



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Osteosarcoma models : understanding complex disease

Mohseny, A.B.

Citation

Mohseny, A. B. (2012, June 27). *Osteosarcoma models : understanding complex disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/19152>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/19152>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19152> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Mohseny, Alexander Behzad

Title: Osteosarcoma models : understanding complex disease

Date: 2012-06-27

CHAPTER 5 — CONCLUSION

5.1	General summary and future perspectives	148
5.2	Nederlandse samenvatting	154
5.3	Dankwoord	160
5.4	Curriculum Vitae	162
5.5	List of publications	163
5.6	Addenda	164

5.1

GENERAL SUMMARY AND FUTURE PERSPECTIVES

For the past decades increasing knowledge of cancer has revealed some pieces of the osteosarcoma puzzle. Even –evidence based or not– major breakthroughs have been made, for example by the upcoming chemotherapy regimens in the seventies, proven to be of vital importance for at least 50% of the patients. The challenge for the current osteosarcoma research is to put the pieces together and look for the missing ones. Indeed the common thread in this thesis was to define, categorize and structure all available information, and where missing, to gain more biological knowledge with one –clinically relevant– goal: a basis for effective targeted therapy.

In **chapter 1** an overview of osteosarcoma clinical and biological characteristics is given. Merely a simplistic schematic representation of the longtime known information about osteosarcoma subtypes (paragraph 1.1, figure 1) indicated the first hurdles at a glance. Although rare, there are more than twenty subtypes with only one common feature; the production of osteoid by the neoplastic cells. Even when excluding secondary, peripheral and low-grade osteosarcoma to keep only the most prevalent –conventional– type, still many histological subtypes remain. We were looking for common causal (genetic) alterations in an uncommon highly heterogeneous tumor. To overcome this, dissection and simplification of the questions was necessary for which multiple models were used (chapter 1.2). The broad histological heterogeneity provided some clues as well. First, it indicated that when all conventional osteosarcoma subtypes are considered as one entity sharing the same cell of origin, this cell must possess multipotent differentiation capacity and simultaneously able of osteoid production. This hypothesis was confirmed in Chapter 2 by step-wisely examining the spontaneous in vitro transformation of mouse mesenchymal stem cells (mMSCs). These transformed MSCs were not only shown to produce osteoid forming osteosarcoma upon subcutaneous injection into other mice, but they also retained the capacity of differentiation potential towards osteoblasts, chondrocytes and adipocytes. In addition the same chapter includes –often controversial– ideas concerning the relationship between MSCs and sarcoma or even cancer in general. By drawing parallels between cancer stem cells and tissue specific stem cells potential theories were suggested that might explain the contradictory reports and resolve the controversies. Synthesis of ideas is especially important for focusing efforts towards most probable effective approaches. Another finding from studying the transformation of mMSCs was that in all cells genomic deletion of the *Cdkn2a/p16* gene was found during crisis and just before accelerated –and anchorage independent– growth of the cells. This indicated that loss of the *Cdkn2a/p16* gene was one of the crucial events triggering malignant transformation –or more specifically in this mouse model osteosarcoma-genesis– of normal mMSCs. With this rationale the clinical relevance of *CDKN2A/p16* loss was examined in human osteosarcoma samples by looking for the *CDKN2A/p16* protein expression. Interestingly a subgroup of patients was identified with total loss of *CDKN2A/p16* protein expression which was proven to independently predict poor survival. The observation that this loss was only evident in a subgroup of the osteosarcoma tumors suggested another role for this gene, more related to the clinical behavior of osteosarcoma rather than its initiation. Nevertheless in chapter 3 it was shown that loss of the *CDKN2A/p16* protein expression in human osteosarcoma is based on the same mechanism, i.e. genomic (micro)deletions, as seen in the mouse model. Herewith the model was considered as representative for at least a subgroup of human osteosarcoma. Detailed examination of the group without *CDKN2A/p16* protein expression loss revealed that all cases had at least one other defect impairing either the cell cycle control (*p16*, *Rb*) or the apoptosis (*p53*) pathway (paragraph 3.2, figure 1), suggesting three matters. I: independent of the targeted gene breaking the chain of action; in osteosarcoma these pathways are affected. Assuming that after pathway impairment there will be a selection for the cell with the biggest growth advantage, it is expectable that cells with both pathways affected –allowing for irregular cell cycles and escape from apoptosis– would overgrow the population. This might explain why in the mouse model all transformed cells had genomic homozygous loss of the *Cdkn2* locus, simultaneously impairing both the *p16* pathway and the *p53* pathway via loss of the *Cdkn2a/p19* (*p14* in human) gene. II: As involvement of these pathways is directly or indirectly shown in most types of cancer, other (communal) factors are to be identified which force the tumor towards its osteosarcoma phenotype. Physical location of the tumor and the cell of origin are possibly of influence and

the CDKN1A/p21 gene might be involved. III: Considering the tight regulation of the Rb and p53 pathways and the young age of onset of osteosarcoma, it is reasonable to assume that impairment of these pathways might be secondary to a catastrophic event that could rapidly affect multiple genes in a cell. As further discussed in paragraph 3.2, one way to explain this might be provided by a recently described phenomenon called chromothripsis. Second clue coming forward from the broad histological spectrum of differentiation seen in osteosarcoma, but also from the near-to-growth-plate locations of the tumors, is that important differentiation pathways might be deregulated (paragraphs 3.3 and 3.4). Along the path of MSCs differentiating towards osteoblasts, impairment of terminal differentiation might explain the histological phenotype of osteosarcoma (paragraph 3.4, figure 7). However solely based on such a differentiation block, malignant outgrowth is unlikely as an oncogenic trigger would be still missing. Nevertheless studying differentiation pathways is not only informative of osteosarcoma biology, but it also provides possible targets that could restore differentiation and thereby change an aggressive, highly proliferative tumor to a more indolent, differentiated one. To test the efficacy of drugs that could facilitate such restoration of the differentiation pathways, *in vitro* and *in vivo* osteosarcoma models are needed. In Chapter 4 nineteen osteosarcoma cell lines –globally known ones as well as newly established ones within the EuroBoNet consortium– were examined for their representativeness of human osteosarcoma under technically manageable laboratory conditions. This work was reinforced by two other studies characterizing the (epi)genetics of these cell lines, together providing proper guidelines for decision making when cell lines are used to model certain aspects of human osteosarcoma. Furthermore a zebrafish study is included in which normal mMSCs were compared to transformed mMSCs that produced osteosarcoma in mice. Comparing these two cultures of mMSCs –which share origin– allowed for the detection of specific differences involved in the potential of migration and angiogenesis induction.

Future perspectives

The findings represented in this thesis have put forward a number of ideas that will be further investigated in future experiments. The following list includes the plans, most of which have already initiated:

1. The transformed mouse MSCs described in chapter 2.1 that were analysed for genetic alterations by array CGH will be subjected to deep sequencing to acquire a more detailed profile of the genetic changes that are associated with the transformation of these cells. To this end, the MSCs will be extensively monitored by several experiments, including the use of zebrafish embryos described in chapter 4.2, to identify the moment of transformation as precise as possible. Knowing the time point for this critical “switch” from normal to transformed phenotype, will allows us to study cells directly after the transformation. This is important to be able to track the first initiating hit before many additional changes take place. Nevertheless we do realize that at this stage the culture will be highly heterogeneous making the detection of subtle changes difficult reinforcing the application of next-generation high-resolution deep sequencing technology. In addition tumors resulting from injection of transformed mouse MSCs into recipient mice will be sequenced to validate the identified *in vitro* genetic changes for the *in vivo* condition.
2. Based on chapters 2.2 and 3.1 indicating that osteosarcoma most probably originates from a MSC which somewhere along its path of differentiation is malignantly transformed, human MSCs will be virally transduced with constructs to knock down the expression of the CDKN2A/p16 and the TP53 genes. After stable cell lines are created, cells will be treated with

drugs, like nocodazole, that depending on the used dosage and the duration of the treatment normally would induce cell cycle arrest or cell death. However in this experiment –when lacking CDKN2A/p16 and/or the TP53 genes– cells might escape the cycle checks and continue abnormal proliferation, accumulate mutations and finally transform into cancer cells. Variations in these interventions –so the exact moment during the process of MSC differentiation when genes are knocked down, the knock down combinations of these and other genes like CDKN1A/p21 (based on findings in chapter 3.2)– are expected to lead to initiation of different subtypes of osteosarcoma and even other types of sarcoma.

3. Instead of screening the genomic changes as mentioned above (see point 1), an alternative approach to identify the causal changes underlying transformation of normal MSCs, is to directly study MSCs with dysfunctional candidate genes. Based on the findings described in chapter 3.2 future experiments are designed aiming to comparatively study MSCs of certain transgenic mice, like the p53-/- mice, the Fzr1-/- mice, mice with APC mutations and other mutant MSCs for their propensities to transform in vitro and to result in osteosarcoma in vivo. When certain mutant MSCs are found which transform and result in osteosarcoma, their specific mutation will be introduced into normal MSCs to validate the findings.
4. As shown in chapters 3.3 and 3.4, exclusive modulation of the Wnt pathway could inhibit osteosarcoma growth by stimulation of differentiation of the cells or by inhibiting their proliferation. These results require validation in vivo.. which will be accomplished by generating stably transfected osteosarcoma cell lines which express a Wnt-specific reporter. After injection of these cell lines in mice, experiments will be performed to study the efficacy of drugs which specifically repair Wnt function, like the GSK3 β -inhibitor. This will be performed by monitoring the effects of this pathway modulation on tumor growth and dissemination. Furthermore any side-effects of the used drugs will be recorded.
5. With the characterization of the human osteosarcoma cell lines (chapter 4.1) and the establishment of a high-throughput zebrafish model (chapter 4.2) to screen for metastasis related processes –angiogenesis and migration– drugs can be screened to inhibit metastasizing potential of the cells. Genetic comparison of cell lines which show high propensities of migration and which strongly induce angiogenesis versus the ones that do less or do not at all, will reveal the genes underlying these differences. Subsequently possible drugs targeting those genes or proteins will be screened by using the embryos injected with the “metastatic” cell lines. Best candidate drugs will be additionally tested in mice subcutaneously injected with the HOS-143B cells as these cells were shown to be metastatic after subcutaneous grafting in mice.

Next to these specific plans, more future experiments are currently designed to validate and test the clinical relevance of the most recent findings described in this thesis including the significant correlation of pSMAD1 protein expression and patients’ survival, the role of Mmp-19 and Ets-1 genes in migration of osteosarcoma cells and the effectiveness of the hosts immune response to osteosarcoma cells.

In conclusion

A mesenchymal stem cell (MSC) based osteosarcoma model was established. The model provided evidence for a MSC origin of osteosarcoma. Normal MSCs transformed spontaneously to osteosarcoma-like cells which was always accompanied by genomic instability and loss of the *Cdkn2a* locus. Accordingly loss of human CDKN2A/p16 protein expression in patients' samples identified a subgroup of patients which did not respond to the chemotherapy and all showed poor survival (< 50 months). Moreover the CDKN2A/p16 gene expression loss in the human samples was caused by the same mechanism as in the mice cells, i.e. homozygous genomic deletion, validating the mouse model. Subsequently other useful models were identified by extensive characterization of osteosarcoma cell lines. From analyses of important signal transduction pathways (Wnt, BMP, TGF β and Ihh) candidate targets for therapy, like a GSK3 β -inhibitor, were identified. Furthermore a novel zebrafish model was established to study the progression of normal MSCs towards osteosarcoma-like cells in a high throughput manner. In this model both the behavior of the cells as well as the response of the host involved in processes like angiogenesis and migration were studied.

The exploration of osteosarcoma at different levels was essential to broaden our knowledge about its origin, etiology and behavior. A better understanding of this complex malignancy offers more accurate targets to hit. Moreover it provides better opportunities to model the tumor which in turn allows for discovering and assaying novel treatment strategies.

5.2

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Inleiding

Het skelet van het menselijk lichaam bestaat uit ongeveer 206 botten. Deze botten hebben belangrijke functies waaronder het ondersteunen van lichaamsstructuren, het beschermen van interne organen, het mede mogelijk maken van bewegingen, de vorming van nieuwe bloedcellen en de huishouding van calcium. De vorming van het bot staat dan ook onder strenge controle systemen waardoor fouten bijna nooit ontstaan. Hieronder volgt een korte beschrijving van de normale botontwikkeling waarna een voorbeeld wordt gegeven van een ernstige ziekte –osteosarcoom, een kwaadaardige bottumor– wanneer er in dit proces toch fouten ontstaan.

Botontwikkeling (osteogenese) vindt plaats door twee verschillende processen voor het maken van pijpbeenderen, zoals het dijbeen (femur) of platte beenderen, zoals het schouderblad (scapula). Meest relevant voor de in dit proefschrift beschreven resultaten zijn de pijpbeenderen waarvan de groei (zie figuur) geschiedt tijdens een proces waarbij kraakbeencellen (chondrocyten) differentiëren en vervolgens verkalken (mineralisatie). Hierna reizen botmakende cellen (osteoblasten) en bot afbrekende cellen (osteoclasten) via de bloedvaten naar deze gemineraliseerde chondrocyten waarbij de osteoblasten een benig matrix (osteoid) afgeven. Na verdere mineralisatie van het osteoid ontstaat een balans tussen het aanmaken van bot door osteoblasten en het afbreken ervan door osteoclasten in een dynamisch proces waardoor het bot continue wordt vernieuwd. In een gebied van het gevormde bot (de groeischijf) blijven de chondrocyten tot het einde van de puberteit delen wat zorgt voor de lengte groei. Alle beschreven cellen benodigd voor dit proces (endochondrale ossificatie), behalve de osteoclasten, worden gevormd uit mesenchymale stamcellen (MSCs) in een exact gereguleerd proces onder controle van vele communicatie routes (signaal transductie pathways, pagina 113, figuur7) en groeihormonen.

Ondanks de strikte regulatie kunnen kleine fouten in het maken van botcellen en het mineraliseren van bot grote gevolgen hebben, van verminderde botkwaliteit tot kwaadaardige ontaarding (maligniteit). Een voorbeeld van een zeer agressieve maligniteit is het osteosarcoom wat met name bij kinderen en jong-volwassenen voorkomt. Dit proefschrift beschrijft onderzoek naar het ontstaan en het kwaadaardige gedrag van deze tumor. De voornaamste doelen van de studies waren het in kaart brengen van het ontstaan van het osteosarcoom en het verkrijgen van een beter begrip over de processen die daarbij foutgaan. Het verbreden van kennis omtrent het osteosarcoom is van belang om nieuwe mogelijkheden te vinden voor de ontwikkeling van effectievere behandelingen.

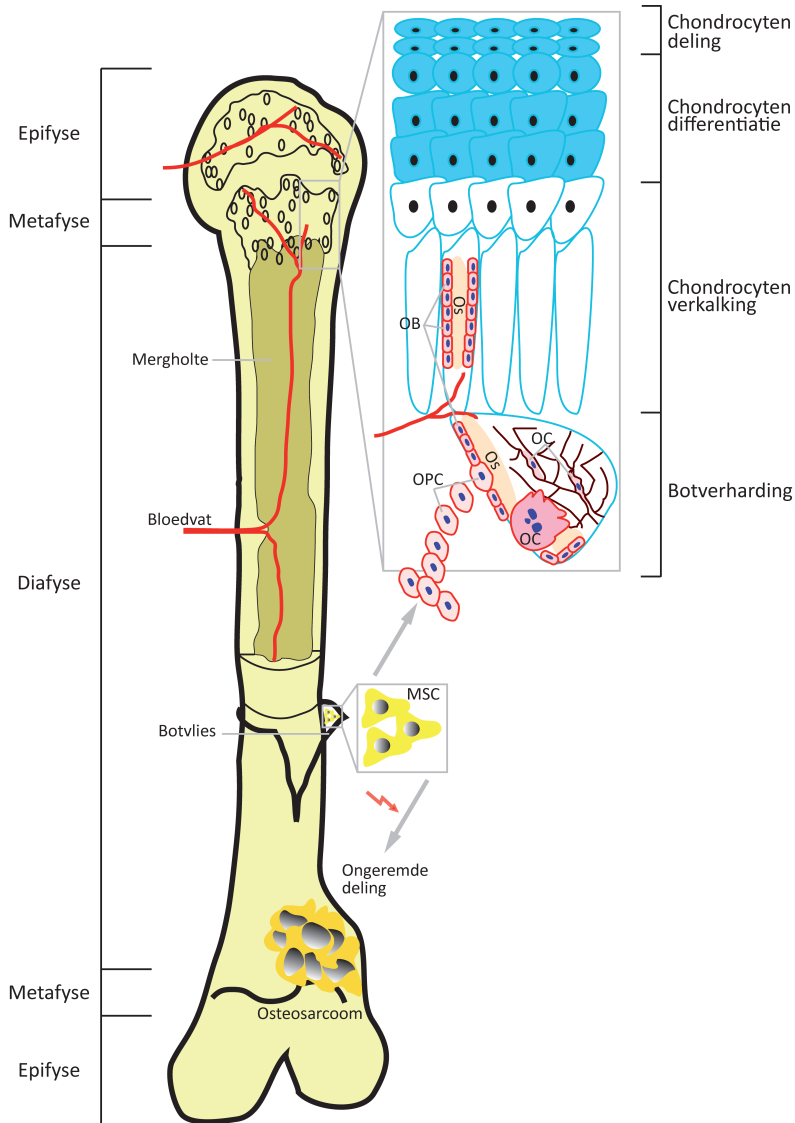


FIGURE | BOTONTWIKKELING

Een schematische tekening van botontwikkeling in een lang pijnbeen. In de groeischijven, gelegen tussen de epifyse en het metafyse, delen de kraakbeencellen (chondrocyten), rijpen uit en worden gemineraliseerd op een ondergrond van osteoïd (Os) dat wordt afgescheiden door de osteoblasten (OB). Deze osteoblasten die gevormd zijn uit mesenchymale stamcellen gelegen in het periost (botvlies) via osteoprogenitorcellen (OPC) reizen via de bloedvaten naar het kraakbeenmatrix. Tegelijkertijd komen ook de osteoclasten (OC) die het bot juist weer afbreken wat leidt tot een continue vernieuwing. De osteoblasten die klaar zijn met het produceren van osteoïd blijven liggen in het bot en worden vanaf dat moment osteocyt (Oc) genoemd. Wanneer de normale deling en verandering van MSCs tot osteoblasten verstoord wordt door mutagene prikkels (rode pijl), kan dit leiden tot ongeremde deling van de cellen en het ontstaan van het osteosarcoom.

Resultaten uit dit proefschrift

Om de resultaten en de relevantie van het in dit proefschrift beschreven onderzoek te illustreren, volgt hier een korte samenvatting. Zoals geïntroduceerd in hoofdstuk 1.2 –afgezien van enkele osteosarcoompatiënten binnen families met bepaalde, uiterst zeldzame, genetische afwijkingen (LiFraumeni, Rothmund-Thomson, Retinoblastoma)– zijn er meestal geen aanwijsbare genetische of omgevingsfactoren die het plotseling ontstaan van deze tumor kunnen verklaren. Overigens hebben de osteosarcoompatiënten binnen de eerder genoemde families door hun genetische defecten eveneens verhoogde risico's voor het ontwikkelen van allerlei andere soorten kanker wat aangeeft dat de desbetreffende genetische afwijkingen niet specifiek zijn voor het osteosarcoom. Om het ontstaan en de ontwikkeling van het osteosarcoom (osteosarcoomgenese en progressie) beter te begrijpen zijn osteosarcoommodellen van onmiskenbaar belang. Dit is omdat drie belangrijke eigenschappen van het osteosarcoom het onderzoek naar deze tumor in de weg staan:

1. de tumor komt zeer weinig voor,
2. ondanks de jonge leeftijd zijn er geen aanwijzingen voor erfelijke factoren en
3. de genetische veranderingen zijn zo uitgebreid dat er geen specifieke oorzakelijke veranderingen aan te wijzen zijn.

In hoofdstuk 1.3 is een overzicht samengesteld van modellen voor het bestuderen van diverse aspecten van het osteosarcoom. Eén van deze modellen werd door ons ontwikkeld en is in hoofdstuk 2.1 beschreven. In dit onderzoek werd gebruik gemaakt van muizen MSCs en werd bevestigd dat osteosarcoomcellen uit deze MSCs konden ontstaan. Verder bleek dat de verandering van deze normale cellen tot tumorcellen (transformatie) plaatsvindt via een fatale crisis waarbij de meeste cellen doodgaan, maar niet allemaal. De overlevende cellen zijn genetisch zo veranderd (onder andere deletie van het *Cdkn2a* locus) dat ze ongevoelig geworden zijn voor alle signalen die een celdeling moeten stoppen (cel cyclus arrest) of zelfs een cel commanderen zichzelf te vernietigen (apoptose). Hiermee konden deze cellen ongeremd groeien en het osteosarcoom doen ontstaan. Om dit laatste te bevestigen werden cellen van vóór en na de crisis –dus normale en getransformeerde MSCs– geïnjecteerd in muizen. In de muizen met de normale MSCs werden geen effecten gevonden terwijl de met getransformeerde MSCs geïnjecteerde muizen binnen korte tijd osteosarcomen ontwikkelden. Gebaseerd op deze bevindingen, werd in hoofdstuk 2.2 weergegeven manuscript het concept “vulnerable MSC” gepostuleerd. De hypothese is dat het osteosarcoom –en breder alle sarcomen– ontstaan vanuit de MSCs. Hierbij bepaalt het moment van de mutatie tijdens de ontwikkeling van de MSCs tot een bot-, spier-, kraakbeen-, of vetcel, de soort en het uiterlijk (fenotype) van de tumor die uiteindelijk zal ontstaan.

Met gemiddeld 40-60 patiënten per jaar in Nederland, wat het osteosarcoom moeilijk herkenbaar maakt, is aanvullend onderzoek van groot belang. Zo wordt er onder andere gebruik gemaakt van röntgenonderzoek (pagina 15, figuur 3) en een stukje van het weefsel (biopt) wordt microscopisch onderzocht. Met dit onderzoek wordt niet alleen vastgesteld of het om een kwaadaardige zwelling (bijvoorbeeld osteosarcoom) of een goedaardige zwelling (bijvoorbeeld osteoblastoom) gaat, maar er wordt ook een uitspraak gedaan over de agressiviteit van de tumor. Aan de hand van deze gegevens, samen met de locatie van de tumor en een aantal andere kenmerken worden de osteosarcomen verder onderverdeeld in bepaalde subtypen. De focus van dit proefschrift ligt op het meest voorkomende subtype (>75%), conventioneel osteosarcoom genaamd. Dit type osteosarcoom wordt meestal gevonden bij patiënten die niet tot een vooraf bekende risicogroep voor deze tumor horen, op jonge leeftijd (gemiddeld 17 jaar), is agressief (high-grade) van karakter en wordt gevonden aan de einden van de lange pijpbeenderen (distale humerus, distale

femur en proximale tibia). Het osteosarcoom leidt meestal tot plots ontstane pijnklachten en door de snelle groei is gemiddeld twee maanden na het eerste pijnmoment, een harde zwelling te voelen. De behandelingen die overwogen worden, hangen af van de cruciale vraag of de patiënt uitzaaiingen (metastasen) heeft.

Het osteosarcoom metastaseert via de bloedbaan meestal naar de longen of een enkele keer naar elders in het bot en zelden naar andere organen. Wanneer er uitzaaiingen gevonden worden, is enkel het weghalen van de primaire tumor uiteraard niet zinvol en zal de behandeling gericht zijn op het aangrijpen van de metastasen. Indien er geen sprake is van uitzaaiingen, is het primaire doel van de behandeling het verwijderen van de tumor en tegelijkertijd het voorkomen van mogelijke uitzaaiingen. De essentie van het laatste blijkt uit gegevens van voor de tijd van chemotherapie tot in de jaren zeventig. In die tijd was er maar één behandeling voor het osteosarcoom en dat was het chirurgisch ruim verwijderen van de tumor (radicale resectie), wat vaak inhield dat er een amputatie van een ledemaat onvermijdelijk was. Echter zelfs na deze ingrijpende operaties overleefden gemiddeld maar 15-30% van de patiënten de ziekte gezien er bij de rest na de operatie zich binnen 5 jaar fatale longmetastasen ontwikkelden. Met de komst van chemotherapie waarbij door het hele lichaam alle kwaadaardige snel delende cellen worden aangepakt, dus ook eventueel uitgezaaide cellen, veranderde dit beeld met een gemiddelde overleving van 50%-70% als gevolg. Dit verklaart waarom tegenwoordig alle osteosarcoom patiënten eerst chemotherapie ontvangen met als doel de tumor massa te verkleinen voor een “mildere” operatie en eventueel metastasen te ondermijnen. Effectiviteit wordt bepaald door de resectie te onderzoeken voor levende tumorcellen. Indien nagenoeg alle cellen dood zijn (good reponse), is de kans op genezing groot terwijl zelfs bij een geringe hoeveelheid levende tumorcellen (10%, poor response) de overlevingskans van de patiënt aanzienlijk afneemt. Deze overlevingskans is nog lager wanneer op het moment van diagnose al uitzaaiingen worden gevonden.

Het probleem van de chemotherapie ligt in het feit dat het niet selectief tumorcellen aanvalt. Over het algemeen worden alle relatief snel delende cellen aangetast waarbij dus ook veel normale cellen in het lichaam doodgaan en organen schade ondervinden. Daarom zou het wenselijk zijn om bij patiënten vooraf vast te kunnen stellen of ze baat zullen hebben van de chemotherapie en zo niet, ze deze behandeling met alle negatieve gevolgen te besparen. In hoofdstuk 3.1 is er aandacht besteed aan dit probleem waarbij vastgesteld is dat door te kijken naar de expressie van het p16 eiwit in het biopt –wat zoals eerder besproken toch wordt afgenomen voor de diagnostisering– een voorspelling gedaan kan worden over de te verwachten uitkomst van de chemotherapie. De uitkomsten uit deze studie lieten namelijk zien dat alle patiënten met verlies van dit eiwit, ondanks chemotherapie, binnen 5 jaar kwamen te overlijden. Het verlies van het p16 eiwit bracht tegelijkertijd nieuwe ideeën met zich mee over het ontstaan van het osteosarcoom. Zoals beschreven in hoofdstuk 3.2, is één van de meest kenmerkende karakteristieken van deze tumor de zeer uitgebreide genetische instabiliteit. Een mogelijke verklaring hiervoor werd recent gerapporteerd door Stephens et al. waarbij het door onbekende oorzaken uiteenvallen van chromosomen (chromothripsis) zou leiden tot verlies van belangrijke genen zoals het p16 gen en zo het begin vormen van maligne ontaarding. Wij onderzochten cellen tijdens de transformatie van normaal naar kwaadaardig (maligne transformatie) op genetisch niveau (karyotypering). Dit liet zien dat er tegelijkertijd veel chromosomale veranderingen plaatsvinden in deze cellen wat aangeeft dat chromothripsis niet noodzakelijkerwijs de enige mogelijkheid is om grote genetische veranderingen in korte tijd te bewerkstelligen.

Van belang is het ontwikkelen van alternatieve therapieën die ook effectief zullen zijn bij patiënten die naar verwachting geen baat hebben bij de chemotherapie. In het beste geval zou het gaan om

therapieën die gericht de osteosarcoomcellen zouden kunnen aanvallen zonder verdere schade aan de normale cellen te geven. Om dit mogelijk te maken, is een uitgebreide kennis van de osteosarcoomcellen essentieel. De jonge leeftijd van de patiënten en de locatie (metaphyse) van de meeste osteosarcomen doet vermoeden dat een abnormale botgroei gerelateerd zou kunnen zijn aan deze tumor, hetzij oorzakelijk, hetzij als gevolg van de ongeremde groei. In hoofdstukken 3.3 en 3.4 werden de functies van een aantal cruciale signaaltransductie pathways onderzocht in osteosarcomen. Een belangrijke bevinding was dysfunctie van één van deze routes genaamd Wnt-pathway. Het herstellen van de Wnt-pathway in osteosarcoomcellen remde de groei of stimuleerde verdere ontwikkeling van de tumor (inhibitie van proliferatie of stimulatie van differentiatie), beide met een remming van de tumor als gevolg. Het activeren van deze pathway in osteosarcomapatiënten zou dus theoretisch specifiek het osteosarcoom aanvallen zonder schade aan normale cellen. Om aan de hand van deze bevindingen en resultaten van collega onderzoekers nieuwe therapieën te ontwikkelen, zijn modellen nodig om nieuwe middelen te testen. Een manier om dit mogelijk te maken, is het isoleren en bestuderen van levende osteosarcoomcellen nadat de tumor of een deel ervan uit de patiënt is gehaald (in vitro cellijnen). In hoofdstuk 4.1 zijn de meest gebruikte osteosarcoomcellijnen beschreven en uitvoerig in kaart gebracht. Hiermee konden de cellijnen die het echte menselijke osteosarcoom het beste representeren, worden geselecteerd. Afhankelijk van het type onderzoek en de onderzoeksvraag kunnen nu de meest geschikte cellen worden geselecteerd voor dat onderzoek. In de toekomst kunnen kandidaat therapieën getest worden op deze cellijnen alvorens ze op patiënten worden toegepast.

Een ander, voor de patiënt misschien wel meest relevante, aspect van het osteosarcoom is de metastasering. In het in hoofdstuk 4.2 beschreven onderzoek werd gebruik gemaakt van vis embryo's. Dit zijn tot 6 dagen oude transgene zebrafish embryo's waarin alle bloedvaten van de verder transparante embryo's via genetische manipulatie een groene kleur hebben. Hiermee werd aangetoond dat getransformeerde MSCs –die zoals eerder beschreven osteosarcomen vormen na injecties in muizen– het maken van nieuwe bloedvaten stimuleren (angiogenese), vervolgens door deze vaten door het lichaam reizen (migratie), hierbij het afweersysteem van de embryo's onderdrukken (immuunsuppressie) en elders een tumor vormen (metastase). Van belang is dat er bij dat onderzoek genen geïdentificeerd konden worden die deze processen stimuleren (oncogenen) of juist falen tegen te houden (tumor-suppressor-genen). Na verificatie in meer embryo's vormen deze genen uitstekende kandidaten voor klinisch onderzoek in patiënten.

Conclusie

Het osteosarcoom is een zeldzame maar zeer agressieve tumor is die bij gezonde jongeren wordt gevonden. Ondanks zware regimes van therapie, overlijdt ongeveer 40% van de patiënten aan uitzaaiingen. Dit geeft aan dat het ontwikkelen van effectievere therapieën noodzakelijk is. Om dit te bewerkstelligen zijn er in dit proefschrift beschreven onderzoek naast kennisverbetering leidend tot aanknopingspunten, geschikte modellen ontwikkeld voor het ontwikkelen en testen van nieuwe medicatie.

Dankwoord

Voordat ik mijn dank verwoord aan degenen die mij op een specifieke manier hebben bijgestaan, wil ik iedereen van de afdeling pathologie bedanken voor de leerzame en plezierige samenwerking, voor hun steun en voor alle gezelligheid in de afgelopen jaren.

Om te beginnen dank ik Prof. Hogendoorn en Dr. Cleton-Jansen, mijn promotor en co-promotor. Pancras, bedankt voor alle lessen, lessen in de wetenschap, maar vooral in het leven en dank voor het geven van het voorbeeld van een competente leider. Anne-Marie, jou ben ik dankbaar omdat je mij dag in dag uit, naast wetenschappelijke leiding, met je onuitputtelijke positieve energie ondersteund hebt. Next to my promotor and co-promotor, it was Dr. Szuhai who had a leading position in the studies presented in this thesis. Karoly, above all I thank you for your critical but inspiring view that always led to improvements.

Special thanks to my former colleagues who rapidly have become best friends, Dr. Pansuriya, Dr. Andrea, Dr. Ruano, Dr. Romeo and Dr. Wiweger. Twinkal, thanks for the positive spirit and for your trust in me, it always makes me feel good. Carlos, I think you are one of the two people who scientifically is always on the same line, leading to pleasantly efficient discussions for which I am very thankful. Dina, Carlos is one of the two and off course you are the other one! It is always a pleasure to talk to you, thank you. Sal, the thing I want to thank you for the most, is that you have always been there and you still are, even now with your busy job in Italy. Malgorzata, you never hesitate to help, in anyway you can, thank you. Besides, I thank you all for all the nice gatherings, dinners, parties and outings.

Zoals uit de in dit proefschrift opgenomen artikelen duidelijk wordt, zat het succes van de experimenten voor een belangrijk deel in het vakkundig praktiseren ervan door de analisten. Hiervoor dank ik Inge, Pauline, Brendy, Jaap, Ronald, Marcel, Diane, Maayke, Daniëlle en alle andere betrokkenen. In het bijzonder ben ik Inge dankbaar voor alle technieken die ze mij geleerd heeft en voor het feit dat ze altijd heeft meegedacht. Daarnaast dank ik Brendy voor het oneindige geduld en kalmte waarmee ze experimenten die even tegenzaten keer op keer herhaald heeft, vaak buiten officiële werktijden, en nooit dacht aan opgeven.

Met plezier kijk ik terug naar de samenwerking met alle studenten die ik heb mogen begeleiden, hier heb ik veel van geleerd. In het bijzonder dank ik Wei, Chris en Susanne wiens grote inzet en goede prestaties mede geleid hebben tot wetenschappelijke publicaties.

For the international contacts, I thank all EuroBoNet members and especially Prof. Llombart-Bosch, Dr. Machado and their team in Valencia for the fruitful collaborations that were successfully finalized by a joined publication.

Ook bij de laatste stappen van deze belevenis heb ik veel steun gehad van mijn vriendin, ouders, schoonouders en broertjes die altijd in geslaagd zijn om stress en vermoeidheid tijdig aan mij af te lezen en hierop adequaat te reageren. Jes, bedankt dat je altijd naast me staat, ook tijdens de verdediging als paranimf. En ook dank aan jou Manuel, andere paranimf, ondanks de weinige momenten die wij in onze drukke levens voor elkaar vinden, blijf je altijd een speciale vriend. Uiteraard dank ik Irene voor het bijzonder creatief ontwerpen van de kaft die zoveel zegt zonder woorden. En ik dank mijn ouders die met hun ongelimiteerde liefde mijn belang talloze keren voorop hebben gesteld en die mij met kundigheid gevormd hebben tot wie ik ben. Jullie hebben zonder twijfel de grootste bijdrage geleverd aan alles wat ik in de toekomst zal bereiken.

Curriculum Vitae

De auteur van dit proefschrift werd geboren op 15 april 1985 te Herat, Afghanistan. Na het cum laude behalen van het VWOdiploma aan het Veurs Lyceum te Leidschendam in 2003, begon hij in september dat jaar aan de studie geneeskunde aan de Universiteit Leiden. Door zijn interesse voor onderzoek bracht hij vanaf het tweede jaar van geneeskunde vrije dagdelen en vakantiedagen door op de afdeling pathologie. In de daaropvolgende jaren werd dit voortgezet met stages onder begeleiding van Prof. Hogendoorn waarbij hij werkte aan de karakterisatie van de matrix van myxoïde tumoren. Mede met dit onderzoek behaalde hij in 2007 zijn doctoraaldiploma geneeskunde en startte in augustus met het in dit proefschrift beschreven promotieonderzoek onder begeleiding van Dr. Cleton-Jansen en Prof. Hogendoorn. In het kader van dit onderzoek bezocht hij diverse congressen in het binnen- en buitenland waar hij wetenschappers op de hoogte stelde van zijn werk met posters en presentaties. Met het oog op efficiënte internationale samenwerking werkte hij meerdere keren met plezier op de afdeling pathologie aan de Universiteit van Valencia en ontving hij een KWF reissubsidie voor een bezoek aan het Peter MacCallum Cancer Centre in Melbourne, Australië ter bevordering van uitwisseling van expertise. In 2011 ontving hij de best Basic Science Prize van de European Musculo-Skeletal Oncology Society en de Hippocrates prijs voor zeer verdienstelijk medisch wetenschappelijk onderzoek. Na afronding van dit promotieonderzoek in augustus 2011, begon hij in september met de co-schappen ter afronding van de studie geneeskunde.

List of publications

1. **Mohseny AB**, Hogendoorn PCW, Cleton-Jansen AM. Osteosarcoma models: from cell lines to zebrafish. *Sarcoma* 2012.
2. **Mohseny AB**, Xiao W, Carvalho R, Spalink HP, Hogendoorn PCW, Cleton-Jansen AM. An osteosarcoma zebrafish model implicates Mmp-19 and Ets-1 as well as reduced host immune response in angiogenesis and migration. *J Pathol* 2012 Jun;227(2):245-53
3. **Mohseny AB**, Machado I, Cai Y, Schaefer KL, Serra M, Hogendoorn PCW, Llombart-Bosch A, Cleton-Jansen AM. Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease. *Lab Invest* 2011 Aug;91(8):1195-205.
4. **Mohseny AB** and Hogendoorn PCW. Mesenchymal tumors: when stem cells go mad. *Stem Cells* 2011 Mar;29(3):397-403.
5. **Mohseny AB**, Tieken C, van der Velden PA, Szuhai K, de Andrea C, Hogendoorn PCW, Cleton-Jansen AM. Small deletions but not methylation underlie CDKN2A/p16 loss of expression in conventional osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2010 Dec;49(12):1095-103.
6. Cai Y, **Mohseny AB**, Karperien M, Hogendoorn PCW, Zhou G, Cleton-Jansen AM. Inactive Wnt/beta-catenin pathway in conventional high-grade osteosarcoma. *J Pathol* 2010 Jan;220(1):24-33.
7. **Mohseny AB**, Szuhai K, Romeo S, Buddingh EP, Briaire-de Bruijn I, de Jong D, van Pel M, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PCW. Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. *J Pathol* 2009 Nov;219(3):294-305.
8. Willems SM, **Mohseny AB**, Balog C, Sewrajsing R, Briaire-de Bruijn IH, Knijnenburg J, Cleton-Jansen AM, Sciort R, Fletcher CD, Deelder AM, Szuhai K, Hensbergen PJ, Hogendoorn PCW. Cellular/intramuscular myxoma and grade I myxofibrosarcoma are characterized by distinct genetic alterations and specific composition of their extracellular matrix. *J Cell Mol Med* 2009 Jul; 13(7):1291-1301.
9. **Mohseny AB**. Bone: Conventional osteosarcoma. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2008 Apr.
10. Willems SM, Schrage YM, Baelde JJ, Briaire-de B, I, **Mohseny AB**, Bovée JV, Hogendoorn PCW. Myxoid tumours of soft tissue: the so-called myxoid extracellular matrix is heterogeneous in composition. *Histopathology* 2008 Mar;52(4):465-74.

Addenda

The following pages include supplementary information for chapters:

2.1:

1. Summary of the clinical and follow-up data of all patients used in the study.
2. Summary of all conditions under which the named antibodies perform optimally, also showing the companies' names.
3. Long-term in vitro passaged cells and tumour cells acquire genetic aberrations; an overview of genomic aberrations observed in all cell lines used.

3.4:

4. Clinical characteristics of the tumor samples.
5. Culturing conditions of the cell lines.

4.2:

6. Normal MSCs versus transformed/ tumorigenic MSCs. Table contains the list of 28 mouse genes (gene name and the sequence of the probe on the array) differentially expressed ($\log FC > 2.0$) between normal and transformed/tumorigenic MSCs when cultured in vitro as well as in vivo inside zebrafish embryos.
7. Embryos injected with normal MSCs versus embryos injected with transformed/tumorigenic MSCs. Table depicts 63 zebrafish genes that were differentially expressed ($\log FC > 2.0$) between embryos injected with normal versus transformed/tumorigenic MSCs.
8. qRT-PCR data and correlation with whole genomic expression array data. Relative expression of the indicated genes to the expression of the housekeeping genes and the positive controls detected by qRT-PCR is depicted in the bar graphs. The tables represent Spearman's Correlation tests indicating that qRT-PCR findings correlate with the array based results.

High grade osteosarcoma on TMA (follow-up complete t/m 2-6-9)

Total: 144 tumor samples of 88 patients

73 pre-treatment samples of the primary tumor of 73 patients

45 post-treatment samples of the primary tumor of 45 patients

20 lung metastases of 13 patients

3 "other meta" of 3 patients (2 bone metastasis and one lymph node metastasis)

3 local relapses of 3 patients

Clinical information of these 88 patients:

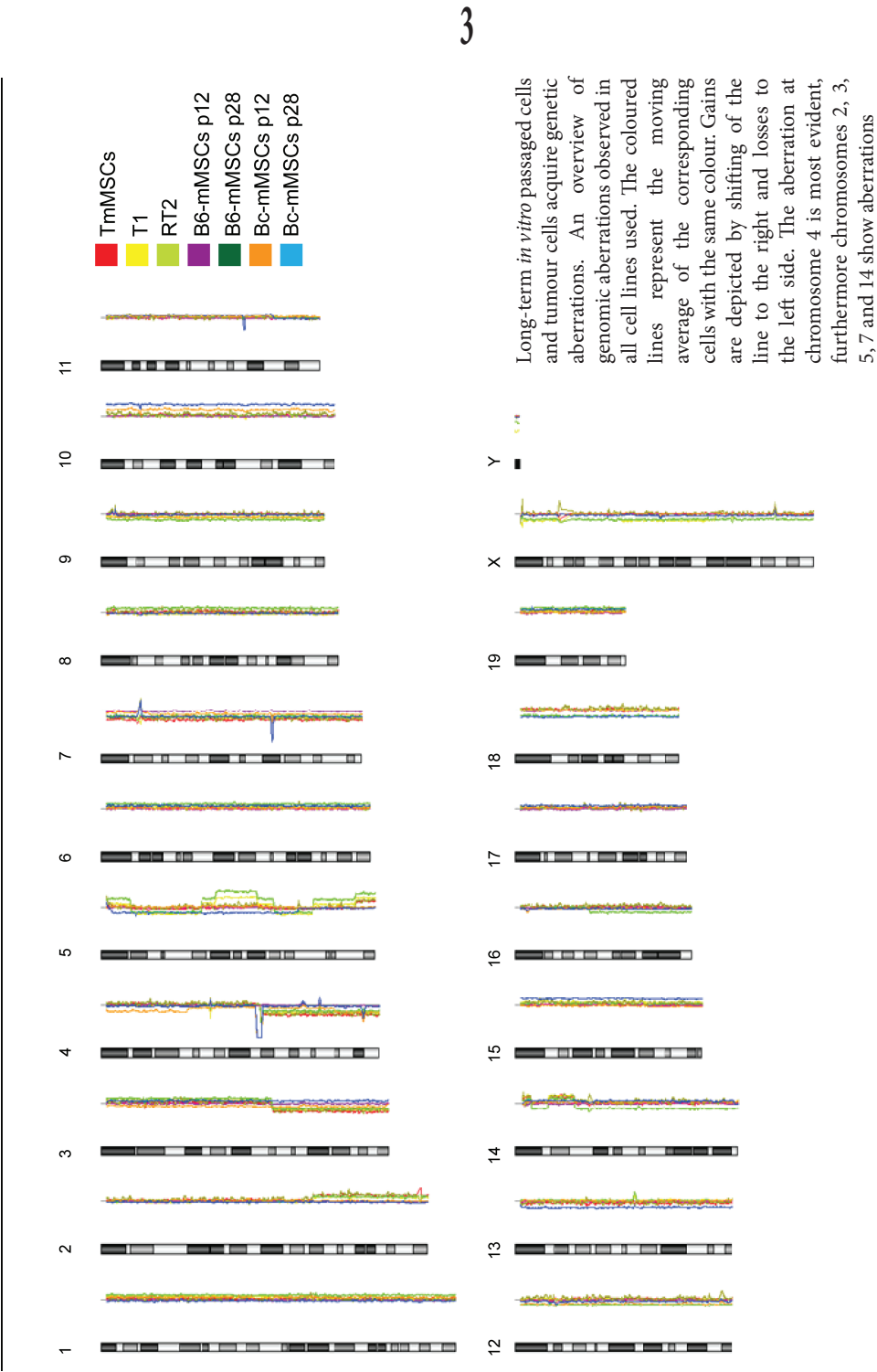
Age at diagnosis (years): mean 15.5, median 15.4, range 4 to 44

Duration of follow-up (years): mean 8, median 6, range 0 to 25

Date of diagnosis: January 1984 to September 2003

Location primary tumor:	n	%
Distal femur	40	45.5
Proximal tibia/fibula	27	30.7
Proximal humerus	10	11.4
Axial skeleton (costa)	1	1.1
Other long bones (distal tibia/fibula/ulna, proximal femur, diaphysis femur)	9	10.2
Hand	1	1.1
Histological subtype		
Conventional osteosarcoma	71	80.7
- osteoblastic	59	
- chondroblastic	9	
- fibroblastic	3	
Unusual	8	
Telangiectatic	6	6.8
High grade surface osteosarcoma	1	1.1
Small cell osteosarcoma	2	2.3
Histological response to pre-operative chemotherapy in the primary tumor		
Unknown (no pre-op chemo given or no resection of primary tumor)	12	13.6
Poor response	48	54.5
Good response	28	31.8
Metastasis		
No	38	43.2
Yes	50	56.8
- lung	46	
- bone	1	
- lung and bone	6	
- lung and other sites	4	
Sex		
Male	47	53.4
Female	41	46.6

<i>Antibody</i>	<i>Species</i>	<i>AR</i>	<i>Positive Control</i>	<i>Dilution</i>	<i>Company</i>
CDKN2A/p16	Mouse	Citrate	Tonsil	1;100	Neomarkers
CDKN2A/p14	Mouse	Citrate	Cervix carcinoma	1;50	Abcam
CDKN2B/p15	Mouse	Tris/EDTA	Brain (cortex)	1;50	Abcam
TP53	Mouse	Citrate	Colonicarcinoma	1;1000	Neomarkers
MDM2	Mouse	Citrate	FGFR7	1;40	Neomarkers
CDK4	Mouse	Citrate	Skin	1;40	Biosource
CHEK2	Mouse	Citrate	Duodenum	1;80	NOVO-CAST
CDKN1A/p21	Mouse	Citrate	Sigmoid	1;800	Calbiochem
BCL2	Mouse	Citrate	Tonsil	1;250	DAKO
Ezrin	Mouse	Citrate	Lung	1;2000	Abcam



General summary of the high grade osteosarcoma cases used

Total: 210 tumor samples of 127 patients
 100 pre-treatment samples of the primary tumor (biopsy) of 100 patients
 66 post-treatment samples of the primary tumor of 66 patients
 35 lung metastases of 22 patients
 4 "other meta" of 4 patients (2 bone metastases and 2 lymph node metastases)
 5 local relapses of 5 patients

Clinical information of these 127 patients:

Age at diagnosis (years): mean 16.5, median 15.5, range 4 to 44
 Duration of follow-up (years): mean 5, median 6, range 1 to 25
 Date of diagnosis: January 1984 to August 2009

Location of the primary tumor	n	%
Distal femur	60	47.2
Proximal tibia/fibula	36	28.3
Proximal humerus	14	11.1
Other	17	13.4

Histological subtype		
Osteoblastic	70	55.1
Chondroblastic	12	9.5
Fibroblastic	4	3.1
Unusual	12	9.5
Unknown (only characterized as conventional)	29	22.8

Histological response to pre-operative chemotherapy in the primary tumor		
Unknown (no pre-operative chemotherapy given or no resection of primary tumor)	17	13.4
Poor response	68	53.5
Good response	42	33.1

Metastasis		
No	59	46.5
Yes	68	53.5
- lung	63	
- bone	1	
- lung and bone	10	
- lung and other sites	5	
- bone and other sites	1	

Sex		
Male	70	55.1
Female	57	44.9

Name	Culturing condition		
	Medium	Serum	Other additives
Osteosarcoma cell lines [*]	RPMI 1640	10% FBS [†]	2% L-glutamine
Human MSC [‡] lines	Alpha-MEM	10% FBS	2% P/S [§] and 2% L-glutamine
C2C12	DMEM	10% FBS	1% L-glutamine
HepG2	RPMI 1640	10% FBS	2% P/S and 2% L-glutamine
PANC1	RPMI 1640	10% FBS	2% P/S and 2% L-glutamine

^{*} More information about specific osteosarcoma cell lines can be found in reference Mohseny et. al Lab Invest 2011.

[†] Fetal Bovine Serum

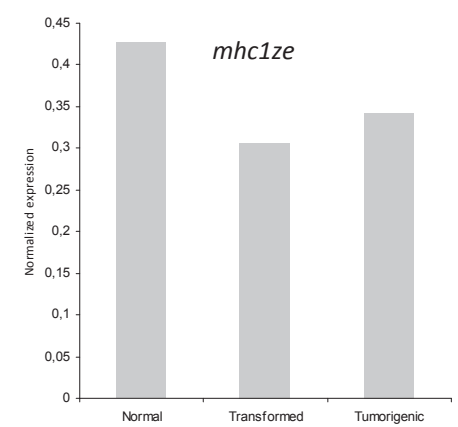
[‡] Mesenchymal Stem Cell

[§] Penicillin/Streptomycin

ID	Gene Symbol	Probe Sequence
1	<i>Tiparp</i>	TAGAGCTGACAGATGCTCAGTGAATCAGTCTGTTTAAGCACATTATCAGGGCTTCCACA
2	<i>BC038167</i>	GCCAAAGCTGAGAGTGGTCAAGCTCACTGGGATGCAAAATGTGCTGAGACTCCACACAGA
3	<i>Pcdha6</i>	GTTGACAGCGCATGTGAACATTGCTACATGTAGTGTGATCATTTTGGCCCACTGAA
4	<i>Anks1b</i>	TGTGCGGGATGTTTCTGGTTTCGTTTCAAATGACTACATTCCTACTGCTACTTGCCTTGA
5	<i>Plxna3</i>	ACTCACGAAGACTTCTGATGATTTGAGGAAGGCCATGTATAGTCCATTAGACAGATCCTTG
6	<i>Rhbdd1</i>	AGATGACTGGCATTGTATTTCAACATGGTGTCATGCTCTGGAAGGTGTGAAGCTGGA
7	<i>5730410E15Rik</i>	TCAGTTTGTCTTCGCTATTGATTTGCACATATAGTCAGTTGAAGCCTGTTCACTGTTT
8	<i>Ets1</i>	ACTTAGTGTAGTTACGGGGCGGTAAGTCTCTGCACTGAATGATTTCTGCAGCTCTTCTTA
9	<i>Mmp19</i>	GTGTTCTAGAAGGTGTCCACTTAATCTGAATCAGTCTCCAAATTCCTGTTTCTTCTTGT
10	<i>Atpbd4</i>	GTTGTAATCAGGTGTCAAGTGCAGCGATTGACCCCTTTTGTGTTTTATATATTCATTGTTT
11	<i>Kcnb1</i>	CTCAAAATGATTTCAGTATCTGTGTATCTGGGGCTTTAGTCTGAGAAGCTGTCAAGAGGA
12	<i>Fut7</i>	GGGTTGTGGAAGGACAGTGCAGATGATTCGGGCTTTTGACACCACAGTCCCCCAAGGA
13	<i>Efcab2</i>	CAGTGATGACCAGAGCCCTTGTAGAAAGAAATACAGACCAGCTGCTGAAGATATCCTTT
14	<i>Loxl4</i>	ACAGCGAGTCTGGTTGCACAACTGCCACACAGGAGATTCTACCGAGCCAATGCAGAGCT
15	<i>Matn4</i>	GGAGTTGCACGTGTCCTATTCTCCGGACTTTAGCACCATGACGCACCTGCTGGAGAATCT
16	<i>AK054375</i>	GAACAAAAGTTGGAGTCATGTATTTTGACCCCTGTTTTCTCACCAATATCCAATG
17	<i>Slc16a1</i>	GTCTGGAATGTGGTCATGTTTTTTGGACTCTTTACCCCTTTGGTCTTTCTTAGTAGTTA
18	<i>Smarca1</i>	TTTTTTGAAGCTTGCTGAGGTTTTAGCTTTTCTATGTTTTCTATGCCGCTGCTTTGAA
19	<i>Cdca7l</i>	TATATTGAAGAATGTTACTCTAAACTACCAAGTGCAATTAAACACACACTGTGAGTAAG
20	<i>Kctd12</i>	CGTGGTCTAATTTCTATGGCCGTTCCATGGAATGCAGTTATTACGTTAAAGCCATGTAT
21	<i>Chrna10</i>	TTGCTTGTCAACCTTAGCAGTTGCTATTACAGATTCTCATCTTGCTTCTCACTGCTAGGC
22	<i>Gphn</i>	CTGCTCTTAGCTAAAATCTCAATTATATGTTATGTGCGGTTGTATTGTTCCAGTAAG
23	<i>Glrp1</i>	TCCATGAACAGGTAGAAAACACTGGCACCTTTTGGCATTTGCATTTCAGAAATTAACCAA
24	<i>As3mt</i>	AGGGACATGAAAAGGAACTAAATTTTCGATGCAAAATTCACATTCGAAGGCGGAAGCTG
25	<i>BC031353</i>	TCAGTTTTCCACCAAGATGTTGATGAGGGGGACAACCTTAAAGATATTTGCTCAGTACCCAA
26	<i>Mxd4</i>	ACTGTTTTGTCTTTTATATGTAAGTGTGTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
27	<i>3021401N23Rik</i>	TGCACAAAGCCCTTAAAAAATGTTGTTGCTTTCTCTCTGTAAGGTAATTCCTGGTAG
28	<i>Pcdhb17</i>	CTCTGCAGTTAATGCATTGCTGCTGAAACTTTTCTAGCACATTGTTTTCTCTCTCACTTGC

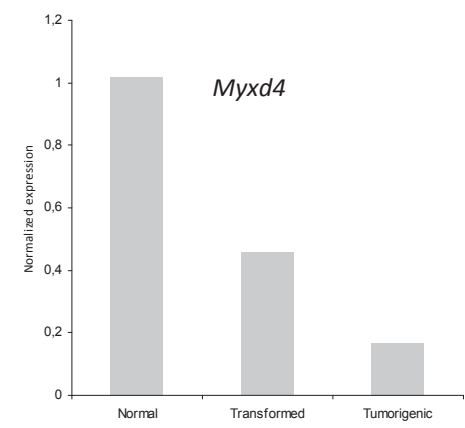
ID	Gene Symbol	Probe Sequence
1	<i>krf4</i>	ATGAGATCAACTTCCTCAGGGCAGTCTACGAGGCTGAACTCCGGAGCTCCAGTCTCAGA
2	LOC560651	CTCTCTACGCCATTCCCAAAAGATTGGCAAAAGGAATGGACGCAAAATCAGCTAAA
3	TC308952	AGACTTTAGTAACCCAACTCTCTCAGATAAATAGATAGTGTGAGGAGGATTAATCTTC
4	<i>zgc:110410</i>	GCAGTGGGTGCAACGGCTTTGGTGTCACATTGCAATGAGTTGTTTTACACAGCTCTAAA
5	<i>hm:zehn2354</i>	CCGTGCTGAGGCTGAGTCTGTGTAACAACAGATTTGAGGAGATGCAGTCTCTCTGGCAA
6	<i>zgc:153275</i>	GCCAGCTATGAAAAAAGAAATCGAGAAAAAGTTGGTTCAATCAGGCAAGGAGGAGAAGCCT
7	<i>rpl10</i>	TGTTAAATCGTCATTTGGTGAGAAGTTTCTGAGGTCACTGCAGCGTCTCCATCTACCAA
8	<i>tacstd</i>	CTGTTTTCCGATGAAAAACCAATTTGTGCTTAGTGTTCAGGGAAAAAATGTTACAATGGAG
9	<i>A_15_P120671</i>	GAAACCCCTGACGTCGTCTACAATGATTGTCTGTGTAAGTAAAGTAAAGTGCCAGTAAATGAGG
10	<i>si:dkeyp-89c11.1</i>	GCATCTTTGAAGTCTTGGAGGACATGAAAAGGCGAATGGTAAAGTGCCAGTAAATGAGG
11	<i>tacstd</i>	ATCAAAGTTAAGCCCTGTTTTCCGATGAAAAACCAATTTGTCTTAGCATTCAGGGAAAA
12	TC335902	AGCTGATATCGTTGAAAAATACGCCAACCCGAATGTACTCAGACACCCAGGTCGTTTCATGTT
13	<i>ppt1</i>	TTTCGTAACCTACCGTCTCAGATACATAAGCAATGCTTGTATAGAAATGAAGCCAGTCTTG
14	<i>zgc:136396</i>	AAATGGAGCTTAAGTTCACACAACATAAACCTGCTTTTGGTGCGGCTCATGAATTCGGG
15	<i>zgc:113413</i>	AGACATCGACTGCATGGGGTTCATGTTTCTCTATGCAGTTCAGTCATCAGTCTCACCAA
16	<i>scel</i>	GAGCTCTGAGAAATCTCACACCACATCATCAATCATGACAACCTAACACAAAACTGAAAT
17	<i>mhc1ze</i>	AAGTGAGTGCCGCTAACTAAACGGGAACCAATTGAACCATCCGTGAAGGAGTCCAAAAATA
18	TC346768	CTCCTTCAAAATGATGCTTCTCGCCAGTCGTGCTCAGGAGTGCCTGGTAGTGTCT
19	<i>cpb1</i>	GACTGTGGTTTTTCATGCCAGAGAAATGGATCACCCATGCTTTCTGCCAGTGGTTTGTAAAT
20	TC306742	TCGCACACAGACTGTGGGTCAACCTCGCCACAGACAGCTTAAACAAGCTTTGTGCCTGTGGT
21	<i>col10a1</i>	TAGTTCTGTACTTCAGTCAATGAGCAGGACAGATCTTGTACATGCAGATCCCCGATGATGA
22	<i>zgc:92414</i>	ACCACTCTGACTGGATGCAAAAGACAGATCTCTGTACTCTGTCTATGCAAGATGGCG
23	ENSDART00000063484	GAGATCAACTTTCTGAGAACCAATTTATGACAAGGAATTCGCTGAGCTGCAGGCCAGCATT
24	ENSDART00000060266	ACCCATTACATTAACTGCACGGCCAGTTGGAATGTTGATTACATTCAGTTGGATGTTG
25	<i>agt</i>	TGTATAGTAAATCAATGGACAGCATTAAGACCAGGTCAACCGGTGATATGTTTGTTTAGA
26	TC360850	CAGCAGCAGAAAGGAGGAGGAGAGTTAAACCATTAACGACTGCAATAGTTTAAACAAACA
27	<i>zgc:91968</i>	GGTTTATTGAGGAATGTGGAGATTGTACGTGTGAGATGCGGAAGAGAAATTTGAATAAAAA
28	<i>cpa5</i>	CAACTCATTCATGGACATGCTTGTGCGAGAGAACAGGAACATGGTCAGCAAAAGTTGTGAT
29	<i>apoa4</i>	TGTTTACACATTAGCCATCCCACCAGATGCAGAAATTCACATCACTTTCTAACTGTTGTG
30	<i>zgc:111983</i>	GAAAAGTTATCAAAACTACATCAGGATGATTATTAAGAGCTGAGTCTGGCTCTGTTGC
31	<i>zgc:92414</i>	CTGTCTATGCAAGATGGCGCTACAACACGATAAATGTGGCATTTGACGCTGCATGGAATA

32	CN840652	GTAAAGAGAGAAATGTGTGCTGCTGCTGCTGACAAATGCTGTCAAGTCAAAATGCATATAT
33	ENSDART00000090400	GACCTTTCTCACAAGCCATAGACAAACTCAACAAAGATTACCAAGGATGAGCGGATT
34	<i>fgb</i>	ATCAGTACACAGACAGCTTAGAAACCCAGCATGCTTATATTAAAGACACGGTGACGCTCA
35	BC092811	AGCATGCCCTAAAGCAGCTGCCCTTTCGAGTCTACTACTGTAAATGTGCTTTGTCTGTAT
36	<i>krt4</i>	ACCATTCAATGTTTCAGCAGACCTCCGGAGGTGTTTCATCTGTTATGGTGTAGCGGCTCT
37	<i>krt4</i>	ATCAGAGACACCGCTGGTCAGTATGATGATGACCTCCGCTCAACAAAGGCTGCGATTGCT
38	TC330190	TCATTCAATTGTATGCTGCTGTTATTCAGTTCACCTGGTATGTTTATGCTTGTCTTCAA
39	<i>zgc:110304</i>	TATTGGGTTTCGTAGAAATGAAGCACAAGGCGTGGATGTGCCATTGATGCCACCAAA
40	<i>ace2</i>	ACACCGGTCCCTTTACAAATGTGACATTACAACTCAACCAAGCTGGTGACAACTCA
41	<i>facstd</i>	TTCCGATGAAAAACCACTTTGTCTAGTGTTCAGGGAAGGAAATGTACAAATGGAGAAATGT
42	<i>zgc:91794</i>	GTTCTGATCACCCCTATTGAGAGAAATGTGAAATGTATTGATGCTCTTTAATAAAGGC
43	CN327405	ACTCCGAAAAAGTCATCAGACACCCAGAGGAACAAAGCCCGGTGTTTACGCCAAGGTCTG
44	<i>zgc:111983</i>	TAAGCTTCACATTCACTGCAGCAAAAAACCCACATCATCTACTACACAACAATCATGGT
45	<i>caspb</i>	GTATGGAGAAAGATCAACGTTTCAAAGGTCAGGCGAAACTCTTGCCGTGCATTGAAAGGA
46	<i>zgc:64031</i>	TAACTAGAACTTATTATAGTTTGATTATAATCATATCAATGTACAACAAATAAACCCATA
47	<i>foxl3b</i>	AGGTGTAGGATGGGAAGCAGACGACAGACAAGCTGATCAACCAATTCATGTTACTGACTA
48	TC361450	ATAAATATGACGGACTGAGGACAGTTTTTCATCAAGAGTGGAGAGCTTCATCAAAATCGCT
49	<i>zgc:153896</i>	ACGCACGTACCGATCATCTTAACGTCACTTCTACCTCAGATCAGGGAATGACCACATTAA
50	BC117617	TTCAATGCCGCTCATTTCCACATCAAGTTTTTCGCTGGTGTCATTTTCAGGCATGATTGTT
51	<i>ela2l</i>	CAAACTGGAGATTGCTGTTACCATAGGGACACCAATCACTCCTGCATGCTTCGGGAGGC
52	<i>zgc:92414</i>	ATATCTGAGTAAGACTCCAGTGGTTCACAGTGGTCTAAAAGACATGAAGGTATTGAAGAC
53	<i>zgc:101673</i>	CAAGGATACGACCTTCCTCGGGAACTACAATCATAGTAACCTCACAGCAATTTTCAGC
54	TC324091	GAATGTTTCGAGCGCTGGTTGTTCTATTTTCAATATATTGACTTCTCGAACGGTGT
55	<i>mhc1ze</i>	ACAACCCAGGAACCAAGCGAAGAAATGGTCGAGTTTTGATGAAGGACCCGGTGTTTAAA
56	<i>amy2a</i>	GAATCAGCAACCAAGGAGGAAGACCCATTCATAGCCATTTCATGCAGACTCCAACCTTTAAA
57	<i>gpx4a</i>	AGAGGACAGATGAAGAGACATGCTTTTATTAGCACTAAACATGCTGATGTAGTGTACAT
58	<i>zgc:91908</i>	GCTTGGTGGACTGATTACAACATCAAGTACAGGAACCCCTTCATTTGTCAACGGCTCTTTA
59	<i>MEP1A</i>	CCAGTGTGCTTTTGAAAAAGATCAACATCTGTGGGATGGTACAGAGTTCGACTGATGATGG
60	<i>apo4</i>	TGTATCTGATACTTGCCTTTGTGGCAATCACAGGTGTCAGGCCAACCTATTCTATGCTG
61	ENSDART00000027072	ATATGGGATGGAAGCAACGTCACGTGCTTTAATGGTTTTCTCCTTTATGACATGTAATA
62	<i>zgc:92137</i>	AGTTTAAACACAGTGCGAAAAATAGGCACAGCGGTCCGTAATGGGATGGAGAGAAAGCTAA
63	<i>cel.1</i>	TGTCCTTGGGCCATCAGCAGAAAAATCCAAGACAATTTGCTGAGGAGATTGCAACCAAAAGTA



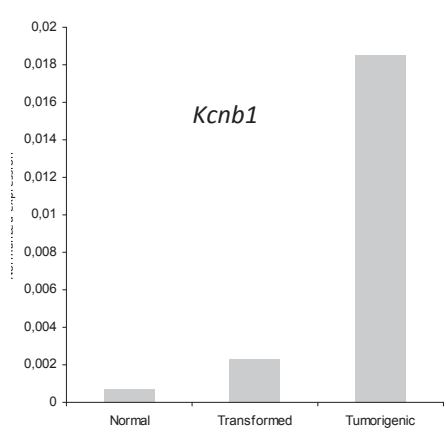
Correlations			mhc1ze_Array	mhc1ze_RTPCR
Spearman's rho	mhc1ze_Array	Correlation Coefficient	1,000	1,000
		Sig. (2-tailed)	.	.
		N	3	3
	mhc1ze_RTPCR	Correlation Coefficient	1,000	1,000
		Sig. (2-tailed)	.	.
		N	3	3

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Correlations			Myxd4_Array	Myxd4_RTPCR
Spearman's rho	Myxd4_Array	Correlation Coefficient	1,000	1,000
		Sig. (2-tailed)	.	.
		N	3	3
	Myxd4_RTPCR	Correlation Coefficient	1,000	1,000
		Sig. (2-tailed)	.	.
		N	3	3

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Correlations			Kcnb1_Array	Kcnb1_RTPCR
Spearman's rho	Kcnb1_Array	Correlation Coefficient	1,000	1,000
		Sig. (2-tailed)	.	.
		N	3	3
	Kcnb1_RTPCR	Correlation Coefficient	1,000	1,000
		Sig. (2-tailed)	.	.
		N	3	3

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).