ARF** (alternate reading frame protein product of the CDKN2A locus, μέσω bicistronic transcription και alternative reading frame), η οποία συνδέεται με την MDM2 πρωτεΐνη (Mouse double minute 2 homolog, , μετακινεί το p53 στο κυτταρόπλασμα, όπου το p53 αποδομείται μέσω ουμπικουιτίνωσης) και ρυθμίζει την δράση του *TP53* (αρνητικός ρυθμιστής του p53). Η p14ARF δεσμεύει την MDM2 με συνέπεια την παραμονή του p53 στον πυρήνα, όπου αυξάνει την έκφραση του *p21*. Η πρωτεΐνη p21 συνδέεται με και αδρανοποιεί τα σύμπλοκα cyclin/CDK, με συνέπεια την παύση του κύκλου στη φάση G1) (Rao-Bindal 2011).

Στο ΟΣ διαπιστώθηκε υπερμεθυλίωση CpG του υποκινητή του *p16INK4a* και του *p14ARF*, το οποίο είναι σημαντικό για τη διατήρηση της σταθερότητας του *p53* (Li 2014). Σε αδρανοποίηση/απαλοιφή του *INK4A* δεν παράγεται *p14ARF*, με συνέπεια την αποδέσμευση MDM2, έξοδο του p53 από τον πυρήνα και αποδόμησή του*, προσπέραση του* του σημείου ελέγχου G1/S, πρόοδος του κυτταρικού κύκλου και προαγωγή της ογκογένεσης). Τόσο η MDM2 όσο και η CDK4 βρίσκονται στην περιοχή 12q13. Ενίσχυση αυτής της περιοχής ισοδυναμεί με απαλοιφή του *INK4A* (Rao-Bindal 2011, Li 2014). Η χορήγηση απομεθυλιωτικού παράγοντα αποκατέστησε τη λειτουργία του *p16INK4a* και του *p14ARF*, ενώ 48 ώρες μετά τη διακοπή του παράγοντα η υπερμεθυλίωση επανεμφανίστηκε (Li 2014).

Επίσης έχει διαπιστωθεί υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *CREG1* (Cellular Repressor of E1A-stimulated Genes 1), το οποίο δρα αυξάνοντας την επαγόμενη από το p16INK4a κυτταρική γήρανση (Li 2014).

Σε μελέτη ΟΣ με αρνητικό *p16INK4A* διαπιστώθηκε μερική ή ολική μεθυλίωση του υποκινητή του *p16INK4A* σε περίπου 50% των δειγμάτων, κάτι που καταδεικνύει την πιθανή συμβολή του στην οστεοσαρκωματογένεση (Rao-Bindal 2011).

Η μεθυλίωση του υποκινητή του *INK4A* δεν σχετίζεται με το φύλο, εντόπιση, μέγεθος όγκου, στάδιο, ιστολογικό τύπο ή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Η παθολογική

μεθυλίωση του υποκινητή του *p14ARF* σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση στο παιδικό ΟΣ και πιθανώς με μεγαλύτερη συχνότητα μεταστάσεων (Tang 2008, Rao-Bindal 2011, Li 2014).

Ωστόσο άλλες μελέτες αναφέρουν ως αίτιο αποσιώπησης του *INK4A* στο ΟΣ την απαλοιφή ή επαναδιάταξή του, όχι όμως μετάλλαξη ή **μεθυλίωσή** του. Απουσία έκφρασης του *p16INK4a* σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση σε παιδιά με ΟΣ (Tang 2008).

ΣΤ.12. RASSF1A

Το γονίδιο *RASSF1A* (Ras association domain family 1A) είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εμπλέκεται στην παύση του κυτταρικού κύκλου, στη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων και την απόπτωση που επάγεται από τον υποδοχέα θανάτου (death receptor). Εμπλέκεται στη διαφοροποίηση μέσω ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Mst1/2 της σηματοδοτικής οδού HIPPO (Bin Zhao 2010).

Στο ΟΣ, όπως και το σάρκωμα Ewing και άλλους καρκίνους παρουσιάζει συχνά αποσιώπηση λόγω *μεθυλίωσης* του υποκινητή του (Rao-Bindal 2011) ενώ παρατηρήθηκε και αδρανοποίηση με *αποακετυλίωση ιστονών*. Η χορήγηση decitabine σε ΟΣ οδήγησε σε υπερέκφραση του RASSF1A (Li 2014). Τα RASSF2 και RASSF10 παρουσιάζουν επίσης συχνά μεθυλίωση του υποκινητή στο οστεοσάρκωμα (Gharanei 2013).

ΣΤ.13. H3K27me

Κατά την απόπτωση παρατηρούνται διάφορες ιστονικές τροποποιήσεις, οι οποίες προάγουν την απόπτωση και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως αποπτωτικοί ιστονικοί δείκτες (apoptotic histone marks).

Η H3K27me (μονομεθυλίωση της λυσίνης 27 της ιστόνης H3, Monomethyl Histone H3 Lysine27) σχετίζεται με γονιδιακή καταστολή και εμπλέκεται στην ογκογένεση. Η επαγωγή της H3K27me στο ΟΣ έχει συσχετιστεί με απόπτωση σχετιζόμενη με κασπάση (caspase-dependent apoptosis) και παύση του κυτταρικού κύκλου. Κύτταρα ΟΣ που αποπίπτουν παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα H3K27me (Rao-Bindal 2011).

ΣΤ.14. FGF

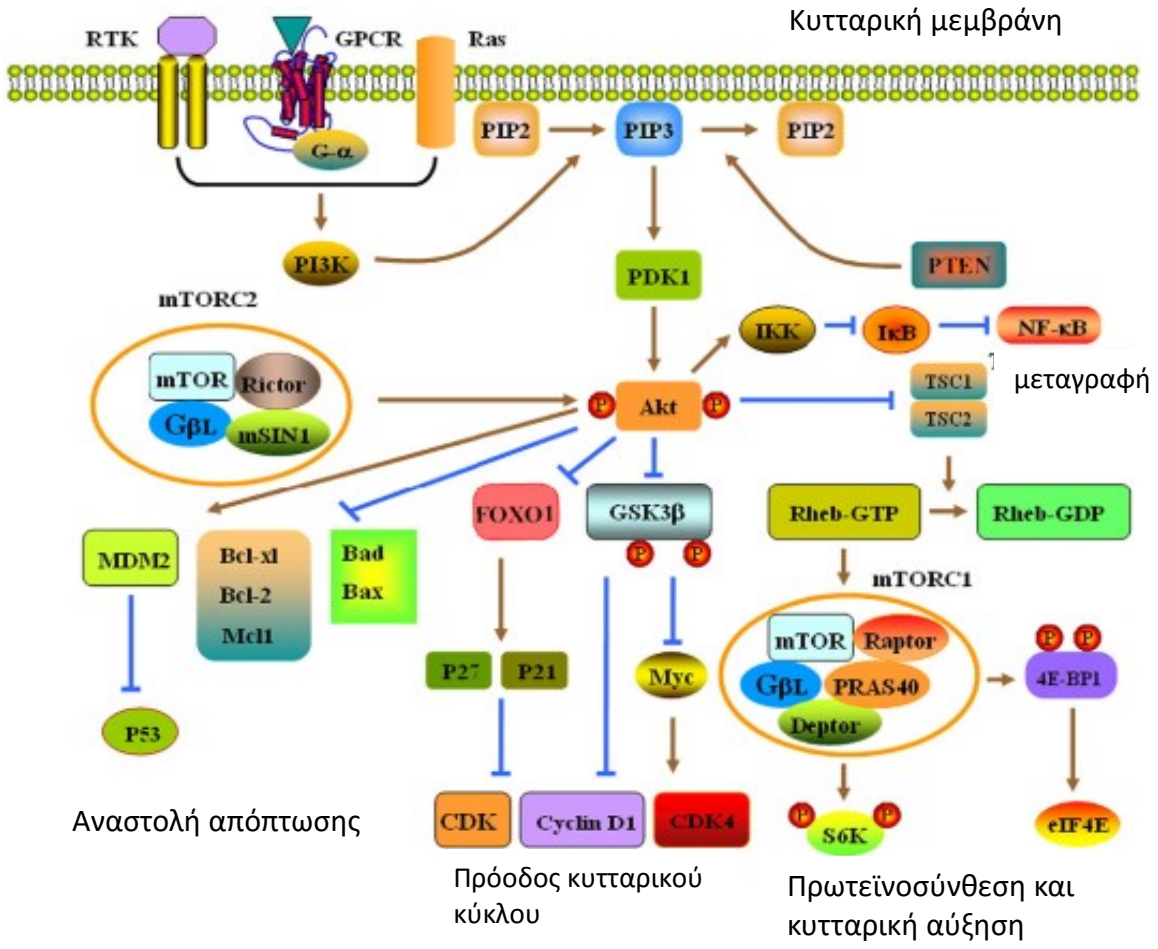
FGF (fibroblast growth factor): εμπλέκεται στη διατήρηση της φωλεάς (niche) των καρκινικών αρχέγονων κυττάρων (CSC, cancer stem cells) του ΟΣ. Αναστέλλει την διαφοροποίηση και προάγει τον πολλαπλασιασμό άωρων οστεοβλαστών, MSC και των κυττάρων του ΟΣ. Η πειραματική εφαρμογή αναστολέων FGF οδηγεί σε μείωση έκφρασης της Sox2 και μείωση του πολλαπλασιασμού κυττάρων ΟΣ. FGF στρωματικής προέλευσης πιθανώς σχετίζεται με την επιθετικότητα και την διατήρηση των κυττάρων ΟΣ σε αδιαφοροποίητη μορφή (Basu-Roy 2013).

ΣΤ.15. PI3K/Akt

Η σηματοδοτική οδός PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase, εικόνα 11) περιλαμβάνει έναν καταρράκτη γεγονότων που παίζει σημαντικό ρόλο σε μεγάλο αριθμό φυσιολογικών και παθολογικών διαδικασιών. Ενεργοποιεί μεγάλο αριθμό στόχων, όπως το mTOR (mammalian target of rapamycin). Αρνητικός ρυθμιστής της οδού αυτής είναι το PTEN (phosphatase and tensin homolog). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η αύξηση της επιβίωσης και η μείωση της απόπτωσης. Η οδός αυτή αποτελεί μια από τις σημαντικότερες ογκογόνες οδούς σχεδόν σε όλους τους τύπους ανθρώπινου καρκίνου. Ενισχύσεις και μεταλλάξεις έχουν διαπιστωθεί σχεδόν σε κάθε μέλος της οδού.

Δυσλειτουργία της σηματοδοτικής οδού PI3K/Akt στο ΟΣ παρατηρείται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων εντοπισμένης νόσου και στο 100% σε προχωρημένα στάδια. Αυτό σημαίνει ότι διαταραχές αυτής της οδού πιθανώς αποτελούν προαπαιτούμενο για την εξέλιξη του ΟΣ (Zhang 2015).

Οι επιγενετική ρύθμιση της σηματοδότησης PI3K/Akt συντελείται μέσω miRNA καθώς και μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων του γονιδίου *PTEN* (υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *PTEN,* miRNA σχετιζόμενα με τη σηματοδοτική οδό PI3K/Akt και το PTEN, βλ. Η.6.).



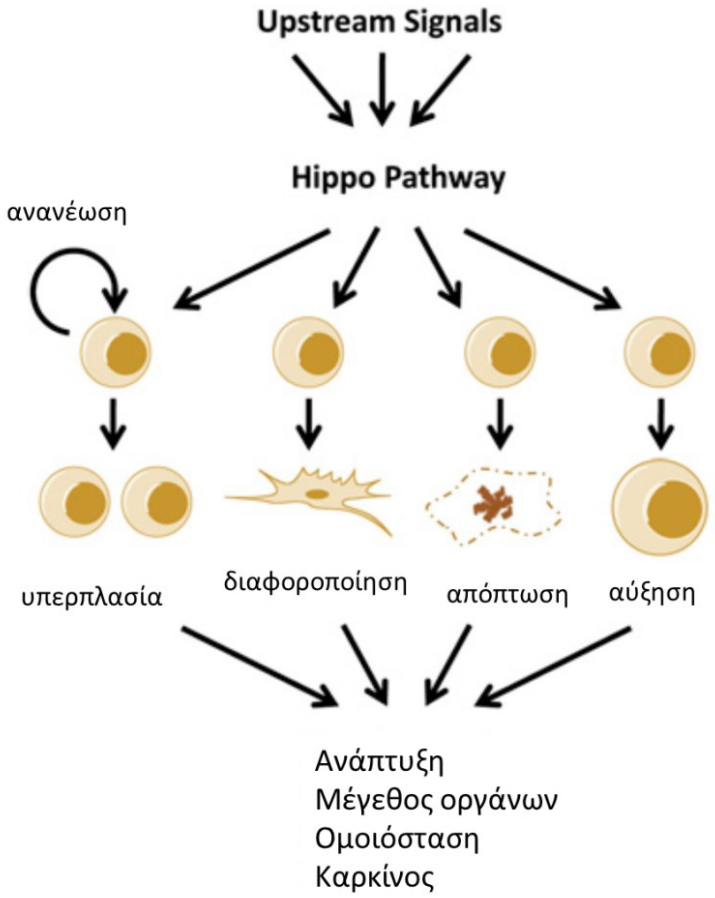
Εικόνα 11: Η σηματοδοτική οδός PI3K/Akt και η εμπλοκή της σε κάθε χαρακτηριστικό της νεοπλασματικής νόσου (αναστολή απόπτωσης, πρόοδος κυτταρικού κύκλου, πρωτεϊνοσύνθεση, μεταγραφή): μετά την ενεργοποίησή της, η PI3K μετατρέπει την PIP2 σε PIP3. Το PTEN μπορεί να αναστρέψει αυτή την αντίδραση. Η PIP3 στη συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την Akt μέση της PDK1. Το mTORC2 επίσης συμβάλει στην ενεργοποίηση του Akt. Το ενεργοποιημένο Akt αυξάνει τα επίπεδα Rheb-GTP μέσω αναστολής σχηματισμού του ετεροδιμερούς TSC1/TSC1, οδηγώντας έτσι σε ενεργοποίηση του mTORC1. Το mTORC1 ακολούθως φωσφορυλιώνει την S6K και την 4E-BP1. Η 4E-BP1 προάγει την απελευθέρωση της eIF4E. Αυτό οδηγεί σε αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση και κυτταρική αύξηση. Το Akt αυξάνει την δραστηριότητα της IKK διευκολύνοντας έτσι την διάσπαση της IκB. Ακολούθως απελευθερώνεται ο NF-κB, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας. Η Akt ρυθμίζει αρνητικά την GSK3β και την FOXO1. Η μειωμένη GSK3β αυξάνει την έκφραση της κυκλίνης D1 και του Myc. Το Myc οδηγεί σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της CDK4. Εν τω μεταξύ, η καταστολή της FOXO1 οδηγεί σε μείωση των p27 και p21 και αυξάνει την έκφραση CDK. Η Akt μέσω υπερέκφρασης των Bcl-xl, Bcl-2 και Mcl1 όπως και μέσω υποέκφρασης των Bad, Bax και p53 δρα αντιαποπτωτικά (Zhang 2015).

ΣΤ.16. HIPPO

Η σηματοδοτική οδός Hippo αποτελεί ογκοκατασταλτική οδό, η οποία εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των ιστών, την αύξηση και την απόπτωση (εικόνα 12). Ελέγχει το μέγεθος των οργάνων στα ζώα, μέσω ρύθμισης της κυτταρικής υπερπλασίας και της απόπτωσης (Bin Zhao 2010, Lamar 2012, Yu 2013).

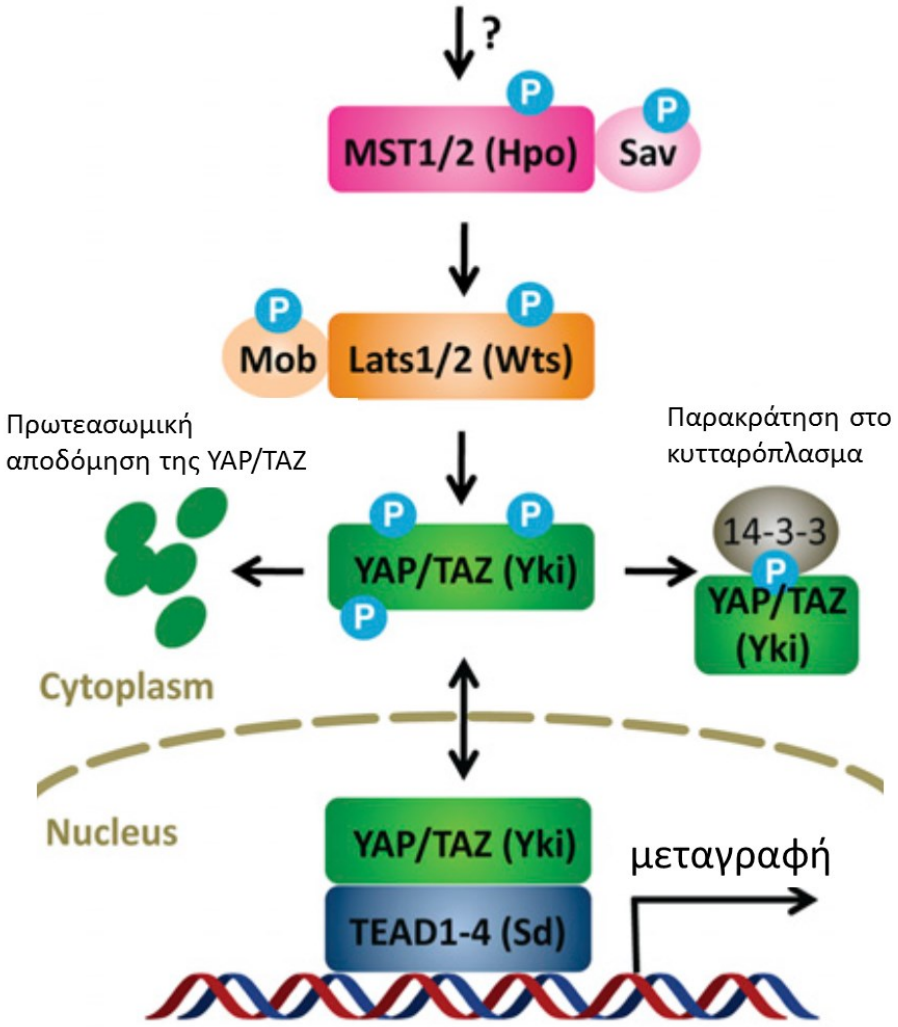
Μεταλλάξεις στην πρωτεϊνική κινάση Hippo (MST1/2) οδηγούν σε υπερανάπτυξη των ιστών και σε φαινότυπο «δίκην ιπποπόταμου», από το οποίο πήρε την ονομασία της.

Η σηματοδοτική οδός HIPPO παίζει ρόλο στην οστεογενετική διαφοροποίηση και επιστρατεύεται κατά την εξέλιξη του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος (Mortus 2014).



Εικόνα 12: Η σηματοδοτική οδός Hippo επιδρά στην κυτταρική υπερπλασία, διαφοροποίηση, αύξηση και απόπτωση (Yu 2013).

Η κινάση Lats 1/2 αποτελεί συστατικό της σηματοδοτικής οδού HIPPO και δρα φωσφορυλιώνοντας τη YAP (εικόνα 13). Ποντίκια που δεν παράγουν Lats1 αναπτύσσουν σαρκώματα μαλακών μορίων, ενώ τα ποντίκια που δεν παράγουν Lats 2 (Lats 2 null mice) πεθαίνουν ως έμβρυα. Μειωμένη έκφραση Lats 1/2 συνεπεία υπερμεθυλίωσης του υποκινητή της έχει παρατηρηθεί σε ανθρώπινο σάρκωμα καθώς και σε διάφορους καρκίνους (Bin Zhao 2010).



Εικόνα 13: Η ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού Hippo οδηγεί σε φωσφορυλίωση των κινασών hippo (MST1/2 στα θηλαστικά) και της συνοδής πρωτεΐνης SAV, οι οποίες φωσφορυλιώνουν τις κινάσες LATS1/2 και την συνοδή πρωτεΐνη MOB. Το σύμπλοκο LATS/MOB φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό συνενεργοποιητή YAP προάγοντας έτσι την αποδόμησή του (κυτταροπλασματική ή πρωτεασωμική), καταστέλλοντας έτσι την δραστηριότητά του. Η αναστολή της σηματοδότησης hippo οδηγεί σε αύξηση της εξαρτώμενης από την YAP/TEAD γονιδιακής έκφρασης, η οποία έχει ρόλο ογκογονιδίου και επηρεάζει τόσο την αύξηση του όγκου και τη μετάσταση (Lamar 2012, Yu 2013).

Η YAP (Yes-associated protein) αποτελεί καταρροϊκό στόχο της HIPPO και εμπλέκεται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ανώριμων οστεοβλαστών καθώς και την διαφοροποίησή τους σε ώριμους οστεοβλάστες. Συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης της οστεοκαλσίνης, που χαρακτηρίζει τους ώριμους οστεοβλάστες. Επίσης η YAP ρυθμίζει την έκφραση της MT1-MMP, μιας μεταλλοπρωτεϊνάσης που συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη και είναι υπεύθυνη για την ανακατασκευή της θεμέλιας ουσίας πέριξ της οστεοβλάστης (Mortus 2014). Έχει ρόλο ογκογονιδίου, πάνω στο οποίο η σηματοδότηση HIPPO δρα κατασταλτικά (Lamar 2012, Yu 2013).

ΣΤ.17. Wnt

Η σηματοδοτική οδός Wnt παίζει ρόλο στην ανάπτυξη πολλών ιστών. Προάγει την αύξηση και τη διαφοροποίηση των ώριμων οστεοβλαστών και την παραγωγή νέου οστού. Έχει σχέση με την επίτευξη της κορυφαίας οστικής πυκνότητας, κάτι που έχει ευρύτερες εφαρμογές (πχ αντιοστεοπορωτική αγωγή) (Kansara 2009, Vrtačnik 2013, Basu-Roy 2013, Baker 2015).

Η σηματοδοτική οδός Wnt ρυθμίζεται σε διάφορα επίπεδα. Ενδογενώς εκκρινόμενοι ανταγωνιστές ανταγωνίζονται τους Wnts (Wnt inhibitory factor 1 - Wif1, secreted frizzled-related protein -Sfrp family, Cerberus), ή συνδέονται με πρωτεΐνες που δεσμεύουν άμεσα τους υποδοχείς Wnt (Dickkopf –Dkk family: Dkk1–Dkk4, sclerostin-Sost) (Kansara 2009). Η έκφραση των ανταγωνιστών της Wnt (WIF1, SOST, DKK1) οδηγεί σε έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο. Σε μερικές περιπτώσεις αυτοί οι αναστολείς περιορίζουν την οστική μάζα (SOST), ενώ σε άλλες διεγείρουν την οστική παραγωγή (DKK2), ενώ ο WIF1 φαίνεται να είναι περιττός για την οστική παραγωγή (Basu-Roy 2013). Στην εικόνα 14 απεικονίζεται η σηματοδοτική οδός Wnt και οι παράγοντες που την επηρεάζουν.

Η σημασία της στην καρκινογένεση φαίνεται από το γεγονός ότι πολλά συστατικά της στοιχεία αποτελούν είτε ογκογονίδια είτε ογκοκατασταλτικά γονίδια. Επομένως η απορρύθμιση αυτής της σηματοδοτικής οδού από μεταλλάξεις και επιμεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση. Τέτοιες ογκογόνες μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί στη β-catenin, E-cadherin, adenomatous polyposis coli (APC), Wnt1, axis inhibition protein 1 (AXIN), και T cell

factor 4 (TCF4), ενώ σταθερό εύρημα σε πολλούς καρκίνους αποτελεί η επιγενετική αποσιώπηση ενδογενώς εκκρινόμενων ανταγωνιστών της οδού Wnt, συμπεριλαμβανομένων των WIF1, DKK1, DKK3, SFRP1, SFRP2, SFRP4 και SFRP5 (Kansara 2009). Αν και σε επιθηλιακούς όγκους η σηματοδότηση Wnt έχει ογκογενετική δράση, σε μεσεγχυματικούς όγκους η δράση της είναι ογκοκατασταλτική (Basu-Roy 2013).

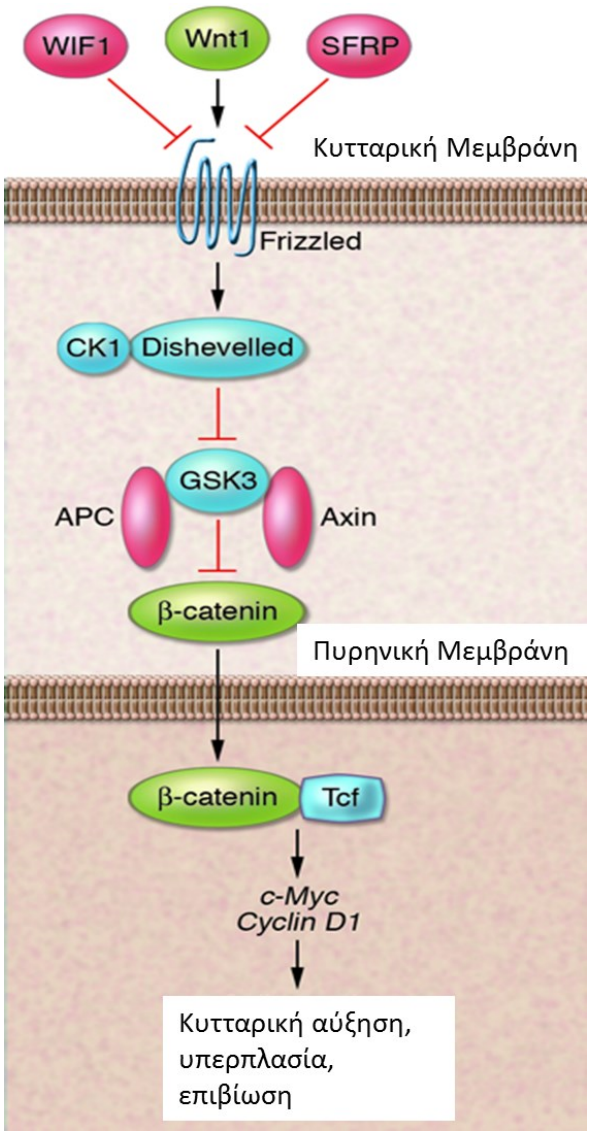
Τα οστεοσαρκώματα συχνά παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα κυτταροπλασματικής ή/και πυρηνικής β-κατενίνης, κάτι που συνδέεται και με υψηλό μεταστατικό δυναμικό (Kansara 2009).

Η 5-azaC αναστέλει την σηματοδότηση Wnt/ßcatenin, η οποία συμβάλει σημαντικά στην χημειοαντίσταση στο ανθρώπινο ΟΣ. Αυτό αφενός αποδεικνύει την επιγενετική απορρύθμιση της οδού αυτής στο ΟΣ, αφετέρου αποτελεί στόχο ενδεχόμενης θεραπευτικής αντιμετώπισης (Foley 2015).

Η **επιγενετική** σίγαση των ανταγωνιστών Wnt αίρει την καταστολή της οδού Wnt, απομακρύνοντας έτσι ένα φυσιολογικό περιοριστικό παράγοντα στον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών. Στην περίπτωση του WIF1, η απώλεια της έκφρασής του μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία σε ανάπτυξη οστεοσαρκώματος. Κατά τη διαφοροποίηση της οστεογενετικής σειράς, η έκφραση Wnt οδηγεί σε μείωση Sox2 η οποία προάγει τον πολλαπλασιασμό και την ογκογένεση. Wnt και FGF έχουν αντίθετη δράση στο ΟΣ: ο FGF προάγει τον πολλαπλασιασμό των CSC ενώ η Wnt, που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση, συμβάλει στη διατήρηση των κυττάρων του ΟΣ (Basu-Roy 2013).

Άλλες μελέτες έχουν δείξει υποέκφραση της Wnt στο ΟΣ (Baker 2015, Basu-Roy 2013, Kansara 2009). Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα της σηματοδότησης Wnt στο ΟΣ, ερμηνεύονται από την μεγάλη ετερογένεια των ΟΣ, εντός του ίδου όγκου (intratumor) αλλά και μεταξύ διαφορετικών όγκων (intertumor). Πιθανώς αυξημένη έκφραση Wnt παρατηρείται σε πιο διαφοροποιημένα κύτταρα ΟΣ, ενώ είναι μειωμένη σε τμήματα του όγκου που περιέχουν CSC (Basu-Roy 2013).

Στην εικόνα 15 απεικονίζεται ο ρόλος της σηματοδότησης Wnt στην οστεογενετική διαφοροποίηση και την ανάπτυξη ΟΣ.



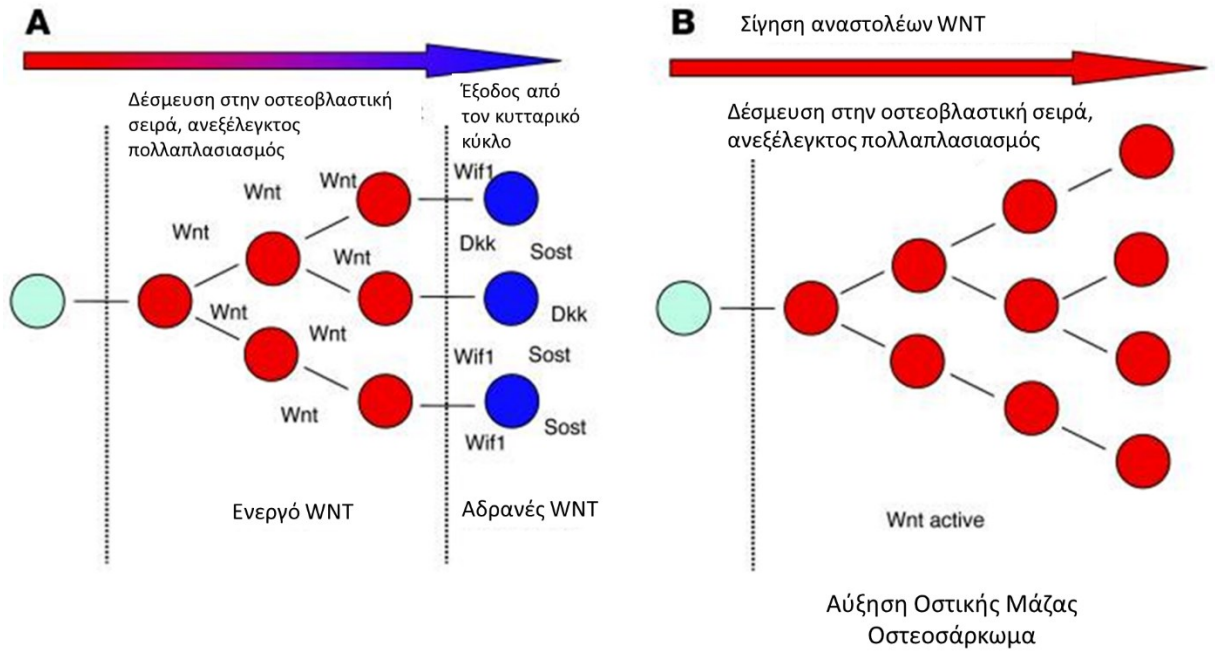
Εικόνα 14: Η σηματοδοτική οδός Wnt: ο προσδέτης (ligand), Wnt συνδέεται στο διαμεμβρανικό υποδοχέα της οικογένειας Frizzled. Παράγοντες όπως WIFs και SFRPs (secreted Frizzled-related proteins) ανταγωνίζονται τους προσδέτες Wnt. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας δρα μέσω Dishevelled και Casein kinase 1 (CK1) σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που περιέχει glycogen synthase kinase–3 (GSK3), axis inhibition protein 1 (Axin) και APC. Το σύμπλεγμα οδηγεί σε ουμπικουιτίνωση της β-κατενίνης και αποδόμησή της. Το σήμα Wnt αναστέλλει το σύμπλεγμα, οδηγώντας σε σταθεροποίηση της κατενίνης και άθροιση στον πυρήνα. Η πυρηνική β-κατενίνη συνδέεται με τους μεταγραφικούς παράγοντες T cell factor (Tcf) και οδηγεί σε έκφραση γονιδίων όπως το c-Myc και η Cyclin D1, που οδηγούν σε κυτταρική αύξηση, πολλαπλασιασμό και επιβίωση. Ογκογονίδια: πράσινο χρώμα, ογκοκατασταλτικά γονίδια: κόκκινα. Ο WIF1 έχει δράση ογκοκαταστολέα, η επιγενετική σίγαση του WIF1 επιταχύνει την γένεση του οστεοσαρκώματος (Enders 2009, Vrtačnik 2013).

ΣΤ.18. Ο ρόλος του *WIF1*

Ο WIF1 (Wnt inhibitory factor-1, εικόνα 14) αποτελεί ενδογενώς εκκρινόμενο ανταγωνιστή του Wnt. Η έκφραση του *WIF1* συνδέεται ισχυρά με οστεοβλαστική ωρίμανση (Baker 2015). Το *WIF1* έχει ρόλο **ογκοκατασταλτικού γονιδίου**, του οποίου η επιγενετική αποσιώπηση σε διάφορους συμπαγείς όγκους καθώς και στο ΟΣ (υπερμεθυλίωση του υποκινητή – ιστονικές τροποποιήσεις) επιταχύνει την σαρκωματογένεση (Kansara 2009). Στο ΟΣ η μειωμένη/χαμηλή έκφραση *WIF1* οδηγεί σε καθήλωση σε πρώιμα στάδια της

οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, αύξηση επιπέδων β-κατενίνης και αύξηση του πολλαπλασιασμού**.**

Η έκφραση *WIF1* σχετίζεται με δείκτες διαφοροποίησης στο πρωτογενές ΟΣ ενώ σχετίζεται αρνητικά με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η υποέκφραση του WIF1 προάγει την ανάπτυξη οστεοσαρκώματος σε ποντίκια. Η αποσιώπηση του WIF-1 σχετίζεται αιτιολογικά με το σποραδικό ή μετά από ακτινοβολία ΟΣ και θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο επιγενετικής θεραπείας (Li 2014).



Εικόνα 15: Ο ρόλος της σηματοδότησης Wnt στην εξέλιξη των οστεοβλαστών και του ΟΣ. Α. φυσιολογικός έλεγχος της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης από τα Wnts. Αναστέλλεται από ανταγωνιστές όπως WIF1, SOST και DKKs. Β. θεραπευτική στόχευση ανταγωνιστών του Wnt, όπως η SOST, αυξάνει την οστική μάζα αυξάνοντας την οστεοβλαστική δέσμευση και τον αριθμό των οστεοβλαστών. Η επιγενετική αποσιώπηση του WIF1 οδηγεί σε μη αντιρροπούμενη δραστηριότητα των Wnts, με συνέπεια την αδυναμία εξόδου από τον κυτταρικό κύκλο και αύξηση της πιθανότητας κακοήθους εξαλλαγής (Kansara 2009).

Αντικρουόμενες απόψεις έχουν εκφραστεί σχετικά με το είδος της επιγενετικής σίγασης του WIF-1 στο ανθρώπινο οστεοσάρκωμα. Πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν την **υπερμεθυλίωση** του υποκινητή ως επιγενετικό μηχανισμό αποσιώπησης του WIF1. Η χορήγηση απομεθυλιωτικών παραγόντων οδηγεί σε επανέκφρασή του WIF1,

επαναδιαφοροποίηση και καταστολή της αύξησης κυττάρων ΟΣ (Kansara 2009, Li 2014). Ωστόσο υπάρχουν και αντίθετες απόψεις σχετικά με το είδος της επιγενετικής αποσιώπησης του WIF1. Υποστηρίζεται δηλαδή ότι η αποσιώπηση του WIF1 δεν οφείλεται στη μεθυλίωση CpG του υποκινητή του στο ΟΣ, αλλά σε **ιστονικές τροποποιήσεις**, οι οποίες μπορούν να ενεργοποιηθούν με αναστολείς HDAC και να οδηγήσουν σε ώριμη οστεοβλαστική δραστηριότητα. Αυτό στηρίζεται στο εύρημα ότι η περιοχή του υποκινητή του *WIF1* παρουσιάζει υποακετυλίωση σε κύτταρα ΟΣ σε σχέση με φυσιολογικούς οστεοβλάστες. Η χορήγηση αναστολέα HDAC οδηγεί σε υψηλή έκφραση του *WIF1* σε κύτταρα ΟΣ και σε προοστεοβλάστες.

Στο ΟΣ παρατηρείται **αμφίσημη** (bivalent) επιγενετική (μέσω υποακετυλιωμένων ιστονών) σήμανση του *WIF1*. Η αμφίσημη κατάσταση παρατηρείται σε γονίδια που έχουν σχέση με την ανάπτυξη σε εμβρυονικά αρχέγονα κύτταρα, και προοδευτικά εξαφανίζεται κατά την κυτταρική διαφοροποίηση. Σε ό, τι αφορά στον WIF1, αυτό σημαίνει ότι στα κύτταρα ΟΣ ο WIF1 παραμένει σε κατάσταση καταστολής, γιατί αυτά έχουν δεσμευθεί στην κατεύθυνση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης (Baker 2015).

ΣΤ.19. PTEN

Το *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) αποτελεί ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο δρα ανασταλτικά στην σηματοδοτική οδό PI3K/AKT. Η ογκοκατασταλτική δράση του *PTEN* ασκείται με 3 τρόπους (SONG 2014):

i. PI3K/AKT-mTOR: το *PTEN* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, η οποία έχει δράση λιπιδικής φωσφατάσης. Η πρωτεΐνη αυτή ανταγωνίζεται το PI3K και αποφωσφορυλιώνει το PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate). Αυτή η δράση αναστέλλει την αντίστοιχη σηματοδοτική οδό. Τα μειωμένα επίπεδα PIP3 καθηλώνουν το κύτταρο στη φάση G1 και οδηγούν σε απόπτωση.

ii. MAPK (Mitogen-activated protein kinase). Το PTEN αναστέλλει την ERK (extracellular signal-regulated kinase, αναρροϊκό ένζυμο της σηματοδότησης MAPK), την ενεργοποίηση του Ras και την φωσφορυλίωση του Shc. Το PTEN

επίσης εμποδίζει την φωσφορυλίωση της MAPK και καθηλώνει το κύτταρο στη φάση G1, εμποδίζοντας έτσι την αύξηση του όγκου.

iii. Focal adhesion protein kinase (FAK). Η FAK είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην σηματοδοτική οδό της ιντεγκρίνης. Η ενεργοποιημένη FAK ενεργοποιεί αρκετές κινάσες και σηματοδοτικά μόρια που προάγουν την κυτταρική διήθηση και μετάσταση. Το PTEN αναστέλλει την ενεργοποίηση της FAK προκαλώντας αποφωσφωρυλίωση, εμποδίζοντας έτσι τη διήθηση και τη μετάσταση των ογκοκυττάρων.

Τα επίπεδα έκφρασης του *PTEN* στο οστεοσάρκωμα είναι **χαμηλά** (Song 2014). Το *myc* και η *Sp1* (specificity protein 1) αποτελούν τους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται στον υποκινητή του *PTEN* και ρυθμίζουν τη μεταγραφή του. Διαταραχή της **μεθυλίωσης** του υποκινητή του *PTEN* μεταβάλλει τη μεταφρασή του. Η 5 αζακυτιδίνη μέσω απομεθυλίωσης του υποκινητή του *PTEN*, αίρει την καταστολή έκφρασής του, με συνέπεια την μεταγραφή της πρωτεΐνης του (Foley 2015). Η πρωτεΐνη PTEN οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση σε κύτταρα οστεοσαρκώματος. Η διαπίστωση αυτή μπορεί να αποτελέσει τη βάση επιγενετικής θεραπείας στο ΟΣ (Song 2014).

ΣΤ.20. IGF2 - H19

Το γενετικό εντύπωμα (genomic imprinting) είναι η επιγενετική αποσιώπηση ενός από τα δύο γονεϊκά αλληλόμορφα. Ο *IGF2* (insulin like growth factor II), ο οποίος κωδικοποιεί ένα ισχυρό μιτογόνο, και το *H19*, ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, βρίσκονται στον άνθρωπο σε γειτονικές θέσεις στη γονιδιακή περιοχή 11p15.5. Στους περισσότερους ιστούς το *IGF2* παρουσιάζει μητρικό γενετικό εντύπωμα, ενώ το *H19* πατρικό γενετικό εντύπωμα. Η απώλεια του γενετικού εντυπώματος (LOI, loss of imprinting) του *IGF2* ή/και *H19* συμβαίνει συχνά σε καρκίνους και μπορεί να εμπλέκεται στην κακοήθη εξαλλαγή. Η απώλεια του γενετικού εντυπώματος *IGF2* ή *H19* στο ΟΣ είναι **αμοιβαία αποκλειόμενο** φαινόμενο.

Η απώλεια του γενετικού εντυπώματος του *IGF2* συνεπάγεται την παραγωγή του αυξητικού παράγοντα από δύο αλληλόμορφα, με συνέπεια την ενίσχυση των αυξητικών

σημάτων στα καρκινικά κύτταρα. Ο IGF2 είναι σημαντικός για την αύξηση του ΟΣ, ενώ η καταστολή του IGF2 σε κυτταρικές σειρές ΟΣ οδηγεί σε αναστολή της αύξησης. Ο μηχανισμός με τον οποίο η απώλεια του γενετικού εντυπώματος του *H19* προάγει την καρκινογένεση είναι δύσκολο να εξηγηθεί, όμως αποτελεί δείκτη ευρύτερης επιγενετικής δυσλειτουργίας (Ulaner 2003).

ΣΤ.21. LSD-1

Η LSD1 (Lysine-specific demethylase 1) παρουσιάζει δράση ογκογονιδίου σε διάφορους καρκίνους. Προκαλεί απομεθυλίωση της H3K4me2/1 με συνέπεια την καταστολή της μεταγραφής ή απομεθυλίωση της H3K9me2/1 με συνέπεια την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Σχετίζεται με την διαφοροποίηση των MSCs, EMT, το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση. Επίσης σχετίζεται με τη σαρκωματογένεση, γιατί έχει διαπιστωθεί υπερέκφρασή της σε διάφορα σαρκώματα, ενώ η αναστολή της αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του συνοβιακού σαρκώματος. Επομένως μπορεί να αποτελέσει στόχο θεραπείας σε σαρκώματα στα οποία υπερεκφράζεται (Bennani-Baiti 2012). Πολύ πιο συχνά εκφράζεται στο συνοβιακό σάρκωμα, προάγοντας την EMT (Epithelial–mesenchymal transition), μέσω αδρανοποίησης της E-cadherin, υπερέκφρασης του Snail και Slug και ενεργοποίησης της σηματοδότησης Wnt και PI3K/AKT. Αναστολή της LSD1 ενεργοποιεί το p53.

ΣΤ.22. Άλλα γονίδια που εμπλέκονται στο ΟΣ

Γονίδια, στα οποία διαπιστώθηκε **υπερμεθυλίωση** υποκινητών σε περιπτώσεις ΟΣ είναι τα *TIMP3* (tissue inhibitor of metalloproteinase 3), *MGMT* (O-6methylguanine DNA methyltransferase) και *DAPK1* (death-associated protein kinase 1). Συμβολή στην οστεοσαρκωματογένεση έχουν επίσης τα γονίδια *BMP2, c-MYC, FOS, CDK4, MDM2, ERBB2, Her2/Neu* και *κυκλίνη D2*, τα οποία **υπερεκφράζονται,** και τα *CDKN1A, LSAMP* και *CCNB1*, τα

οποία **υποεκφράζονται**. Πιθανό ογκογονίδιο που εμπλέκεται στο ΟΣ, το οποίο εντοπίζεται στη γονιδιακή περιοχή 6p21, είναι το *CDC5L* (Sadikovic 2010).

Η υπερέκφραση πρωτοογκογονιδίων συμβάλλει στην έναρξη της ογκογένεσης, ωστόσο δεν είναι σαφής στην παθογένεση του ΟΣ. Μελέτες σε όγκους έδειξαν ότι η υπομεθυλίωση οδηγεί σε ενεργοποίηση και υπερέκφραση πρωτοογκογονιδίων και ογκογονιδίων όπως το *H-ras, c-myc, cfos*, *uPA* και *SNCG/BSCG1*. Στο ΟΣ έχει διαπιστωθεί υπερέκφραση των *myc* και *fos*, η οποία συνδέεται με πτωχή πρόγνωση. Ωστόσο δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για επιγενετική υπερέκφραση των γονιδίων αυτών στο ΟΣ. Επίσης δεν υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις ότι η υπερέκφραση στο ΟΣ γονιδίων όπως το *HER2* και *IGF2R*, οφείλεται σε επιγενετικούς μηχανισμούς (Li 2014).

ΣΤ.23. Ενεργοποιημένα ογκογονίδια προκαλούν επιγενετική αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων!

Οι γενετικοί και οι επιγενετικοί μηχανισμοί συνεργάζονται και αλληλοενισχύονται στην διαδικασία της καρκινογένεσης. Επιγενετικές τροποποιήσεις μπορεί να οδηγήσουν σε ογκογόνες γονιδιακές μεταλλάξεις, ενώ μεταλλάξεις γονιδίων που εμπλέκονται σε επιγενετικά φαινόμενα οδηγούν σε παθολογικές επιγενετικές τροποποιήσεις που ενισχύουν την καρκινογένεση (You 2012).

Ογκογονίδια, όπως το *ras*, μπορούν να προκαλέσουν επιγενετική αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή γονιδίων που προκαλούν απόπτωση (pro-apoptotic genes). Σε αρκετούς όγκους η ενεργοποιημένη Ras-GTPase οδηγεί σε υποέκφραση των *Fas* (First apoptosis signal) και *RASSF1* μέσω μεθυλίωσης του DNA. Η χορήγηση απομεθυλιωτικών παραγόντων ενεργοποιεί το *FAS*. Η μεθυλίωση του υποκινητή του *FAS* αναστέλλει την απόπτωση σε πολλαπλασιαζόμενους οστεοβλάστες. Η ιβανδρονάτη με επιγενετικό μηχανισμό, αναστέλλει το ενεργοποιημένο *Ras* και μειώνει έκφραση της DNMT, με συνέπεια την ενεργοποίηση του *FAS* (Li 2014).

Ζ. microRNA και ΟΣ

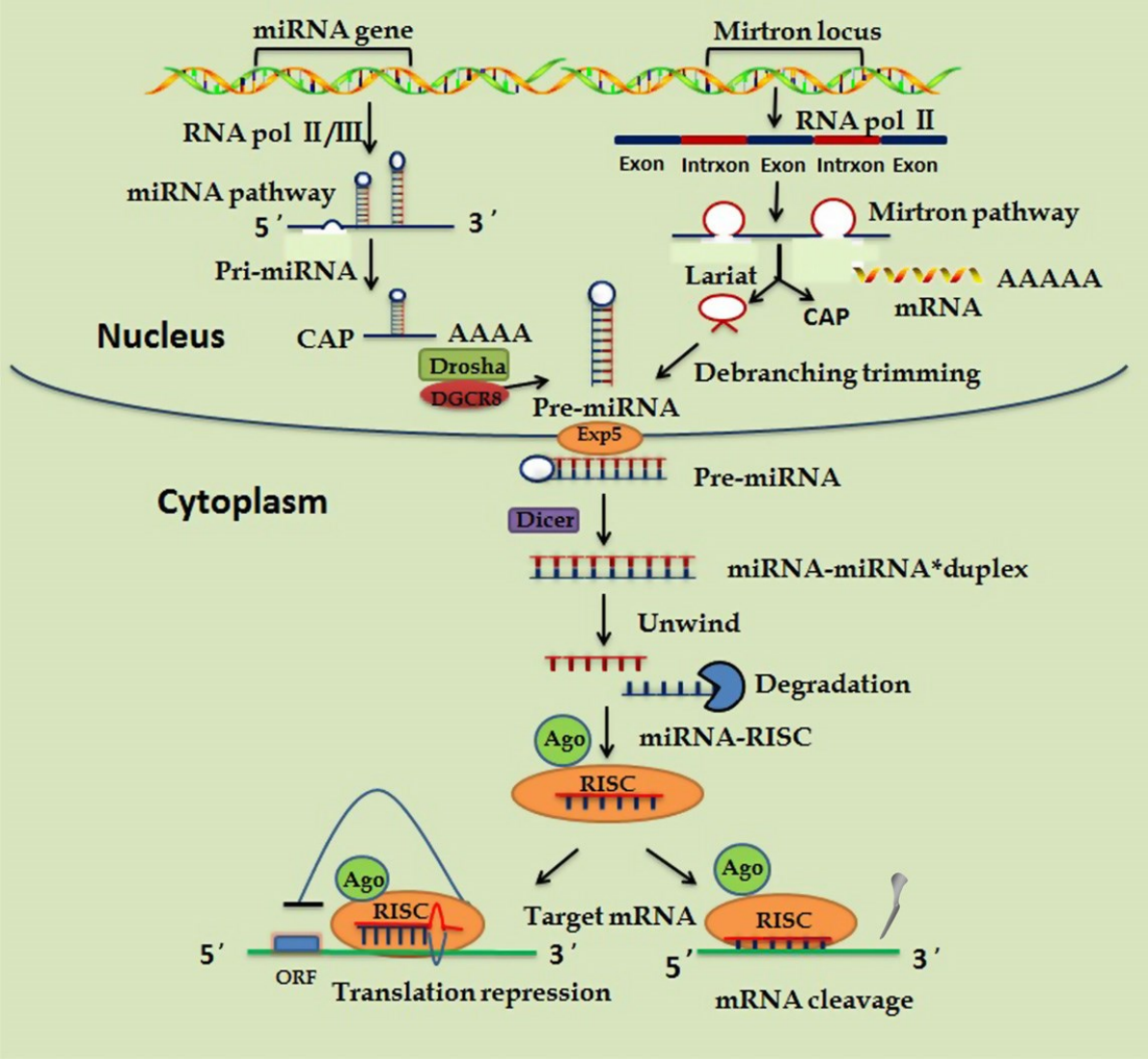
Τα microRNAs (miRNAs) είναι μικρά, ενδογενώς παραγόμενα μόρια RNA, μήκους 22 περίπου νουκλεοτιδίων, τα οποία ελέγχουν την γονιδιακή έκφραση μέσω σύνδεσης με την 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή [3'-untranslated regions (UTR)] των mRNA με συνέπεια αναστολή της μετάφρασης ή δέσμευση των mRNA για αποδόμηση, ή με μηχανισμούς σίγασης μέσω δράσης στη χρωματίνη (μεταμεταγραφικό επίπεδο) (Subramanian 2007, Zhang 2015). Ο σχηματισμός τους περιγράφεται στην εικόνα 16.

Επηρεάζουν μεγάλο εύρος βιολογικών διεργασιών, όπως η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η διαφοροποίηση. Έχουν το χαρακτηριστικό ότι μπορούν ταυτόχρονα να ρυθμίζουν εκατοντάδες γονίδια- στόχους και διάφορες μοριακές οδούς, επηρεάζοντας πολλές κυτταρικές λειτουργίες, και αυτό καθιστά την έρευνά τους εξαιρετικά ενδιαφέρουσα (Zhang 2015). Υπολογίζεται ότι το 30% των γονιδίων ρυθμίζονται από miRNA (http://www.news-medical.net/health/What-is-MicroRNA.aspx).

Στον άνθρωπο έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 1881 miRNAs (http://www.mirbase.org) Περισσότερα από τα μισά miRNAs εντοπίζονται σε εύθραυστα σημεία των χρωμοσωμάτων (chromosomal fragile site). Διαταραχές κατά το διπλασιασμό του DNA σε αυτά τα σημεία έχουν αντίκτυπο στα επίπεδα έκφρασης των miRNA (Subramanian 2007).

Τα miRNA ελέγχουν την φυσιολογική οστική ανακατασκευή, καθώς συμμετέχουν στην ρύθμιση της διαφοροποίησης και της λειτουργίας οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Ως εκ τούτου, τα επίπεδά τους εξαρτώνται από τις διάφορες φάσεις του οστικού μεταβολισμού (Zhang 2015). Στον καρκίνο δρουν είτε ως ογκοκαταστολείς είτε ως ογκογονίδια, τα οποία μέσω επίδρασης σε διάφορες σηματοδοτικές οδούς - MAPK, Notch, Wnt, Ras κα- ελέγχουν διάφορες διεργασίες της ογκογένεσης, όπως την αύξηση του όγκου, την απόπτωση, την ικανότητα διήθησης και μετάστασης και τέλος την αντίσταση στη χημειοθεραπεία (Subramanian 2007, Sander 2014, Li 2014, Fujiwara 2014, Muliang Ding 2015, Zhang 2015). Επιπλέον, τα miRNAs (βλ δράση ογκοκατασταλτικών miRNA) μπορούν να επιφέρουν επιγενετικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, μέσω επίδρασης στα επίπεδα μεθυλοτρανσφερασών του DNA (DNMT), ενώ τα miRNAs «αυτορρυθμίζονται» μέσω

επιγενετικών μηχανισμών (Kelly 2010, Muliang Ding 2015). Με λίγα λόγια η επιγενετική ρύθμιση γίνεται μια εξαιρετικά περίπλοκη διαδικασία.



Εικόνα 16: Τα pre-miRNA σχηματίζονται στον πυρήνα μέσω δυο οδών. **Κανονική οδός** παραγωγής miRNA (αριστερά). Η RNA pol II ή III παράγει pri-miRNA μετά από μεταγραφή γονιδίων miRNA, τα οποία υφίστανται αποκοπή σε pre-miRNA από το ενζυμικό σύμπλοκο Drosha/DGCR8. **Μη κανονική οδός** (mirtron pathway) παραγωγής miRNA (δεξιά): Ο σχηματισμός pre-miRNA hairpin από εσώνια (lariat) είναι μια πολυεπίπεδη διαδικασία που περιλαμβάνει την μεταγραφή από την περιοχή mirtron μέσω RNA pol II, συρρραφή (spliceosome), debranching, και trimming μικρών ενδονίων χωρίς την επεξεργασία από Drosha. Τα προκύπτοντα pre-miRNA και από τις δυο οδούς μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα μέσω Exportin 5 (Exp 5). Στο κυτταρόπλασμα, η Dicer μετατρέπει τα pre-miRNAs στα miRNA/miRNA* duplexes, τα οποία αποπεριελίσσονται και στη συνέχεια οι έλικες miRNA* αποδομούνται. Οι έλικες miRNA αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Ago ώστε να σχηματιστεί το σύμπλοκο RISC, το οποίο ακολούθως συνδέεται με το συμπληρωματικό mRNA και αναστέλλει την γονιδιακή έκφραση μέσω καταστολή της μετάφρασης ή διάσπαση του mRNA (Zhang, 2015).

Στο ΟΣ παρατηρείται απορρύθμιση σε μεγάλο αριθμό miRNAs, τα οποία παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση συγκριτικά με φυσιολογικές οστεοβλάστες. Η **Osteosarcoma Database** αποτελεί μια φιλόδοξη προσπάθεια καταγραφής όλων των γονιδίων και miRNA που παρουσιάζονται στο ΟΣ. Μέχρι σήμερα, 81 miRNA έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη ΟΣ (http://osteosarcoma-db.uni-muenster.de/browse_mirs.php). Επιπλέον γίνεται προσπάθεια να περιγραφούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ miRNA και γονιδίων στόχων. (MicroRNA – Target Interactions – MTIs) (Poos 2014, Zhang 2015, Muliang Ding 2015).

Τα miRNA ανευρίσκονται στον ορό σε εξαιρετικά σταθερή μορφή, σχετίζονται με την ανάπτυξη του οργανισμού, είναι ιστοειδικά και παίζουν ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Τα πρότυπα αυτά μεταβάλλονται σε νοσηρές καταστάσεις πχ κατά την ογκογένεση, ενώ διαφέρουν και μεταξύ όγκων. Η ταυτότητα των miRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση ενός όγκου ή της πρωτοπαθούς εστίας. κάτι που αναδεικνύει τα ειδικά πρότυπα έκφρασής τους σε χρήσιμους μη παρεμβατικούς βιοδείκτες, διαγνωστικούς, προγνωστικούς και προβλεπτικούς (Subramanian 2007, Zhang 2015).

Η έκφραση των miRNAs μπορεί να τροποποιηθεί σε τρία επίπεδα: μεταβολή της μεταγραφής, επιγενετική τροποποίηση και διαταραχή των αντιγράφων του γονιδίου του miRNA. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η διαταραχή της ρυθμιστικής τους δράσης (Thayanithy 2012). Στον καρκίνο, τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης miRNA πιθανώς αντανακλούν το κύτταρο προέλευσης, την διαφοροποίηση και την ογκογόνο σηματοδοτική οδό. Στοχευμένη θεραπεία κατά των miRNA έχει δείξει μεγάλη δυνατότητα ελέγχου της επιθετικής συμπεριφοράς του ΟΣ (Li 2014), ενώ σημαντική αναμένεται να αποδείχθεί η προσφορά τους και ως προγνωστικοί δείκτες (Sarver 2013).

Μερικές από τις μεταβολές στην έκφραση των miRNA αναφέρονται στον πίνακα 2 ενώ στον πίνακα 3 αναφέρονται οι σηματοδοτικές οδοί που επηρεάζονται από διάφορα miRNA (Zhang 2015).

Ζ.1. Ογκοκατασταλτικά microRNAs

Στο ΟΣ παρατηρείται υποέκφραση αρκετών miRNA, όπως τα **miR-16**, **miR-34**, **miR-133a**, **miR-143**, **miR-199a-3p**, **miR-335** και **miR-340** (Li 2014).

Τα μέλη της οικογένειας **miR-34** (miR34a, 34b και 34c) επάγονται από το p53 ως απάντηση σε βλάβη του DNA ή σε άλλο ογκογόνο ερέθισμα και στοχεύουν πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου (Botter 2014, Poos 2014, Li 2014, Muliang Ding 2015, βλ. miRNA σχετιζόμενα με το p53).

Τα περισσότερα γονίδια miRNA σχετίζονται με νησίδια CpG. Επιγενετική - μέσω **υπερμεθυλίωσης** - αποσιώπηση του γονιδίου **miR-34** στο ΟΣ συσχετίστηκε με μετάσταση. Επιγενετική αποσιώπηση μέσω **υπερμεθυλίωσης** έχει διαπιστωθεί και για τα γονίδια **miR-335** και **miR-340** σε άλλους συμπαγείς όγκους (Li 2014, Muliang Ding 2015). Ωστόσο δεν είναι βέβαιο ότι η υπ**ερ**έκφραση των miRNA σχετίζεται με επιγενετικά φαινόμενα στο ΟΣ.

Το **miR-142** έχει ογκοκατασταλτική δράση, και παρουσιάζει υποέκφραση στο ΟΣ (Muliang Ding 2015). Στο ΟΣ τα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου **miRNA 142** είναι αυξημένα, κάτι που υπονοεί εμπλοκή του miRNA στην ανάπτυξη του ΟΣ. Η χορήγηση απομεθυλιωτικών παραγόντων (5azaC), αναστολέων αποακετυλάσης (PBA, 4-phenylbutyric acid) ή συνδυασμού τους, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων miRNA 142 με συνέπεια μείωση του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης καθώς και διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Το miRNA 142 προκαλεί μείωση των κυττάρων ΟΣ που βρίσκονται στη φάση S, και αύξηση των κυττάρων που βρίσκονται στην φάση G2 προκαλώντας έτσι παύση του κυτταρικού κύκλου (Muliang Ding 2015).

miR29: περιλαμβάνει τα μέλη miR-29a, miR-29b και miR29c, τα οποία μειώνουν την κυτταρική αύξηση και ως εκ τούτου παρουσιάζουν **ογκοκατασταλτική** δράση. Η υπερέκφραση του miR-29b-1 αυξάνει την ευαισθησία στην προκαλούμενη από ΧΜΘ απόπτωση, ενώ δεν επιδρά στη μετανάστευση και τη διήθηση. Αυτό δείχνει ότι η δράση του miR-29b-1 εξαρτάται από τις ιδιαίτερες συνθήκες που επικρατούν. Το miR-29b-1 στοχεύει τα CD133, N-Myc, cyclin D2 (CCND2), Bcl-2 και της IAP2 (inhibitor of apoptosis protein 2) και θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικό παράγοντα στο ΟΣ (Zhang 2015). Παραδόξως

αναφέρεται ότι τα επίπεδα των miR-29a, miR-29b, και miR-29c σε ιστούς ΟΣ και στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΟΣ είναι **αυξημένα** συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες, ενώ ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα miR-29a και miR-29b στο περιφερικό αίμα, παρουσιάζουν υψηλότερο βαθμό κακοήθειας, μεγαλύτερη πιθανότητα μετάστασης και υποτροπής και βραχύτερη επιβίωση καθώς και επιβίωση ελεύθερη νόσου (disease free survival) (Zhang 2015).

Επίδραση ογκοκατασταλτικών miRNAs στα επίπεδα **DNMT**: Το **miR-29a**, το οποίο παρουσιάζει υπερέκφραση και δρα ογκοκατασταλτικά στην σηματοδότηση PI3K/PTEN/Akt, μειώνει τα επίπεδα DNMT3a επηρεάζοντας την μεθυλίωση του DNA και την απόπτωση (Kelly 2010, Muliang Ding 2015).

Ζ.2. microRNAs σε ρόλο ογκογονιδίου

Στο ΟΣ παρατηρείται υπερέκφραση διαφόρων miRNAs, όπως: **miR-20a**, **miR 21** (βλ. επιγενετικοί βιοδείκτες), **miR-140**, **miR-181**, η αύξηση των οποίων σχετίζεται με διήθηση, μετανάστευση και χημειοαντίσταση των καρκινικών κυττάρων. Αν και δεν αποτελεί απόδειξη ότι η υπερέκφραση των miRNAs στο ΟΣ μπορεί να σχετίζεται με επιγενετικά φαινόμενα, ωστόσο τα όγκο-miRNAs μπορεί να επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή την χημειοευαισθησία των καρκινικών κυττάρων μέσω επιγενετικών μηχανισμών (Li 2014).

Σε κυτταρικές σειρές ΟΣ με μεταλλαγμένο p53, παρατηρήθηκε στόχευση της HDAC4 (εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίηση) από το **miR-140**, καθώς και χημειοαντίσταση στη μεθοτρεξάτη και 5-φθοριοουρακίλη μέσω καταστολής της HDAC4.

Το **miR-20a** φαίνεται να είναι υπεύθυνο για την επιγενετική υποέκφραση του Fas στις πνευμονικές μεταστάσεις που παρατηρούνται σε ΟΣ (Li 2014).

Ζ.3. Τα miRNA στη γονιδιακή περιοχή 14q32

Η **θέση 14q32** αντιπροσωπεύει μια πλούσια σε γονίδια miRNA περιοχή του ανθρώπινου γονιδιώματος, η οποία περιέχει πάνω από 40 διαφορετικά miRNA, τα οποία

φαίνεται ότι εμπλέκονται σε διάφορες νόσους. Στο ΟΣ τα microRNA αυτά παρουσιάζουν **υποέκφραση**, συγκριτικά με τον φυσιολογικό οστίτη ιστό (Thayanithy 2012, Sarver 2013).

Πίνακας 2: πρότυπα έκφρασης mi RNA στο ΟΣ (Zhang 2015, τροποποιημένο)	
έκφραση	miRNA
υποέκφραση	let-7b, let-7i, miR-1, miR-29b, miR-92a, miR-99b, miR-100-3p, miR-126, miR-127-3p, miR-132, miR-142-3p, miR-143, miR-144, miR-145, miR-150, miR-193a-5p, miR-195, miR-197, miR-199b-5p, miR-199a-3p, miR-206, miR-223, miR-335, miR-376c, miR-324-5p, miR-422a, miR-484, miR-486-5p, miR-539
υπερέκφραση	miR-9, miR-17-92 cluster, miR-21, miR-31, miR-29, hsa-miR-31, miR-99, miR-106a-363, miR-106b- 25, hsa-miR-129-5p, miR-130, miR-135b, miR-135b-5p, miR-146a-5p, miR-148a, miR-150, miR-151-3p, miR-155-5p, miR-181a, miR-191, miR-195, miR-196a/b, miR-199b-5p, miR-202, miR-338-3p, miR-374a, miR-451, miR-483-5p, miR-513a-5p, miR-542-5p, miR-652, miR-765, miR-891a, miR-1290

Η μείωση των miRNA της περιοχής 14q32 στο ΟΣ σταθεροποιεί το *cMYC*, το οποίο ακολούθως αυξάνει την έκφραση των ογκογόνων **miR-17-92 miRNAs**, τα οποία σχετίζονται με διαφυγή από την απόπτωση και αυξημένο πολλαπλασιασμό (Sarver 2013). Επίσης σχετίζεται με αυξημένη έκφραση των CDK5 και TWIST1 (τα οποία αυξάνουν τη μεταστατική ικανότητα) και μειωμένη έκφραση των IFNB1, TEK και COL18A1 (δρουν ανασταλτικά στη διαδικασία της μετάστασης). Η μειωμένη έκφραση των 14q32 miRNA σχετίζεται αντίστροφα με την έκφραση της TK1 (Thymidine kinase 1), η οποία φωσφορυλιώνει τη θυμιδίνη σε μονοφωσφορική δεοξυθυμιδίνη και αυξάνεται σημαντικά σε διάφορους καρκίνους (Sarver 2013).

Επομένως, μέσω των γονιδίων που επηρεάζουν, τα 14q32 miRNA σχετίζονται με την μετάσταση και την πτωχή επιβίωση ασθενών με ΟΣ και πιθανώς θα αποτελέσουν προγνωστικούς δείκτες στο ΟΣ (Sarver 2013).

Μελέτες συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (comparative genomic hybridization, CGH) δεν έχουν διαπιστώσει διαταραχή των αντιγράφων του DNA (DNA copy number losses) στην περιοχή αυτή. Η διαταραχή της ρυθμιστικής δράσης των miRNA που εκφράζονται στην περιοχή αυτή μπορεί να αποδοθεί σε επιγενετικές τροποποιήσεις αυτών των miRNA και η έκφρασή τους στα κύτταρα ΟΣ μπορεί να αποκατασταθεί με συνδυασμό απομεθυλιωτικών παραγόντων του DNA και αναστολέων HDAC. Ωστόσο η μελέτη της περιοχής 14q32 δεν έδειξε υπερμεθυλίωση των υποκινητών, αντίθετα, διαπιστώθηκε είτε υπομεθυλίωση, είτε απουσία μεθυλίωσης σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς. Αυτό ερμηνεύεται και υπονοεί την ύπαρξη μιας «εποπτεύουσας» ρυθμιστικής περιοχής τουλάχιστον 200kb η οποία ελέγχει την θέση 14q32 των miRNA (Thayanithy 2012). Ωστόσο φαίνεται ότι η **υποέκφραση των 14q32 miRNAs στα κύτταρα ΟΣ σχετίζεται με αποακετυλίωση ιστονών**. (Thayanithy 2012).

Εκτός από την υποέκφραση των 14q32 miRNAs στο ανθρώπινο ΟΣ, περιγράφονται διαφορετικά πρότυπα έκφρασης γονιδίων που βοηθούν στην ταξινόμηση του ΟΣ σε δύο ομάδες με διαφορετική βιολογική συμπεριφορά. Και τα δύο γεγονότα σχετίζονται χρονικά μεταξύ τους, δηλαδή η υποέκφραση των **14q32 miRNA** σχετίζεται αντίστροφα με την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν **την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου** και σχετίζονται με έκφραση αποπτωτικών γονιδίων (Thayanithy 2012).

Συνδυασμένη εφαρμογή φαρμάκων που επιδρούν στις επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA και της χρωματίνης οδήγησε στην ενεργοποίηση miRNAs στην περιοχή 14q32 και **μείωσε σημαντικά την έκφραση γονιδίων του κυτταρικού κύκλου**. Η εφαρμογή decitabine (απομεθυλίωση) οδήγησε σε έκφραση αποπτωτικών γονιδίων όπως GADD45A, HSPA9B, PAWR, PDCD5, NFKBIA και TNFAIP3, ενώ αναστολείς HDAC αυξάνουν και τη χημειοευαισθησία κυττάρων ΟΣ στη δοξορουβικίνη. Οι αναστολείς HDAC (βαλπροϊκό), σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα έχουν χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά σε συμπαγείς όγκους, όχι όμως σε ΟΣ (Thayanithy 2012).

Ζ.4. Πρότυπα έκφρασης miRNA στο ΟΣ

Ακολουθεί σύντομη περιγραφή μερικών miRNA στα οποία διαπιστώθηκε χαρακτηριστικός ρόλος στο ΟΣ:

miRNA 15: αποτελεί οικογένεια miRNA που έχουν ογκοκατασταλτική δράση (Poos 2014).

miR-21: σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο νόσου κατά Enneking καθώς και με αντίσταση στην θεραπεία.

miR-24: η αύξησή του μειώνει την αύξηση οστεοβλαστικών κυττάρων μέσω στόχευσης της lysophosphatidic acid acyltransferase ß (LPAATß) (Zhang 2015).

miR-27a: η αναστολή του αυξάνει την έκφραση της MAP2K4 (mitogen-activated protein kinase 4) η οποία αντιστρέφει τον κακοήθη φαινότυπο σε κύτταρα ΟΣ (Zhang 2015).

miR-100: ρυθμίζει το γονίδιο *Cyr61* (Cysteine-rich angiogenic inducer 61), η πρωτεΐνη του οποίου είναι σηματοδοτικός παράγοντας του εξωκυττάριου χώρου και εμπλέκεται στην προσκόλληση, πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, απόπτωση και γήρανση). Αποτελεί πτωχό προβλεπτικό παράγοντα επιβίωσης (Zhang 2015).

miR-101: στοχεύει άμεσα την Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2), που αποτελεί ιστονική ακετυλοτρανσφεράση, και οδηγεί σε αναστολή της μετανάστευσης και της διήθησης των κυττάρων του ΟΣ, κάτι που παρατηρείται από την καταστολή της EZH2 από small interfering RNA (siRNA) (Zhang 2015).

miR-148a: Τα επίπεδά του στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΟΣ είναι ένδειξη επιθετικού φαινότυπου και αποτελούν διαγνωστικό και προγνωστικό βιοδείκτη (Zhang 2015).

miR-133b και miR-206: τα επίπεδα αυτών των miRNA επηρεάζουν την ανάπτυξη και εξέλιξη του ΟΣ. Στο ΟΣ παρατηρείται σημαντική μείωσή τους. Η μείωση αυτή παρατηρείται πιο συχνά σε ασθενείς με όγκους μεγαλύτερης ιστολογικής κακοήθειας, με μεταστατική νόσο, υποτροπή και πτωχή πρόγνωση. Το miR-133b **καταστέλλει** τον πολλαπλασιασμό, την διήθηση και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μέσω μείωσης της έκφρασης του

insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) και της phosphoAkt and focal adhesion kinase (FAK). Η υπερέκφραση του miR-133b διευκολύνει την απόπτωση μέσω υποέκφρασης της αντιαποπτωτικής Bcl2-like 2 (Bcl2l2) και του myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1). Άλλη πιθανή δράση του miR-133b ασκείται μέσω στόχευσης της MET, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διήθηση των κυττάρων του ΟΣ (Zhang 2015).

miR-181a: υπερεκφράζεται σε κυτταρικές σειρές ΟΣ, αυξάνοντας την ικανότητα διήθησης και πολλαπλασιασμού και μειώνοντας την απόπτωση, λόγω υπερέκφρασης της MMP-9 (matrix metalloproteinase) και της bcl-2 και υποέκφρασης των TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinases-3) και p21 (Zhang 2015).

Πίνακας 3: Η επίδραση miRNA σε σηματοδοτικές οδούς στο ΟΣ (Zhang 2015, τροποποιημένο)

mi RNA	**στόχος**	**δράση**
miR-183	Ezrin	αναστολή
miR-34a	mTOR, c-Met, MDM4, Eag1, Notch1	αναστολή
miR-34c	Runx2, Notch1, LEF1	αναστολή
miR-31	E2F2, CDKN2A	αναστολή
miR-223	Hsp90B1	αναστολή
miR-17, miR-128, miR-221	PTEN	ενεργοποίηση
miR-200b	Notch1	αναστολή
miR-133b	IGF1R, Akt, FAK, Bcl2l2, Mcl-1, MET	αναστολή
miR-206	?	αναστολή
miR-101	EZH2, Atg4	αναστολή
miR-202	Gli2	αναστολή
miR-24	LPAATβ	αναστολή
miR-181a	TIMP-3, p21	ενεργοποίηση
miR-27a	MAP2K4	ενεργοποίηση
miR-214	LZTS1	ενεργοποίηση
miR-29b-1	CD133, N-Myc, CCND2, Bcl-2, IAP2	αναστολή
miR-33a	Twist	ενεργοποίηση
miR-215	DTL	ενεργοποίηση
miR-140	HDAC4	ενεργοποίηση
miR-22	HMGB1	αναστολή
miR-155	?	ενεργοποίηση

miR-183: είναι μέλος μιας οικογένειας miRNA (**miR-183**, **miR-182** και **miR-96**), τα οποία κωδικοποιούνται από μια περιοχή 2–4 kb στο χρωμόσωμα 7q32. Προκαλεί υποέκφραση στην πρωτεΐνη **Ezrin**, ένα σημαντικό μέλος της οικογένειας **ezrin-radixin-moesin** (ERM) και παίζει σημαντικό ρόλο στην βιολογία του οστεοσαρκώματος και στην επαγωγή μετάστασης (Muliang Ding 2015). Η **Ezrin** συνδέει την ακτίνη του κυτταροσκελετού και την κυτταρική μεμβράνη και σχετίζεται άμεσα με καρκίνους όπως το χονδροσάρκωμα, το σάρκωμα Ewing και τον καρκίνο πνεύμονα. Η υπερέκφραση **Ezrin** προάγει την διήθηση, μετακίνηση και μετάσταση των κυττάρων ΟΣ, ενώ η αναστολή της **Ezrin** από μικρομοριακούς αναστολείς αναστέλλει την ανάπτυξη ΟΣ. Το miR183 έχει ογκοκατασταλτική δράση, και επομένως η διαταραχή της έκφρασής του φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην επιθετικότητα του ΟΣ (Haikang Cai 2015).

miR-196a και **miR-196b:** είναι **αυξημένα** σε ΟΣ και συσχετίζονται με το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας, την παρουσία μεταστάσεων και την υποτροπή της νόσου. Το miR-196a είναι ένα microRNA που διατηρήθηκε εξελικτικά σε μεγάλο εύρος σπονδυλωτών, διαπιστώθηκε ότι υποεκφράζεται στο ανθρώπινο ΟΣ, ενώ αυξάνεται η πρωτεΐνη-στόχος του, annexin1. Μεταξύ των στόχων του mirR-196a, τα γονίδια Hox, αποτελούν ρυθμιστές της εμβρυογένεσης και η μεταβολή της έκφρασής τους μπορεί να επάγει τόσο την ογκογένεση όσο και την καταστολή του όγκου, ανάλογα με τις συνυπάρχουσες συνθήκες (Zhang 2015, Pazzaglia 2015).

miR-195: εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17p13.1. Ανήκει στην οικογένεια των miR-16/15/195/424/497, η οποία μοιράζεται την ίδια 3’UTR και παρουσιάζει ογκοκατασταλτική δράση. Το miR-195 αναστέλλει την κυτταρική μετανάστευση και την διήθηση μέσω στόχευσης της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (fatty acid synthase), κάτι που θα μπορούσε να έχει και θεραπευτική αξία. Στο οστεοσάρκωμα διαπιστώνεται μείωση του miR-195, η οποία σχετίζεται με τον βαθμό ιστολογικής κακοήθειας και την πιθανότητα μετάστασης. Οι ασθενείς από ΟΣ με χαμηλά επίπεδα miR-195 παρουσίασαν μικρότερη συνολική και ελεύθερης νόσου επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης miR-195. Το κλινικό στάδιο, η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων και τα επίπεδα ορού του miR-195 αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες τόσο για τη συνολική όσο και

για την ελεύθερης νόσου επιβίωση. Η έκφραση του miR-195 στον ορό αποτελεί αξιόπιστο δείκτη για την διάγνωση, την πρόγνωση και την αντιμετώπιση του ΟΣ (Haikang Cai 2015).

miR-202: παρουσιάζει μειωμένη έκφραση στο ανθρώπινο ΟΣ. Η δράση του μειώνει τον πολλαπλασιασμό, προάγει την απόπτωση και μειώνει το μέγεθος του όγκου μέσω στόχευσης του μεταγραφικού παράγοντα Gli2 (Zhang 2015).

miR206: επάγει την απόπτωση και περιορίζει την διήθηση και τη μετανάστευση.

Συμπερασματικά τα **miR133b** και **miR-206** έχουν ισχυρή δράση **κατά** του ΟΣ και θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμα όπλα στη διάγνωση και θεραπεία του ΟΣ (Zhang 2015).

miR-214: προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διήθηση των κυττάρων ΟΣ, μέσω σύνδεσης με την 3'-UTR του mRNA του LZTS1 (leucine zipper putative tumor suppressor 1). Επομένως το miR-214 μπορεί να θεωρηθεί ογκογόνο miRNA στο ΟΣ (Zhang 2015).

Ζ.5. miRNA σχετιζόμενα με το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53

Το *p53* αποτελεί ογκοκατασταλτικό γονίδιο σχετιζόμενο με επιδιόρθωση βλάβης DNA ή προαγωγή της απόπτωσης όταν αυτή η βλάβη δεν μπορεί να επιδιορθωθεί. Διαταραχές του TP53 παρατηρούνται στο σύνολο των ΟΣ (Weiss 2014). Οι μεταλλάξεις του σχετίζονται με την εμφάνιση και εξέλιξη του ΟΣ.

Διάφορα miRNA, όπως τα **miR-34a, miR-34b, miR-34c** και **miR-31** αποτελούν καταρροϊκά συστατικά της δράσης του p53. Αυτά τα miRNA επάγονται από την έκφραση του p53 ως ανταπόκριση σε βλάβη του DNA η σε ογκογόνο ερέθισμα σε διάφορους καρκίνους. Η υπερέκφρασή τους αναστέλλει την αύξηση του όγκου και τη μετάσταση μέσω υποέκφρασης του πρωτοογκογονιδίου *c-Met* (Fujiwara 2014). Επομένως τα miRNA-34 έχουν ογκοκατασταλτική δράση (Poos 2014, Li 2014, Botter 2014, Fujiwara 2014, βλ και «ογκοκατασταλτικά miRNA»), ενώ η απορρύθμισή τους σχετίζεται με την αύξηση του όγκου και τη μετάσταση σε διάφορους καρκίνους στον άνθρωπο.

Στο ΟΣ παρατηρείται μείωση των επιπέδων του miR-34a, λόγω **υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του**. Η σίγαση αυτή σχετίζεται με αυξημένη μεταστατική ικανότητα. Οι αναστολείς του miR-34 διαταράσσουν την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την επαγόμενη από το p53 απόπτωση(Li 2014). Η υπερέκφρασή του miR-34a θα μπορούσε - μέσω στόχευσης του *c-Met* - να δράσει ανασταλτικά στην αύξηση του όγκου και στη μετάσταση (Fujiwara 2014).

Η απώλεια του **miR-31** σχετίζεται με διαταραχή της δράσης του p53 ενώ η υπερέκφραση αναστέλλει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό κυττάρων ΟΣ, μέσω στόχευσης της E2F2 και της CDKN2A, κάτι που υπόσχεται πιθανή θεραπευτική χρήση του στο ΟΣ (Poos 2014).

Τα επίπεδα του **miR34b** στο πλάσμα είναι σημαντικά μειωμένα στο ΟΣ σε σχέση με υγιείς, επίσης είναι μειωμένα σε ασθενείς με μεταστατική νόσο σε σχέση με ασθενείς χωρίς μετάσταση. Δεν παρουσιάστηκε διαφορά στα επίπεδα του miR-34b μεταξύ ασθενών με οστεοβλαστική ή μη οστεοβλαστική νόσο (Fujiwara 2014).

Ζ.6. miRNA σχετιζόμενα με τη σηματοδοτική οδό PI3K/Akt και το PTEN

Η ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού PI3K/Akt προάγει τον πολλαπλασιασμό, την προσκόλληση, την μετακίνηση, τη διήθηση και την μετάσταση του ΟΣ. Η οδός αυτή ελέγχεται από πολλά miRNA και πιθανώς κάποια να εμπλέκονται στο ΟΣ (Zhang 2015). Το PTEN αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του Akt και παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της σηματοδοτικής οδού PI3K/Akt. Κάθε μεταβολή στην έκφραση του PTEN μπορεί να συμβάλλει στην εξέλιξη του ΟΣ (Zhang 2015, Muliang Ding 2015).

- **miR-223**: η έκφραση του miR-223 σε κύτταρα MG-63 (osteoblast like) οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης, διακοπή στη φάση G0/G1 και αυξημένη απόπτωση. Το miR-223 στοχεύει άμεσα την heat shock protein 90B1 (Hsp90B1) και έτσι αναστέλλει τη σηματοδότηση PI3K/Akt/mTOR. Αντίθετη δράση έχει το αποσιωπητικό (silencing) miR-223, το οποίο αυξάνει την έκφραση της HSP90B1 και ακολούθως τα επίπεδα των

πρωτεϊνών του PI3k, p-Akt και mTOR, με συνέπεια αύξηση σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος.

- **miR-125b**: η αποκατάσταση της λειτουργίας του σε κύτταρα σαρκώματος Ewing καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διήθηση, αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο και αυξάνει την απόπτωση. Λειτουργεί ως **ογκοκαταστολέας** μέσω στόχευσης της σηματοδότησης PI3K/Akt. Η χορήγησή του in vivo θα μπορούσε να έχει θεραπευτικό όφελος για ασθενείς με ΟΣ.
- **miR-17:** Το miR-17 αποτελεί ογκογόνο miRNA και είναι συχνά αυξημένο σε κύτταρα και ιστούς ΟΣ. Αποτελεί ισχυρό αναστολέα του PTEN και μέσω αυτού ελέγχει τη σηματοδότηση PI3K/Akt, η οποία ευοδώνει την εξέλιξη του ΟΣ. Υπερέκφραση του miR-17 προάγει την υπερπλασία, μετανάστευση και διήθηση των κυττάρων του ΟΣ.
- **miR128**: Το miR-128 στοχεύει το PTEN. Η αύξησή του προάγει ενώ η καταστολή του (μέσω αντινοηματικού RNA - antisense RNA) μειώνει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων ΟΣ μέσω επίδρασης στο PTEN και καθοδικής ενεργοποίησης/αναστολής της σηματοδότησης AKT. Η υπερέκφραση του miR-128 αύξησε σημαντικά την υπερπλασία των κυττάρων ΟΣ, ενώ η καταστολή του από το αντίστοιχο αντινοηματικό (antisense) RNA μείωσε τον πολλαπλασιασμό τους με μηχανισμό εξαρτώμενο από το PTEN. Σε συμφωνία με τον παραπάνω μηχανισμό η υπερέκφραση ή η απενεργοποίηση (knockdown) του miR128 ενεργοποίησε ή ανέστειλε την ογκογόνο καθοδική σηματοδότηση του Akt αντίστοιχα.
- **miR-221**: Η έκτοπη έκφραση του miR-221 στοχεύει άμεσα το PTEN και ενεργοποιεί την οδό PI3K/Akt, αυξάνοντας την επιβίωση των κυττάρων του ΟΣ. Η εισαγωγή **miR-221 mimic (μιμητικού RNA)** σε κύτταρα ΟΣ ανθρώπου αυξάνει την επιβίωση και την αντίσταση στη χ-θ και μειώνει την απόπτωση μέσω στόχευσης PTEN.

Συνοψίζοντας, το **miR-17**, **miR-128** και **miR-221** προάγουν τον κακοήθη φαινότυπο στο ΟΣ μέσω άμεσης στόχευσης του PTEN και αποτελούν πιθανό θεραπευτικό στόχο στην αντιμετώπιση του ΟΣ. (Zhang 2015).

Ζ.7. miRNA και σηματοδότηση Notch

Η σηματοδοτική οδός Notch εμπλέκεται στην ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Διαταραχή του Notch παρατηρείται σε διάφορους καρκίνους, μεταξύ των οποίων και το ΟΣ.

- **miR-199b-5p inhibitor**: οδηγεί σε αύξηση της σηματοδότησης Notch (Zhang 2015).
- **miR-34a και miR-200b:** η αποκατάσταση των επιπέδων τους μειώνει την σηματοδότηση Notch1, με συνέπεια την αναστολή της αγγειογένεσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διήθησης (Zhang 2015).
- **miR-34c:** τροποποιεί την πολλαπλασιαστική δράση της σηματοδότησης Notch σε δεσμευμένα πρόγονα κύτταρα των οστεοβλαστών και θα μπορούσε να παίζει ρόλο στην παθογένεση του ΟΣ (Zhang 2015).

Η. miRNA και χημειοθεραπεία

Η νεοεπικουρική χημειοθεραπεία (ΧΜΘ, neoadjuvant chemotherapy), όπως η cisplatin, doxorubicin, και methotrexate έχει βελτιώσει σημαντικά την επιβίωση ασθενών με ΟΣ. Ωστόσο η ΧΜΘ μπορεί να οδηγήσει σε **χημειοαντίσταση** και **υποτροπή**, κάτι που καθιστά επιτακτική την βελτίωση της απάντησης στη θεραπεία. Ορισμένα miRNA μπορούν να αυξήσουν την χημειοευαισθησία του ΟΣ.

miR-34c: Το πρόδρομο μόριο του miR-34c αναστέλλει την χημειοαντίσταση των κυττάρων του ΟΣ μέσω άμεσης σύνδεσης με την 3'-UTR του Notch1 και του LEF1 (lymphoid enhancer-binding factor 1) (Zhang 2015).

miR-33a: Το miR-33a παρουσιάζει ανώμαλη αύξηση σε χημειοανθεκτικά σε cisplatin δείγματα ΟΣ και δρα μέσω υποέκφρασης του Twist, (μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας helix-loop-helix (bHLH) (Zhang 2015).

miR-215: υπερέκφραση του miR-215 οδηγεί σε μείωση του denticleless protein homolog (DTL), μια πυρηνική και κεντροσωμική πρωτεΐνη που ρυθμίζεται από τον κυτταρικό

κύκλο, και οδηγεί σε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω G2-arrest, με τελικό αποτέλεσμα την χημειοαντίσταση σε μεθοτρεξάτη και Tomudex (Zhang 2015).

miR-140: καταστέλλει την ιστονική αποακετυλάση 4 (HDAC4) και οδηγεί σε μεγαλύτερη αντοχή στη μεθοτρεξάτη και την 5FU (Zhang 2015).

miR-101: Η **αυτοφαγία** είναι ένας ομοιοστατικός μηχανισμός που εκμεταλλεύεται τις κυτταρικές δομές όπως οργανίδια και πρωτεΐνες για να διατηρήσει το κύτταρο εν ζωή και να αυξήσει την ανθεκτικότητά του σε δυσμενείς συνθήκες. *Η αυτοφαγία έχει προταθεί ως σημαντικός μηχανισμός που ευθύνεται για την ανάπτυξη χημειοαντίστασης στο ΟΣ*. Το μιμητικό miR-101 (miR-101 mimic) μειώνει σημαντικά το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων μέσω υποέκφρασης της πρωτεΐνης autophagy 4 (Atg4) σε κύτταρα ΟΣ, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στη δοξορουβικίνη (Zhang 2015).

miR-22: η υπερέκφρασή του στοχεύει την HMGB1 (high-mobility group box 1) και μετά αναστέλλει την επαγόμενη από HMGB1 αυτοφαγία στα κύτταρα ΟΣ με συνέπεια αύξηση της χημειοευαισθησίας (Zhang 2015).

miR155: αυξημένη έκφραση οδηγεί σε αυτοφαγία και χημειοαντίσταση σε κύτταρα ΟΣ.

Η στόχευση αυτών των miRNAs μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών, οι οποίες θα υπερβούν το εμπόδιο της χημειοανθεκτικότητας στην αντιμετώπιση του ΟΣ (Zhang 2015).

Θ. Επιγενετικός καθορισμός της μεταστατικής ικανότητας στο ΟΣ

Θ.1. Μεθυλίωση του DNA και μετάσταση

Το IRX1 (Iroquois homeobox 1) προάγει την ικανότητα μετάστασης (μετανάστευση, διήθηση, αντίσταση στην ανοικία) μέσω υπερέκφρασης της σηματοδότησης CXCL14/NF-**κ**B [Chemokine (C-X-C motif) ligand 14, γνωστό και ως BRAK].

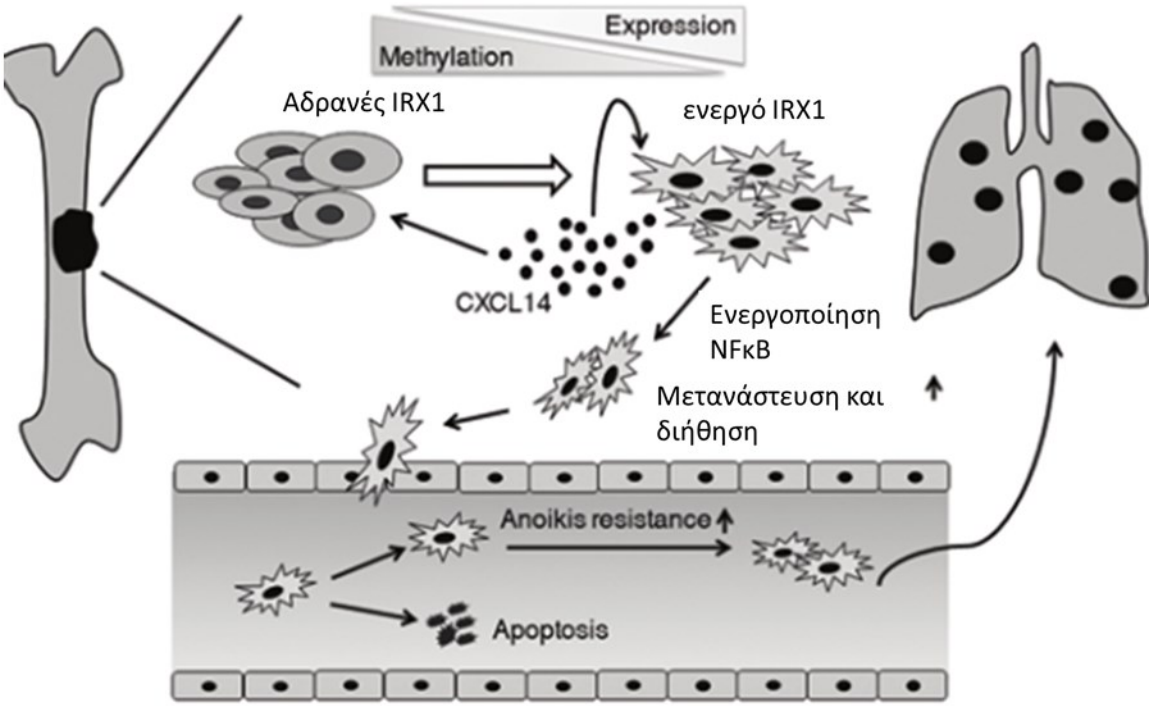
Η **υπομεθυλίωση** του υποκινητή του γονιδίου IRX1 οδηγεί σε υπερέκφρασή του. Η υπομεθυλίωση του IRX1 στο DNA του όγκου που ανιχνεύεται στην κυκλοφορία ασθενών με ΟΣ σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση ασθενών που δεν είχαν πνευμονική μετάσταση.Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το IRX1 είναι γονίδιο που προάγει τη μετάσταση στο ΟΣ, ενώ η υπομεθυλίωση του υποκινητή του μπορεί να αποτελέσει ισχυρό μοριακό δείκτη για πνευμονική μετάσταση.

Η επιγενετική αναστροφή της ενεργοποίησης του IRX1 μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο των πνευμονικών μεταστάσεων στο ΟΣ. Η χορήγηση μεθυλιωτικού παράγοντα οδηγεί σε μεθυλίωση του υποκινητή IRX1 και μειώνει την έκφραση του γονιδίου IRX1, μειώνοντας την ικανότητα μετάστασης και διήθησης κυττάρων οστεοσαρκώματος.

Η υψηλή έκφραση IRX1 είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας πτωχής πρόγνωσης και πνευμονικής μετάστασης (εικόνα 17) (Jinchang Lu 2015).

Θ.2. Ακετυλίωση ιστονών και μετάσταση

Η ακετυλίωση των ιστονών χαλαρώνει τοπικά τη χρωματίνη, επιτρέποντας τη γονιδιακή έκφραση. Οι HDAC έχουν αντίθετη επίδραση, οδηγώντας σε συμπύκνωση της χρωματίνης και μείωση της γονιδιακής έκφρασης. Όμως οι HDAC αλληλεπιδρούν και με άλλους επιγενετικούς τροποποιητές, όπως οι DNA binding proteins και οι methyl-binding proteins επηρεάζοντας και με αυτό τον τρόπο την γονιδιακή έκφραση. Επίσης, οι HDAC αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες όπως η p53 και NF-kB.



Εικόνα 17: Η IRX1 προάγει την μετάσταση του οστεοσαρκώματος. Κατά την εξέλιξη του οστεοσαρκώματος, η υπομεθυλίωση του υποκινητή της οδηγεί σε ενεργοποίηση της IRX1. Η υπερέκφραση του IRX1 οδηγεί σε αυξημένη αυτοκρινή δραστηριότητα του CXCL14 και μέσω ενεργοποίησης NF-κB προάγει την μεταστατική δραστηριότητα (Jinchang Lu 2015).

Η χορήγηση Vorinostat (ανατολέας HDAC) σε κυτταρικές σειρές ΟΣ οδήγησε σε μείωση του πολλαπλασιασμού, μείωση της κινητικότητας και της μεταστατικής ικανότητας (μέσω μείωσης σχηματισμού διηθητικών προσεκβολών - invadopods), μείωσης της σηματοδότησης mTOR (η οποία εμπλέκεται στην ικανότητα χορήγησης μεταστάσεων), ενώ δεν παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας Notch. Επίσης το Vorinostat οδήγησε σε μείωση της ALDH1 (aldehyde dehydrogenase, αντίσταση του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες), αύξηση της LC3 (εμπλέκεται στην αυτοφαγία) και μείωση της PGC1 (οδηγεί σε μείωση του κυτταρικού μεταβολισμού) (Xiaodong 2015). Τα παραπάνω αποτελεούν ισχυρή ένδειξη εμπλοκής της ακετυλίωσης – αποακετυλίωσης των ιστονών στη χορήγηση μεταστάσεων στο ΟΣ.

Θ.3. Επιγενετική ρύθμιση της αντίστασης στην ανοικία

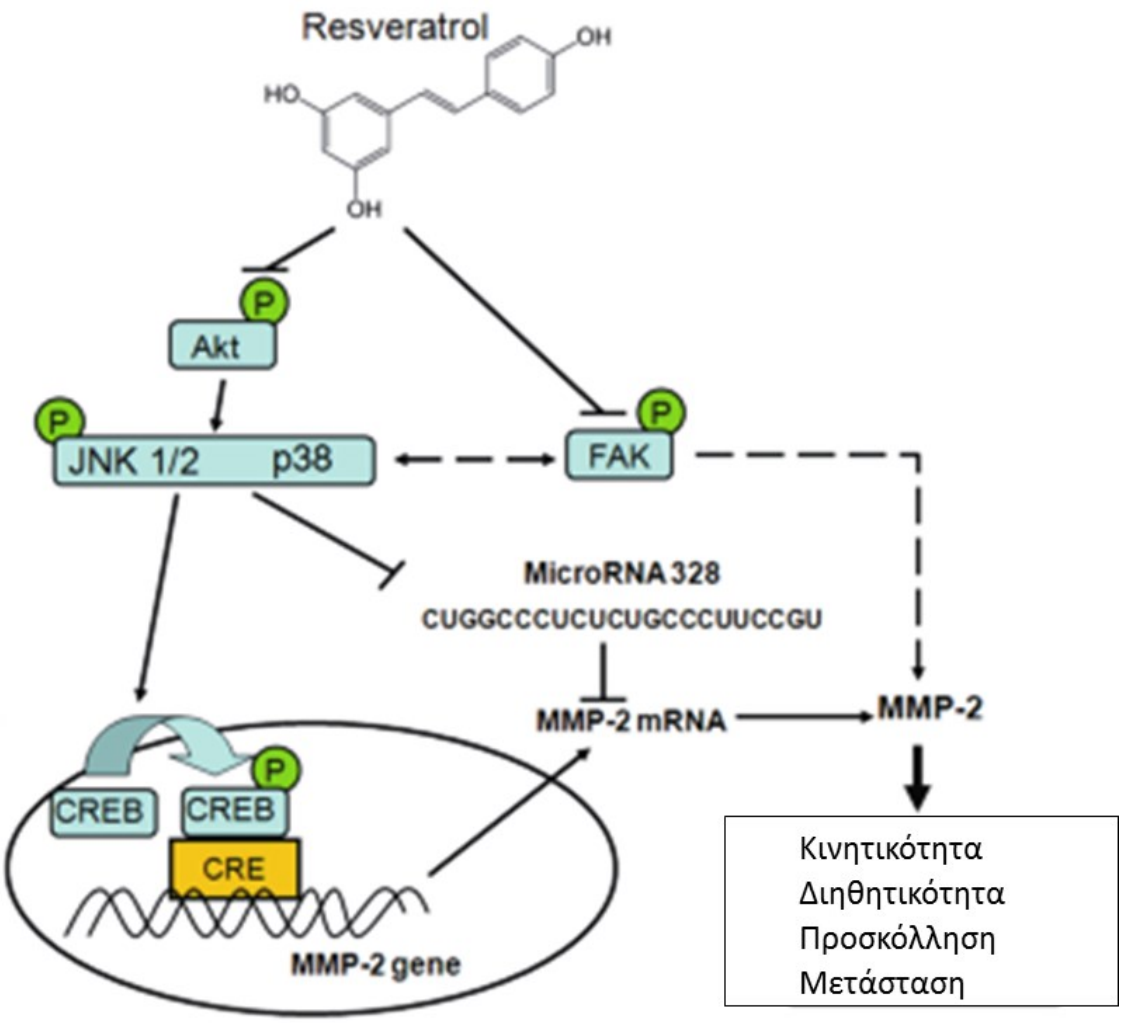
Ως **ανοικία** ορίζεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος συνεπεία αδυναμίας προσκόλλησης στον εξωκυττάριο χώρο. Επιγενετικά φαινόμενα (μεθυλίωση DNA, αποακετυλίωση ιστονών) φαίνεται ότι εμπλέκονται στην **αντίσταση στην ανοικία** ή αλλιώς στην **αύξηση απουσία προσκόλλησης (anchorage independent growth - AI).** Η AI growth επιτυγχάνεται μετά από ενεργοποίηση διάφορων μοριακών μηχανισμών που συνδέονται με την Επιθηλιακή σε Μεσεγχυματική Μετατροπή (epithelial mesenchymal transition – EMT). Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η υπερέκφραση του stem cell factor, της Sox2, του c-Myc, της ß-catenin, της Akt καθώς και ιστονικών αποακετυλασών. Η AI growth ερμηνεύει την υποτροπή της νόσου, ακόμα και μετά από ακρωτηριασμό, λόγω επιβίωσης καρκινικών κυττάρων που εγκαταστάθηκαν νωρίς σε απομακρυσμένες εστίες.

Η AI growth χαρακτηρίζει πιο επιθετικές μορφές καρκινικών κυττάρων και συνοδεύεται από αντίσταση στη χημειοθεραπεία. Η έκθεση σε αναστολείς ιστονικών αποακετυλασών (Vorinostat) και σε αναστολείς μεθυλίωσης DNA (5-aza-C) μειώνει την AI-growth και αυξάνει την ευαισθησία σε δοξορουβικίνη, κάτι που επιβεβαιώνει την επιγενετική βάση της μεταστατικής νόσου (Folley 2015).

Θ.4. miRNA και μετάσταση

Σε προηγούμενο κεφάλαιο έχουν αναφερθεί διάφορα miRNA που ευοδώνουν ή αναστέλλουν τη μετάσταση.

Η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων περιλαμβάνει πολύπλοκες διεργασίες, μεταξύ άλλων μεταβολή στην ικανότητα πρόσδεσης μεταξύ κυττάρων – εξωκυττάριας ουσίας καθώς και μεταβολή στην αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων. Επιπλέον απαιτείται αποδόμηση και διαχωρισμός της εξωκυττάριας ουσίας και συστατικών της βασικής μεμβράνης, η οποία επιτυγχάνεται με συντονισμένη δράση πρωτεϊνασών, όπως οι **μεταλλοπρωτεϊνάσες** της θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteinases, MMPs, ιδιαίτερα οι MMP-2 και 9), **καθεψίνες** και ο **ενεργοποιητής του πλασμινογόνου** (plasminogen activator, PA).



Εικόνα 18: το miR328 στοχεύει το mRNA της MMP2, καταστέλλοντας μεταμεταγραφικά την έκφρασή της, με συνέπεια μείωση της μεταστατικής ικανότητας στο ΟΣ (Shun-Fa Yang 2014). Το διακεκομμένο (– – >) βέλος δείχνει υποθετικές σηματοδοτικές οδούς, το συμπαγές (→) βέλος δείχνει υπάρχουσες σηματοδοτικές οδούς.

Οι MMPs υπερεκφράζονται σχεδόν σε όλους τους καρκίνους όπως και στο ΟΣ και αποτελούν πιθανό στόχο θεραπευτικής παρέμβασης, ενώ η αύξηση της MMP-2 σχετίζεται με το στάδιο T και M (TNM – AJCC, American Joint Commitee on Cancer). Από τις MMPs, οι MMP-2, MMP9, και το αναρροϊκό (upstream) ένζυμο urokinase-PA (u-PA), είναι τα κυριώτερα ένζυμα για την αποδόμηση του κολλαγόνου IV, που αποτελεί το βασικό συστατικό της βασικής μεμβράνης, και εμπλέκονται σημαντικά στην διήθηση και μετάσταση. Γι' αυτό η

αναστολή της μετανάστευσης και της διήθησης μέσω MMP-2, MMP-9, ή u-PA θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο κατά της ανάπτυξης μεταστάσεων (Shun-Fa Yang 2014).

Το **mir-328** στοχεύει και αδρανοποιεί το mRNA της MMP-2. Επομένως τα επίπεδα του miR-328 και της MMP-2 είναι αντιστρόφως ανάλογα. Στο ΟΣ έχει παρατηρηθεί υποέκφραση του miR-328 σε σχέση με το φυσιολογικό οστίτη ιστό, με συνέπεια την υπερέκφραση της MMP-2 και αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης και μετάστασης του ΟΣ. Η αύξηση των επιπέδων του miR-328 θα μπορούσε να έχει θεραπευτική εφαρμογή (εικόνα 18), (Shun-Fa Yang 2014).

Η RESV (Resveratrol) καταστέλλει την μεταστατική ικανότητα στο ΟΣ (Shun-Fa Yang 2014), δρώντας με τους παρακάτω μηχανισμούς:

- μέσω καταστολής της CREB-binding protein (cAMP response element binding protein, έχει δράση ιστονικής ακετυλοτρανσφεράσης, είναι συνενεργοποιητής της RelA – συστατικό του NF-κB) στον υποκινητή της MMP-2 με συνέπεια την αναστολή της μεταγραφής της MMP-2
- μέσω επιγενετικής (λόγω υπερέκφρασης του **miR-328**) αναστολής της MMP-2.

Το γονίδιο του **miR34** παρουσιάζει υπερμεθυλίωση στο ΟΣ και σχετίζεται με την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Muliang Ding 2015).

Η υπερέκφραση του **miR-199a-3p** σε κυτταρικές σειρές ΟΣ μείωσε σημαντικά την κυτταρική αύξηση και μετανάστευση. Επιπλέον το miR-199a-3p καταστέλλει την έκφραση των ογκογόνων και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών mTOR και STAT3. Τα επίπεδα πλάσματος του miR-199a-3p συσχετίζονται με τον ιστολογικό τύπο (Fujiwara 2014). Στο ΟΣ παρατηρείται σημαντική υποέκφραση των **miR-199a-3p**, **miR-1273p** και **miR-376** σε σχέση με τους φυσιολογικούς οστεοβλάστες (Fujiwara 2014).

Η μονοθεραπεία με decitabine σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους επανενεργοποίησε τα **miR-148a, miR-34b/c** και **miR-9**, τα οποία δρουν ανασταλτικά στη χορήγηση μεταστάσεων, κάτι που υποδηλώνει επιγενετικής αιτιολογίας υποέκφρασή τους σε καρκινικά κύτταρα (Li 2014).

Το **miR-143** έχει ογκοκατασταλτική δράση. Σχετίζεται με τη μεταστατική νόσο και τον ιστολογικό υπότυπο και είναι μειωμένο στο ΟΣ. Μεταξύ των γονιδίων στόχων του **miR-143** είναι η MMP13 (matrix metalloprotease-13). Διαμόλυνση κυττάρων με **miR-143** οδηγεί σε σημαντική μείωση της διηθητικής ικανότητας (Fujiwara 2014).

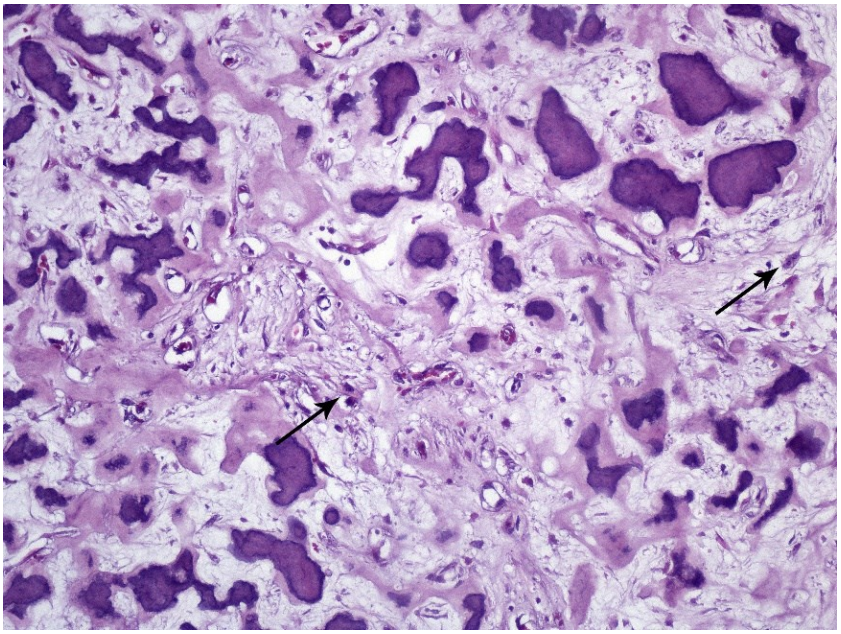
I. Η επιγενετική στην μελλοντική αντιμετώπιση του ΟΣ

I.1. Επιγενετικοί Βιοδείκτες στο ΟΣ: διάγνωση, πρόγνωση, θεραπεία, πρόβλεψη, υποτροπή, μετάσταση

Προγνωστικοί δείκτες στο ΟΣ αποτελούν η **έκταση** της νόσου κατά τη διάγνωση, το **μέγεθος** και η **εντόπιση** του όγκου, ανταπόκριση στη **χημειοθεραπεία**, η αποτελεσματική **χειρουργική** αφαίρεση. Ο **πλήρης χειρουργικός έλεγχος της νόσου** αποτελεί προϋπόθεση αποτελεσματικής αντιμετώπισης και καλής πρόγνωσης της νόσου. Η **έκταση της νέκρωσης** του όγκου μετά από νεοεπικουρική χημειοθεραπεία αποτελεί έναν σημαντικό προγνωστικό παράγοντα, καθότι η 5ετής επιβίωση χημειοευαίσθητων όγκων (>90% νέκρωση) είναι περιπου 80-90%, ενώ η χημειοανθεκτικότητα οδηγεί σε 5ετή επιβίωση περίπου 15% (Tang 2008, εικόνα 19).

Απουσία μεταστάσεων κατά την αρχική διάγνωση οδηγεί σε μακροχρόνια επιβίωση στο 70% των περιπτώσεων, ενώ το υπόλοιπο 30% θα υποτροπιάσει εντός 5ετίας. Η επιβίωση είναι σημαντικά μειωμένη σε ασθενείς με μεταστατική νόσο (25%) ή υποτροπή της νόσου (κάτω από 20%). Οι πνευμονικές μεταστάσεις αποτελούν την πιο κοινή μορφή διασποράς (25%). Η μέση επιβίωση μετά από υποτροπή είναι λιγότερο από 1 έτος. Εφόσον η μετάσταση μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά, η επιβίωση βελτιώνεται (Poos 2014, Xing 2014).

Ωστόσο οι παράγοντες αυτοί είναι **περιγραφικοί**. Η **ανεύρεση μοριακών δεικτών** θα αποτελέσει οπωσδήποτε πιο ασφαλή τρόπο για να τεθεί η πρόγνωση της νόσου και να προβλεφθεί η ανταπόκριση στο θεραπευτικό πρωτόκολλο. Επίσης, μοριακοί δείκτες μπορεί να συμβάλλουν στην πρώιμη, και οπωσδήποτε πριν τη χορήγηση μεταστάσεων, διάγνωση της νόσου (Haikang Cai 2015). Τέλος, μεγάλη πρόκληση στην αντιμετώπιση των ΟΣ είναι ο προσδιορισμός των ασθενών που παρουσιάζουν πτωχή **ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία** καθώς και η **πρώιμη διάγνωση των μεταστατικών εστιών** (Tang 2008, Haikang 2015).



Εικόνα 19: Ιστολογική εικόνα συμβατικού οστεοσαρκώματος μετά από χημειοθεραπευτική αγωγή. Σχηματισμός αγγειοβριθούς ιστού και ελάχιστα βιώσιμα κυτταρικά στοιχεία (βέλη). Χημειοευαίσθητοι όγκοι (>90% νέκρωση) παρουσιάζουν 5ετή επιβίωση 80-90%, ενώ σε χημειοανθεκτικούς όγκους η επιβίωση είναι περίπου 15% (Φωτογραφία: Γ. Αγρογιάννης, 1ο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή - ΕΚΠΑ).

Τα **πρότυπα μεθυλίωσης του DNA** μπορούν να αποτελέσουν προβλεπτικό παράγοντα για την υποτροπή του οστεοσαρκώματος. Ασθενείς με αυξημένη μεθυλίωση του DNA παρουσίασαν σε μεγαλύτερο ποσοστό υποτροπή μετά από θεραπεία (Rosenblum 2015). Τέλος, πειραματικά δεδομένα σε κύτταρα ΟΣ δείχνουν ότι υπερμεθυλίωση στα γονίδια *p16*, *p53*, και *E-cadherin* σχετίζεται με μεγαλύτερο μεταστατικό δυναμικό. Η αδρανοποίηση της *E-*

cadherin αποτελεί σημαντικό βήμα για την επίτευξη μετάστασης, ενώ η απομεθυλίωση του γονιδιώματος μπορεί να δράσει ανασταλτικά στην χορήγηση μεταστάσεων στο ΟΣ (Mu X 2014).

Σημαντικούς προγνωστικούς δείκτες πιθανώς θα αποτελέσουν ειδικά **πρότυπα έκφρασης miRNA** στο ΟΣ, όπως και σε άλλους καρκίνους. Τέσσερα miRNAs (**miR-21, miR-34b, miR-143** και **miR-199-3p**) έχουν αναφερθεί ως πιθανοί βιοδείκτες του ΟΣ.

Το **miR-21** είναι παθολογικά αυξημένο σε διάφορους καρκίνους και έχει σχέση με τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, τη διήθηση και την απόπτωση. Η συγκέντρωση του miR21 στον ορό είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε ασθενείς με ΟΣ σε σύγκριση με υγιείς. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα miR21 σχετίζονται με τη σταδιοποίηση Enneking και την αντίσταση στη χημειοθεραπεία. Το γονίδιο RECK (reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs), είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο που ρυθμίζεται αρνητικά από το miR21 στο ΟΣ. Η αυξημένη έκφραση του miR-21 αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα της συνολικής επιβίωσης και σχετίζεται με τη μεταστατική νόσο και τον ιστολογικό υπότυπο.

Μειωμένα επίπεδα πλάσματος σε ασθενείς με ΟΣ παρουσιάζουν τα **miR-34b** (αναστολή αύξησης και μετάστασης μέσω αναστολής c-myc)**, miR-143** (αναστολή μετάστασης μέσω αναστολής MMP-13) και **miR-199-3p** (αναστολή αύξησης και μετανάστευσης) (Fujiwara 2014).

Η ανακάλυψη ειδικών και ευαίσθητων επιγενετικών βιοδεικτών που μπορούν να αναζητηθούν με ελάχιστα παρεμβατικές μεθόδους σε υγρά του σώματος και θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη διάγνωση σε πρώιμα στάδια, αποτελεί πρόκληση στην σύγχρονη, πριν τη χορήγηση μεταστάσεων θεραπευτική των σαρκωμάτων και του ΟΣ ειδικά. Αυτοί οι βιοδείκτες θα μπορούσαν να είναι προβλεπτικοί για την επιβίωση ή την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (Vrtačnik 2013, Fujiwara 2014, Zhang 2015**).**

I.2. Βασιζόμενη στα miRNA θεραπευτική παρέμβαση στο ΟΣ

Η στόχευση των CSCs (Cancer Stem Cells) ενός όγκου μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του όγκου και να βελτιώσει την επιβίωση του ασθενούς. Τα miRNA παρουσιάζουν σημαντική εμπλοκή στην διατήρηση του φαινότυπου CSC.

Τα miRNA υπόσχονται να αποτελέσουν μια νέα μορφή θεραπείας στο ΟΣ. Η βασιζόμενη στα miRNA θεραπευτική παρέμβαση στο ΟΣ στηρίζεται σε τρεις προσεγγίσεις:

i. Αναστολή **ογκογόνων** miRNA μέσω αντινοηματικών RNA (antisense RNA, anti-miR). Τα αντινοηματικά ολιγονουκλεοτίδια είναι μόρια απλής έλικας, τα οποία συνδέονται συμπληρωματικά με τα miRNA και αναστέλλουν τη λειτουργία τους.
ii. Αποκατάσταση της έκφρασης **ογκοκατασταλτικών** miRNA, μέσω χορήγησης πρόδρομων miRNA ή μιμητικών miRNA (miRNA mimics). Τα πρόδρομα miRNA μετατρέπονται μετά την χορήγησή τους σε miRNAs. Τα μιμητικά miRNA είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, όμοια με τα επιλεγμένα miRNAs.
iii. Αποκατάσταση των διαταραγμένων **προτύπων έκφρασης** miRNA στο ΟΣ: τέτοια δράση έχουν δείξει το Diallyl trisulfide (DATS), το propophol (γενικό αναισθητικό), η βουσουλφάνη. Η DATS αυτή αυξάνει την έκφραση διαφόρων ογκοκατασταλτικών miRNA, όπως miR-34a, miR-143, miR-145 και miR-200b/c, τα οποία έχουν σιωπήσει σε ιστούς ΟΣ, καταστέλλοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό, τη διήθηση και την αγγειογένεση. Η προποφόλη αυξάνει τα επίπεδα του miR-143 με συνέπεια μείωση της MMP-13, αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διήθησης και επαγωγή απόπτωσης (Zhang 2015).

Ιδανικά, η αποκάλυψη όλων των miRNA που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ΟΣ θα επιτρέψει την ανάλογη θεραπευτική παρέμβαση με τα ανάλογα αντινοηματικά miRNA (antisense) ή μιμητικά RNA (RNA mimics) (Botter 2014).

Ι.3. Θεραπεία διαφοροποίησης στο ΟΣ

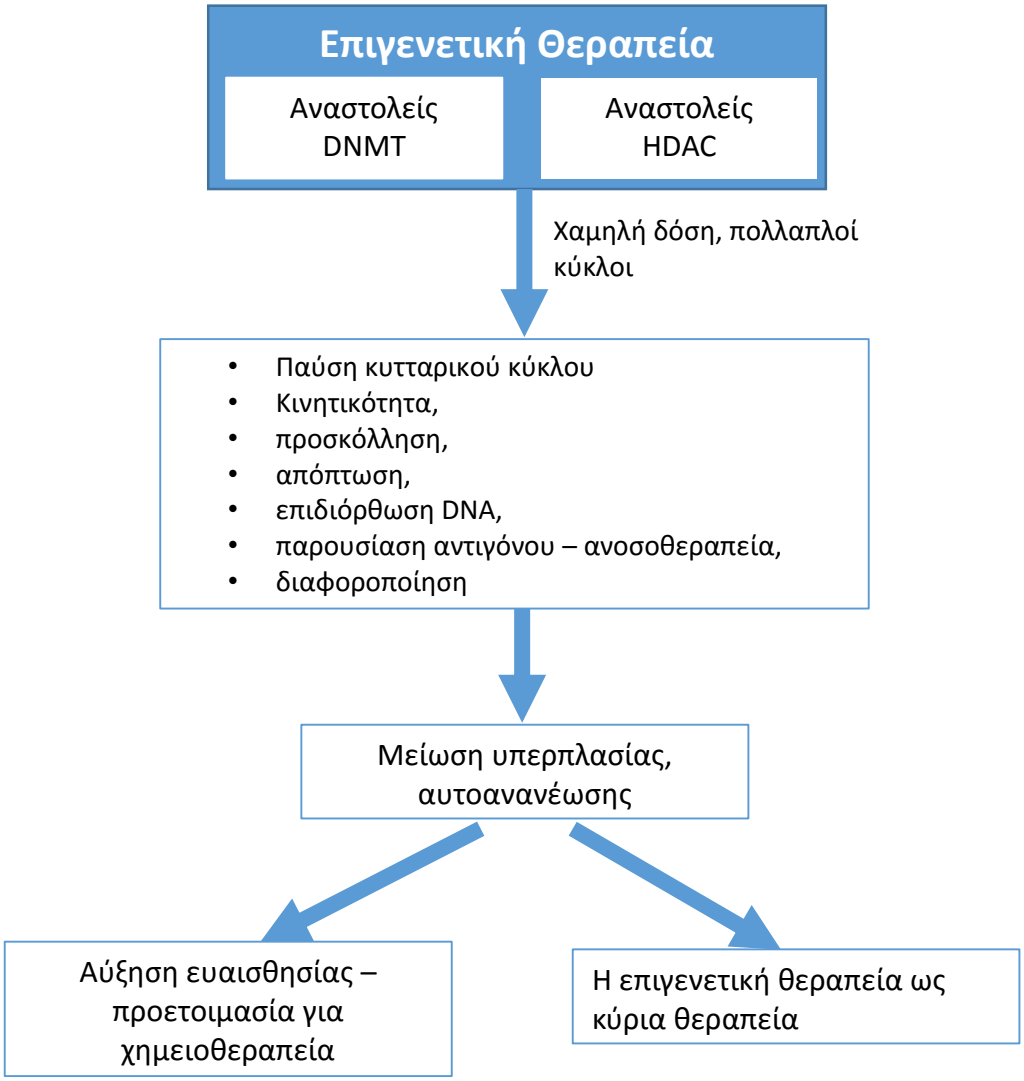
Η σύγχρονη αντιμετώπιση του ΟΣ περιλαμβάνει **χειρουργική εκτομή σε υγιή όρια**, σε συνδυασμό με **προ- και μετεγχειρητική χημειοθεραπεία** (doxorubicin, cisplatin, ifosfamide, methotrexate). Η τελευταία αποβλέπει στην αναστολή του πολλαπλασιασμού του όγκου (Tang 2008, Weiss 2014).

Ωστόσο η συμβατική θεραπεία μάλλον έχει φτάσει στο όριο της απόδοσής της, μια και η επιβίωση των ασθενών έχει καταλήξει σε μια ανυπέρβλητη οροφή (Poos 2014, Li 2014, Allison 2012), ενώ η υποτροπή και/η μεταστατική νόσος ΟΣ είναι πιο επιθετική και συνήθως είναι ανθεκτική στις συμβατικές θεραπείες (Tang 2008, Allison 2012).

Αυτό οφείλεται στο ότι οι κλινικο-ιστολογικοί παράγοντες αποτελούν μέχρι σήμερα τα βασικά στοιχεία που καθορίζουν τις θεραπευτικές επιλογές στο ΟΣ. Ως εκ τούτου, όλοι οι ασθενείς με ΟΣ θα λάβουν χημειοθεραπευτικά σχήματα *άσχετα* από κάποια *ιδιαίτερα* χαρακτηριστικά του όγκου, λόγω ακριβώς του λόγου ότι αυτά δεν έχουν ακόμα σαφώς προσδιοριστεί (Poos 2014). Χαρακτηριστικό των συμβατικών θεραπειών είναι το ότι **δεν** λαμβάνουν υπόψιν τη **διαταραχή διαφοροποίησης,** η οποία αποτελεί ουσιαστικό χαρακτηριστικό των μεσεγχυματογενών κακοηθειών (Tang 2008) και – όπως και η φυσιολογική διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων – σχετίζεται με επιγενετικά φαινόμενα. Εξάλλου, αδυναμία εξάλειψης των (αδιαφοροποίητων) **αρχέγονων** κυττάρων πιθανώς ευθύνεται για την υποτροπή του όγκου, ενώ υπερμεθυλιωμένα γονίδια και miRNAs σχετίζονται με μετάσταση και χημειοαντίσταση (Thomas 2006).

Η αποκάλυψη των μοριακών σηματοδοτικών οδών που ελέγχουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, καθώς και των μηχανισμών που συντονίζουν την ενεργοποίησή τους, είναι σημαντική για την κατανόηση της φυσιολογικής οστεογένεσης και της παθογένειας του ΟΣ και μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καινοτόμων **θεραπειών** (Thomas 2006, Tang 2008, Mills 2011), ενώ, η διαπίστωση γονιδίων και γονιδιακών προϊόντων, τα οποία σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου, όπως π.χ. τα miRNA, θα μπορούσαν να αποτελέσουν **βιοδείκτες** της νόσου, χρήσιμες στη διάγνωση, πρόγνωση, πρόβλεψη, παρακολούθηση της

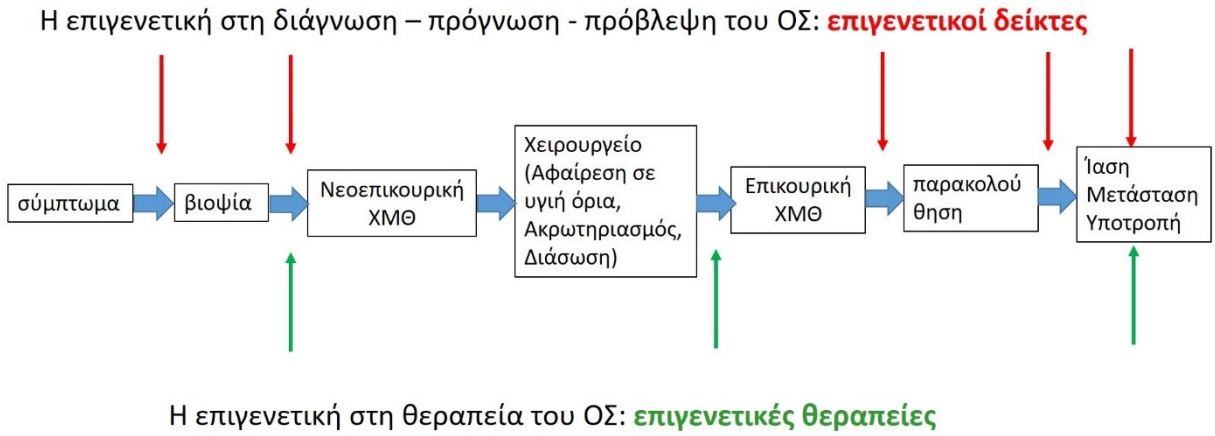
αποτελεσματικότητας της θεραπείας, πρώιμη διάγνωση της μετάστασης ή της υποτροπής μετά από θεραπεία (Poos 2014).



Εικόνα 20: Είδη επιγενετικών θεραπειών και πιθανή επίδραση στα χαρακτηριστικά του καρκίνου. Πολλαπλοί κύκλοι με χαμηλές δόσεις επιγενετικά δρώντων φαρμάκων μπορούν να αποκαταστήσουν τη λειτουργία γονιδίων που σχετίζονται με την γένεση και εξέλιξη του καρκίνου και έχουν υποστεί σίγαση ή υπερέκφραση συνεπεία επιγενετικής τροποποίησης. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με διαταραχές του κυτταρικού κύκλου, την κινητικότητα και προσκόλληση των κυττάρων, την απόπτωση, τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, τη διαφοροποίηση, την παρουσίαση αντιγόνου κα. Η επιγενετική θεραπεία μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία του όγκου στην συμβατική χημειοθεραπεία ή να αποτελέσει κύρια θεραπεία (Ahuja 2014).

Οι σηματοδοτικές οδοί που ευθύνονται για την γένεση και εξέλιξη ενός όγκου αποτελούν αντικείμενο των **στοχευμένων θεραπειών**. Οι **επιγενετικές θεραπείες** στοχεύουν **πρωιμότερο** επίπεδο της ογκογένεσης, δηλαδή *πριν* επιγενετικά φαινόμενα ενεργοποιήσουν ή αποσυντονίσουν αυτές τις ογκογόνες σηματοδοτικές οδούς και οδηγήσουν σε παθολογική οστεογενετική διαφοροποίηση.

Η αποτελεσματικότητα της επιγενετικής θεραπείας στηρίζεται στην **επανενεργοποίηση γονιδίων που έχουν σιγήσει**. Θεραπευτικά σχήματα που βασίζονται στην αναστολή των DNMT και HDAC (εικόνα 20) μπορούν να επάγουν την επαναδιαφοροποίηση των κυττάρων του ΟΣ προς την κατεύθυνση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης (Tang 2008, Capobianco 2014) και πιθανώς να καταστείλουν τον καρκινικό φαινότυπο (Weiss 2014). Επιπλέον, η επιγενετική θεραπεία με απομεθυλιωτικούς παράγοντες μπορεί να προκαλέσει υπερέκφραση σε αντιγόνα του όγκου και να συνδυαστεί με ανοσοθεραπεία (εμβόλια) (Botter 2014, Krishnadas 2014, Li 2014).



Εικόνα 21: η πορεία διάγνωσης και συμβατικής αντιμετώπισης του ΟΣ και η χρησιμότητα της επιγενετικής, διαγνωστικά – προγνωστικά – προβλεπτικά (επιγενετικοί δείκτες, κόκκινα βέλη), όσο και θεραπευτικά (επιγενετικές θεραπείες, πράσινα βέλη) (Fujiwara 2014, τροποποιημένο).

Η χρήση επιγενετικών παραγόντων ως μονοθεραπεία σε συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένου του ΟΣ, δεν ήταν ιδιαίτερα επιτυχής. Ωστόσο μια συνδυασμένη θεραπευτική προσέγγιση, η οποία θα στοχεύει τόσο τον *πολλαπλασιασμό* αλλά και την

διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων θα μπορούσε να είναι περισσότερο αποτελεσματική (Li 2014) και θα είχε μικρότερη πιθανότητα να οδηγήσει σε κλωνική επιλογή φαινοτύπων καρκινικών κυττάρων ανθεκτικών σε **χημειοθεραπεία** (multidrug restistant – MDR, Tang 2008), **ακτινοθεραπεία** (Li 2014) ή **ανοικία** (Folley 2015). Η επιγενετική θεραπεία μπορεί να αντιστρέψει την αντίσταση στη χημειοθεραπεία, που αποτελεί ένα από τα αδιέξοδα της συμβατικής αντιμετώπισης των όγκων και των σαρκωμάτων ειδικότερα. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι η αντοχή στη cisplatin η οποία χρησιμοποιείται συχνά στην χημειοθεραπεία του ΟΣ, οφείλεται σε επιγενετική διαταραχή έκφρασης miRNA (Li 2014).

Βασιζόμενοι στο γεγονός ότι οι γενετικές και επιγενετικές διαδικασίες κινητοποιούν συνεργιστικά την ογκογένεση, είναι σημαντικό να διαπιστωθεί η **χρονική στιγμή** αυτής της συνέργειας. Η ανώμαλη μεθυλίωση μπορεί να παρουσιαστεί *νωρίς* στην διαδικασία της καρκινογένεσης και να προκαλέσει τις περισσότερες από τις σημαντικές διαταραχές, όπως ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, διαταραχή της λειτουργίας μεταγραφικών παραγόντων και υποδοχέων, διαταραχή αλληλεπίδρασης μεταξύ κυττάρων και μεταξύ κυττάρων- στρώματος, αδρανοποίηση σηματοδοτικών οδών, διαταραχή απόπτωσης και γενετική αστάθεια. Η συσσώρευση επιγενετικών και γενετικών τροποποιήσεων μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη φαρμακοανθεκτικών φαινοτύπων (Capobianco 2014).

Στην εικόνα 21 απεικονίζεται η πορεία του ΟΣ από τη διάγνωση έως τη μετάσταση, καθώς και η θέση της διάγνωσης και της συμβατικής θεραπευτικής παρέμβασης. Η γνώση των επιγενετικών τροποποιήσεων μπορεί να έχει θέση τόσο στη **διάγνωση** (διαγνωστικοί επιγενετικοί δείκτες, κόκκινα βέλη), όσο και στη **θεραπεία** (επιγενετική θεραπεία).

ΙΑ. Περίληψη

Το οστεοσάρκωμα αποτελεί τον πρώτο σε συχνότητα κακοήθη όγκο των οστών στην παιδική και εφηβική ηλικία. Η συμβατική αντιμετώπισή του περιλαμβάνει την χρήση χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας προ- και μετά μιας ενδελεχούς και επίπονης σε υγιή όρια χειρουργικής εκτομής του πρωτοπαθούς όγκου. Ωστόσο, και παρά τις προόδους στους παραπάνω τομείς, η επιβίωση των πασχόντων έχει εδώ και τουλάχιστον τρεις δεκαετίες καταλήξει σε μια οροφή: Η 5ετής επιβίωση ασθενών χωρίς μετάσταση είναι γύρω στο 70%, ενώ η παρουσία μεταστατικής νόσου ή υποτροπής οδηγεί σε κατακόρυφη πτώση της επιβίωσης στα επίπεδα του 20%. Είναι επομένως επιτακτική η ανεύρεση πρόσθετων θεραπευτικών μέσων. Η αναγνώριση της διαταραχής της οστεογενετικής διαφοροποίησης ως βάσης της οστεοσαρκωματογένεσης αποτελεί σταθμό στην κατανόηση της παθογένειας του οστεοσαρκώματος. Η φυσιολογική οστεογενετική διαφοροποίηση, απαιτεί τη συντονισμένη ενεργοποίηση και αναστολή διαφόρων σηματοδοτικών οδών, όπως η Wnt, PI3/Akt κλπ. *Κορυφαία θέση στον έλεγχο της διαδικασίας αυτής κατέχουν οι επιγενετικές τροποποιήσεις, δηλαδή οι τροποποιήσεις της γονιδιακής έκφρασης, χωρίς αλλαγή της αλληλουχίας του DNA*. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, τις ιστονικές τροποποιήσεις και τη μεταμεταγραφική μέσω microRNA αναστολή, ενώ ελέγχουν και άλλα βασικά χαρακτηριστικά του όγκου, όπως είναι η επιθετικότητα, η αντίσταση στη χημειοθεραπεία και η μεταστατική ικανότητα. Ειδικές για κάθε όγκο επιγενετικές τροποποιήσεις - είτε στο ιστολογικό παρασκεύασμα, είτε στην κυκλοφορία του αίματος – μπορεί να αποτελέσουν βιολογικούς δείκτες του συγκεκριμένου όγκου, χρήσιμους για τη διάγνωση, πρόγνωση, πρόβλεψη, παρακολούθηση της θεραπείας και διάγνωση υποτροπής. Τα αυξημένα επίπεδα του miR-21 και τα μειωμένα επίπεδα των miR-34b, miR-143 και miR-199-3p στο πλάσμα πασχόντων αποτελούν τέτοιους πιθανούς επιγενετικούς βιοδείκτες του οστεοσαρκώματος. Επιγενετικά δρώντα φάρμακα, δηλαδή φάρμακα που αντιστρέφουν παθολογικά ή μιμούνται φυσιολογικά επιγενετικά φαινόμενα, αποσκοπούν στην αποκατάσταση της φυσιολογικής οστεογενετικής διαφοροποίησης των κυττάρων του οστεοσαρκώματος και πιθανώς να αποτελέσουν συμπλήρωμα ή βασικό συστατικό μελλοντικών αντινεοπλασματικών θεραπειών.

IB. Abstract

Osteosarcoma is the most frequent primary bone tumor in children and adolescents. Conventional multidiscipline treatment consists of a combination of chemo- and/or radiation therapy pre- and after meticulous disease free surgical resection of the primary tumor. Nevertheless, progress of the survival rate of the patients stagnates for more than 30 years, with 5 year survival reaching a ceiling of 70% in nonmetastatic cases, faltering to approximately 20% in case of metastasis or recurrency. Consequently, there is urgent need for novel therapeutic strategies. Loss of osteogenic differentiation, recently attributed to osteosarcoma cells, grants insight into the pathogenic processes underlying malignant transformation of osteosarcoma. Normal osteogenic differentiation relies on the coordinated activation and silencing of various signalling pathways and genes, such as Wnt, PI3/Akt ect. Epigenetic control is of seminal importance over these processes. Furthermore, deadends of cancer, such as metastasis and chemoresistance, also rely to a major extent on epigenetic modifications acquired by cancer cells during cancer development. Epigenetic events consist of DNA methylation, posttranslational histone modifications and microRNA mediated posttranscriptional silencing. Ongoing research concentrates on the identification of diagnostic, prognostic and predictive epigenetic markers for osteosarcoma, either in the tumor specimen or preferably in the circulating blood of the patient. These markers may also be useful in monitoring antitumor treatment and for the early diagnosis of recurrent disease. Increased plasma levels of miR-21 and decreased plasma levels of miR-34b, miR-143 and miR-199-3p are such potential epigenetic biomarkers of osteosarcoma. Moreover, epigenetic drugs, i.e. drugs able to reverse pathologic or mimic missing epigenetic modifications of osteosarcoma cells and thereby to restore normal osteogenic differentiation, are promising supplements or essential constituents of future osteosarcoma treatment.

ΙΓ. Βιβλιογραφία

1. Ahuja Nita, Easwaran Hariharan, Baylin Stephen B: Harnessing the potential of epigenetic therapy to target solid tumors. J Clin Invest. 2014;124(1):56–63. doi:10.1172/JCI69736).
2. Allison Daniel C., Carney Scott C., Ahlmann Elke R., Hendifar Andrew, Chawla Sant, Fedenko Alex, Angeles Constance, Menendez Lawrence R.: A Meta-Analysis of Osteosarcoma Outcomes in the Modern Medical Era. Hindawi Publishing Corporation, Sarcoma, Volume 2012, Article ID 704872, 10 pages, doi:10.1155/2012/704872.
3. Baker Emma K., Taylor Scott, Gupte Ankita, Chalk Alistair M., Bhattacharya Shreya, Green Alanna C., T.John Martin, Strbenac Dario, Robinson Mark D., Purton Louise E., Walkley Carl R.: Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) is a marker of osteoblastic differentiation stage and is not silenced by DNA methylation in osteosarcoma. Bone 73 (2015) 223–232, http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.12.063.
4. Basu-Roy Upal, Basilico Claudio, Mansukhani Alka: Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma. Cancer Letters 338 (2013) 158–167.
5. Bennani-Baiti IM et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1A/AOF2/BHC110) is expressed and is an epigenetic drug target in chondrosarcoma, Ewing's sarcoma, osteosarcoma, and rhabdomyosarcoma. Hum Pathol. 2012;43(8):1300–7.
6. Bin Zhao, Li Li, Qunying Lei, Kun-Liang Guan: The Hippo–YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. Genes & Development 24:862–874, 2010, Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 0890-9369/10; www.genesdev.org
7. Botter Sander M, Neri Dario, Fuchs Bruno: Recent advances in osteosarcoma. Current Opinion in Pharmacology, Volume 16, 2014, 15 – 23. http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2014.02.002
8. Capobianco Enrico, Mora Antonio, La Sala Dario, Roberti Annalisa, Zaki Nazar, Taranta Monia, Cinti Caterina, Badidi Elarbi: Separate and Combined Effects of DNMT and HDAC Inhibitors in Treating Human MultiDrug Resistant Osteosarcoma HosDXR150 Cell Line. PLoS ONE, 2014, vol. 9(4): e95596. doi:10.1371/journal.pone.0095596.
9. Chen Xiang, Armita Bahrami, Alberto Pappo, John Easton, James Dalton, Erin Hedlund, David Ellison, Sheila Shurtleff, Gang Wu, Lei Wei, Matthew Parker, Michael Rusch, Panduka Nagahawatti, Jianrong Wu, Shenghua Mao, Kristy Boggs, Heather Mulder, Donald Yergeau, Charles Lu, Li Ding, Michael Edmonson, Chunxu Qu, Jianmin Wang, Yongjin Li, Fariba Navid, Najat Daw, Elaine R. Mardis, Richard K. Wilson, James R. Downing, Jinghui Zhang, Michael A.

Dyer: Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. Cell Rep. 2014;7(1): 104–12).

10. Chou AJ, Gorlick R. Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. Expert Rev Anticancer Ther. 2006;6(7):1075–85.
11. DeVita Vincent T. Jr, Lawrence Theodore S., Rosenberg Steven A.. Cancer: Principles & Practice of Oncology, 2011, 10th edition, Ch 91: Sarcomas of Bone. Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 978-1-4511-9294-0.
12. .DeVita Vincent T. Jr, Lawrence Theodore S., Rosenberg Steven A.. Primer of the Molecular Biology of Cancer. 2011, Ch 3, Epigenetics of Cancer. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, ISBN-13: 978-1451118971, σελ 49-57
13. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. Molecular Cancer Research, Oct;5(10):981-9 (2007).
14. Enders GH: Wnt therapy for bone loss: golden goose or Trojan horse? J Clin Invest. 2009 Apr;119(4):758-60.
15. Esteller: Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. Nature Reviews / Genetics, Volume 8, April 2007, 286-298, www.nature.com/reviews/genetics
16. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F, editors. Lyon: IARC Press; 2013. World Health Organization, classification of tumours: Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone.
17. Foley Jessica M., Scholten Donald J II, Monks Noel R, Cherba David, Monsma David J, Dylewski Dawna, Dykema Karl, Winn Mary E, Steensma Matthew R: Anoikis-resistant subpopulations of human osteosarcoma display significant chemoresistance and are sensitive to targeted epigenetic therapies predicted by expression profiling. Journal of Translational Medicine (2015) 13:110, DOI 10.1186/s12967-015-0466-4.
18. Fujiwara Tomohiro et al: Circulating MicroRNAs in Sarcoma: Potential Biomarkers for Diagnosis and Targets for Therapy. Chemotherapy 2014, 3:1, http://dx.doi.org/10.4172/2167-7700.1000123.
19. Gharanei S: RASSF2 methylation is a strong prognostic marker in younger age patients with Ewing sarcoma. Epigenetics. 2013 Sep;8(9):893-8. doi: 10.4161/epi.25617. Epub 2013 Jul 18.
20. Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW, Ghivizzani SC, Ignatova TN, Steindler DA.: Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. Neoplasia. 2005 Nov;7(11):967-76.

21. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. Nature Reviews Genetics, 13, 343-357 (2012).
22. Haikang Cai, Hui Zhao, Jie Tang, Haishan Wu: Serum miR-195 is a diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma. Journal of surgical research 194 (2015) 505 - 510. http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2014.02.002.
23. Jinchang Lu, Guohui Song, Qinglian Tang, Changye Zou, Feng Han, Zhiqiang Zhao, Bicheng Yong, Junqiang Yin, Huaiyuan Xu, Xianbiao Xie, Tiebang Kang, YingLee Lam, Huiling Yang, Jingnan Shen, and Jin Wang: RX: hypomethylation promotes osteosarcoma metastasis via induction of CXCL14/NF-κB signaling. The Journal of Clinical Investigation, J Clin Invest. 2015;125(5):1839–1856.http://dx.doi.org/10.1172/JCI78437.
24. Jones Peter A., Liang Gangning: Rethinking how DNA Methylation Patterns are Maintained. Nat Rev Genet. 2009 November; 10(11): 805–811. doi:10.1038/nrg2651
25. Kansara Maya et al: Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice. J Clin Invest. 2009;119(4):837–851. doi:10.1172/JCI37175.
26. Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. Nat Biotechnol. 2010 Oct;28(10):1069-78. doi: 10.1038/nbt.1678.
27. Kresse SH, Ohnstad HO, Paulsen EB, Bjerkehagen B, Szuhai K, Serra M, Schaefer KL, Myklebost O, Meza-Zepeda LA LSAMP, a novel candidate tumor suppressor gene in human osteosarcomas, identified by array comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer. 2009 Aug;48(8):679-93. doi: 10.1002/gcc.20675.
28. Kresse SH, Rydbeck H, Skårn M, Namløs HM, Barragan-Polania AH, Cleton-Jansen AM, Serra M, Liestøl K, Hogendoorn PC, Hovig E, Myklebost O, Meza-Zepeda LA: Integrative analysis reveals relationships of genetic and epigenetic alterations in osteosarcoma. PLoS One. 2012;7(11):e48262. doi: 10.1371/journal.pone.0048262. Epub 2012 Nov 7.
29. Krishnadas DK, Bao L, Bai F, Chencheri SC, Lucas K.: Decitabine facilitates immune recognition of sarcoma cells by upregulating CT antigens, MHC molecules, and ICAM-1. Tumour Biol. 2014 Jun;35(6):5753-62. doi: 10.1007/s13277-014-1764-9. Epub 2014 Mar 2.
30. Kuijjer Marieke L., Hogendoorn Pancras C.W., Cleton-Jansen Anne-Marie: Genome-wide analyses on high-grade osteosarcoma: Making sense of a genomically most unstable tumor (Review), International Journal of Cancer, Volume 133, Issue 11, 1 December 2013, Pages 2512-2521. 10.1002/ijc.28124.

31. Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. Bioessays, August 20(8):615-26 (1998)
32. Lamar John M., Stern Patrick, Liu Hui, Schindler Jeffrey W., Jiang Zhi-Gang, Hynes Richard O.: The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. PNAS, Published online August 13, 2012, E2441–E2450, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1212021109
33. Li Binghao, Ye Zhaoming: Epigenetic alterations in osteosarcoma: promising targets. Mol Biol Rep. 2014 May;41(5):3303-15. doi: 10.1007/s11033-014-3193-7. Epub 2014 Feb 6.
34. Lister R. et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature 462, 315-322 (2009)
35. Man Yu, Yanfang Wan, Qinghua Zou: Reduced mitochondrial DNA copy number in Chinese patients with osteosarcoma. Translational Research 2013;161:165–171, Man Yu, Yanfang Wan, Qinghua Zou: Somatic mitochondrial DNA mutations in Chinese patients with osteosarcoma. Int. J. Exp. Path. (2013), 94, 126–132.
36. Mills Joslyn, Hricik Todd, Siddiqi Sara, Matushansky Igor: Chromatin structure predicts epigenetic therapy responsiveness in sarcoma. Mol Cancer Ther. 2011 February; 10(2): 313–324. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0724.
37. Mortus JR, Zhang Y, Hughes DP.: Developmental pathways hijacked by osteosarcoma. Adv Exp Med Biol. 2014;804:93-118. doi: 10.1007/978-3-319-04843-7_5.
38. Mu X, Sultankulov B, Agarwal R, Mahjoub A, Schott T, Greco N, Huard J, Weiss K.: Chick embryo extract demethylates tumor suppressor genes in osteosarcoma cells. Clin Orthop Relat Res. 2014 Mar;472(3):865-73. doi: 10.1007/s11999-013-3104-6.
39. Muliang Ding et al: Demethylation of microRNA-142 induced by demethylation agents plays a suppressive role in osteosarcoma cells. Oncol Lett. 2015 May; 9(5): 2261–2267. Published online 2015 Mar 13. doi: 10.3892/ol.2015.3036 PMCID: PMC4467365.
40. Pazzaglia Laura et al: miR-196a expression in human and canine osteosarcomas: A comparative study. Research in Veterinary Science 99 (2015) 112–119.
41. Poos Kathrin, Smida Jan, Nathrat Michaela, Maugg Doris, Baumhoer Daniel, Neumann Anna, Korsching Eberhard: Structuring osteosarcoma knowledge: an osteosarcoma-gene association database based on literature mining and manual annotation. Database (2014) 2014 : bau042, doi: 10.1093/database/bau042.

42. Rao-Bindal Krithi, Kleinerman Eugenie S.: Epigenetic Regulation of Apoptosis and Cell Cycle in Osteosarcoma. Hindawi Publishing Corporation, Sarcoma, Volume 2011, Article ID 679457, 5 pages, doi:10.1155/2011/679457.
43. Rosenblum Jeremy M, Wijetunga N Ari, Fazzari Melissa J, Krailo Mark, Barkauskas Donald A, Gorlick Richard, Greally John M: Predictive properties of DNA methylation patterns in primary tumor samples for osteosarcoma relapse status. Epigenetics, Volume 10, Issue 1, 2015 pages 31-39.
44. Sadikovic B, Thorner P, Chilton-Macneill S, Martin JW, Cervigne NK, Squire J, Zielenska M. Expression analysis of genes associated with human osteosarcoma tumors shows correlation of RUNX2 overexpression with poor response to chemotherapy. BMC Cancer. 2010 May 13;10:202. doi: 10.1186/1471-2407-10-202.
45. Sadikovic B, Yoshimoto M, Al-Romaih K, Maire G, Zielenska M, Squire JA. In vitro analysis of integrated global high-resolution DNA methylation profiling with genomic imbalance and gene expression in osteosarcoma. PLoS ONE. 2008; 3:e2834. [PubMed: 18698372].
46. Sarver Aaron L, Thayanithy Venugopal, Scott Milcah C, Cleton-Jansen Anne-Marie, Hogendoorn Pancras CW, Modiano Jaime F, Subramanian Subbaya: MicroRNAs at the human 14q32 locus have prognostic significance in osteosarcoma. Orphanet Journal of Rare Diseases 2013, 8:7 doi:10.1186/1750-1172-8-7.
47. Scott MC, Sarver AL, Gavin KJ, Thayanithy V, Getzy DM, Newman RA, Cutter GR, Lindblad-Toh K, Kisseberth WC, Hunter LE, Subramanian S, Breen M, Modiano JF.: Molecular subtypes of osteosarcoma identified by reducing tumor heterogeneity through an interspecies comparative approach. Bone. 2011 Sep;49(3):356-67. doi: 10.1016/j.bone.2011.05.008. Epub 2011 May 15.
48. Shun-Fa Yang, Wei-Jiunn Lee, Peng Tan, Chih-Hsin Tang,Michael Hsiao, Feng-Koo Hsieh, Ming-Hsien Chien: Upregulation of miR-328 and inhibition of CREB-DNA-binding activity are critical for resveratrol-mediated suppression of matrix metalloproteinase-2 and subsequent metastatic ability in human osteosarcomas. Oncotarget, 2014, Vol. 6, No.5, 2736-2753, www.impactjournals.com/oncotarget.
49. Siddiqi S, Mills J, Matushansky I (2010) Epigenetic remodeling of chromatin architecture: exploring tumor differentiation therapies in mesenchymal stem cells and sarcomas. Curr Stem Cell Res Ther 5: 63-73. doi:10.2174/157488810790442859. PubMed: 19807660.

50. Song Deye, Jangdong NI, Hongming Xie, Muliang Ding, Jun Wang: DNA demethylation in the PTEN gene promoter induced by 5-azacytidine activates PTEN expression in the MG-63 human osteosarcoma cell line. Experimental and Therapeutic Medicine 7: 1071-1076, 2014.
51. Soto-Reyes E, Recillas-Targa F: Epigenetic regulation of the human p53 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines. Oncogene (2010) 29, 2217–2227; doi:10.1038/onc.2009.509; published online 25 January 2010
52. Subramanian S, Lui WO, Lee CH, Espinosa I, Nielsen TO, Heinrich MC, Corless CL, Fire AZ, van de Rijn M: MicroRNA expression signature of human sarcomas. Oncogene (2007), 1–12.
53. Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. Clin Orthop Relat Res 2008;466(9):2114–30. [PubMed: 18563507].
54. Thayanithy V, Park C, Sarver AL, Kartha RV, Korpela DM, Graef AJ, et al.: Combinatorial Treatment of DNA and Chromatin-Modifying Drugs Cause Cell Death in Human and Canine Osteosarcoma Cell Lines. PLoS ONE. 2012;7:e43720. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043720 PMid:22957032 PMCid:PMC3434163.
55. Thomas, D., Kansara, M.: Epigenetic modifications in osteogenic differentiation and transformation. J. Cell. Biochem. (2006) 98:757–769).
56. Ulaner GA, Vu TH, Li T, Hu JF, Yao XM, Yang Y, Gorlick R, Meyers P, Healey J, Ladanyi M, Hoffman AR. Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site. Hum Mol Genet. 2003 Mar 1;12(5):535-49.
57. Vrtačnik Peter, Janja Marc, Barbara Ostanek: Epigenetic mechanisms in bone. Clin Chem Lab Med 2014; 52(5): 589–608. DOI 10.1515/cclm-2013-0770.
58. Weiss A, Gill J, Goldberg J, Lagmay J, Spraker-Perlman H, Venkatramani R, Reed D.: Advances in therapy for pediatric sarcomas. Curr Oncol Rep. 2014;16(8):395. doi: 10.1007/s11912-014-0395-z.
59. www.mirbase.org
60. www.news-medical.net/health/What-is-MicroRNA.aspx
61. www.osteosarcoma-db.uni-muenster.de/browse mirs.php
62. www.ks.uiuc.edu/Research/methylation/
63. Xiaodong Mu, Daniel Brynien, and Kurt R. Weiss: The HDAC Inhibitor Vorinostat Diminishes the In Vitro Metastatic Behavior of Osteosarcoma Cells. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2015, Article ID 290368, 6 pages http://dx.doi.org/10.1155/2015/290368.

64. Xing Deyin, Qasem Shadi A., Owusu Kofi, Zhang Kui, Siegal Gene P., Wei Shi: Changing prognostic factors in osteosarcoma: analysis of 381 cases from two institutions. Human Pathology (2014) 45, 1688–1696.
65. You Jueng Soo, Jones Peter A: Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? Cancer Cell. 2012 July 10; 22(1): 9–20. doi:10.1016/j.ccr.2012.06.008.
66. Yu Fa-Xing, Guan Kun-Liang: The Hippo pathway: regulators and regulations. Genes and Development 27:355–371, 2013, Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 0890-9369/13; www.genesdev.org
67. Zhang Jian, Yan Yi-Guo, Wang Cheng, Zhang Shu-Jun, Yu Xiao-Hua, Wang Wen-Jun: MicroRNAs in osteosarcoma. Clinica Chimica Acta 444 (2015) 9–17.
68. Zhang Jian, Yu Xiao-Hua, Yan Yi-Guo, Wang Cheng, Wang Wen-Jun: PI3K/Akt signaling in osteosarcoma. Clinica Chimica Acta, Volume 444, 15 April 2015, Pages 182–192.