대한정형외과연구학회지 제 7 권 제 2 호
J. of Korean Orthopaedic Research Society
Volume 7, Number 2, October, 2004

골육종 세포주에서 ERK1/2 활성화에 의한 matrix metalloproteinase 2 활성화와 ezrin 발현 조절

연세대학교 BK21 의과학사업단, 연세대학교 의과대학 정형외과학교실

신규호 · 최연락 · 선현진 · 이진우

= Abstract =

ERK1/2 Activation Modulates Matrix Metalloproteinase 2 Activity and Ezrin Expression in Osteosarcoma Cell Lines

Kyoo Ho Shin, Yon Rak Choi, Hyun Jin Sun, Jin Woo Lee

Brain Korea 21 project for medical science
Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: In this study, we aimed to investigate the influence of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal pathway and related factors of metastatic property on the osteosarcoma cell lines.

Materials and Methods: Osteosarcoma cell lines, MG-63, HOS, U2OS, SAOS-2, and osteoblast-like cell line, MC3T3-E1 were used for evaluating the activation of MAPK signal pathway and the effect of ERK1/2 inhibiton by 15 μM U0126 for 6 days. Then we measured the activity of matrix metalloproteinases (MMP) by gelatin zymography analysis.

Results: ERK was strongly activated in three osteosarcoma cell lines, MG-63, HOS, U2OS, and was weakly activated in SAOS-2 cell line. MMP2 was strongly activated in MG-63, HOS, U2OS cell lines. However, SAOS-2 cell line, in which ERK1/2 was weakly activated, showed weak activation of MMP2. When the ERK1/2 was inhibited by U0126 for 6 days, the ezrin expression was remarkably suppressed in all osteosarcoma cell lines. These data showed that the suppression of ezrin expression might be dependent on the ERK1/2 activation in osteosarcoma cell lines.

Conclusion: Our results suggested that the ERK1/2 activation might be related to the activity of MMP2 and the suppression of ezrin expression in osteosarcoma cell lines. We suggest that ERK1/2 activation might be closely related to the ezrin expression and the ezrin expression might play an important role in the activation of MMP2 which is known to involve in the activated MMP2 involves in early metastatic properties in osteosarcoma.

Key Words: Osteosarcoma, Metastasis, MAPK signaling pathway, ERK1/2, Ezrin, Matrix Metalloproteinase 2, MMP2

※ **통신저자: 이 진 우**
서울특별시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 정형외과학 교실
TEL: 02) 361-5640 FAX: 02) 363-1139 E-mail: ljwos@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 연세대학교 의과대학 2003년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음. (과제번호: 6-2003-0012).

서 론

골육종은 미분화된 간엽조직에서 기원하며, 악성 기질세포에 의해 악성 유골이나 직골, 또는 두 가지 모두 형성하는 악성 골종양을 말한다. 골육종은 대체로 골과 골 표면에서 발생하는 표재성과 중심성으로 분류하는데, 그중 골 내부에서 발생하는 중심성 골육종은 대부분 소아와 청소년에게서 발생하고, 보다 악성을 보이지만, 골 표면에서 발병한 골육종의 경우는 대체로 좋은 예후를 보인다[11]. 골육종의 치료 원칙은 수술적 절제 및 항암요법을 병행하는 것으로 최근 생존률이 점차 높아지고 있지만, 전이가 잘 일어날 수 있고, 조기에 전이가 발생할 수도 있다. 또한 치료 후에도 국소 재발의 위험이 있어 아직까지 치료법에 대한 논란의 여지가 많다. 그러므로 분자생물학적 기전과 골육종의 발생, 진행, 전이에 이르는 기전 등에 대한 연구와 더 나아가 치료법의 개발이 필요하다.

분자유전학적 측면에서 골육종의 생성에 관해 밝혀진 바는 크게 두 가지로 구분할 수 있는데, 첫째는 유전적 불안정성으로 인해 골육종의 억제 유전자들이 위치한 염색체 22q12.1, 18q21-q22, 13q14.1-q14.2 부위에 염색체 변형이 빈번하여 골육종 및 골 질환에서 중요 역할을 하는 억제유전자의 발현을 억제하거나 비정상적 발현을 유도시키는 것으로 알려져 있다[1,8]. 현재 골육종과 Paget's disease와의 연관성을 근거로 골육종의 기원이 Paget's disease라고 생각되어지고 있지만, 인간 골육종에서 Rank 유전자의 이상 발현 또는 돌연변이는 아직까지 밝혀지지 않았고, 골육종의 생물학적인 작용 및 반응과 환자의 임상적인 회복에 관해서는 거의 밝혀진 바가 없다.

두 번째는 특정 역할을 수행하는 억제 또는 조절유전자 부위가 돌연변이로 인해 직접 영향을 받을 것으로 생각되어지고 있다[6]. 세포주기에 관련된 억제 유전자 (Rb1, p16 등)의 돌연변이 유발과 세포주기에 관련된 주요 조절인자인 p53, CHK2 (CDS1, Rad53) 같은 유전자들의 돌연변이가 빈번하고, 반면에 HDM2같은 유전자의 활성이 증가함으로써 세포주기 조절의 불능이 야기된다는 연구결과도 발표되었으며[9], 골육종의 발병 또는 진행에 관한 세포주기 또는 신호전달계 등의 영향에 관한 연구들이 활발히 이루어지고 있다. 이런 초기 분자유전학적 기전에서 골육종의 생성 또는 골육종으로의 진행을 유도시키고, 이렇게 유발된 비정상적인 세포의 영향으로 인해 골아세포의 골육종 생성 및 진행의 기전에 관해 다각적인 측면에서 연구들이 시도 되어지고 있다. 이중 mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 세포막 수용체와 연계되어, 외부환경 또는 스트레스 등 다양한 자극에 의해 세포에 중요한 조절작용을 하는 것으로 밝혀져 있다. 그로 인해 세포의 발생, 생존, 증식, 분화 등 다양한 신호를 전달하게 된다[10]. 일부 연구에서 stress-activated protein kinase (SAPK, JNK) 신호전달을 통한 골 관련 종양의 발생과 진행, 그리고 골 형성의 조절에 SAPK의 신호전달의 역할에 관한 발표가 있었고[4], JNK 신호전달계의 활성을 통해 c-jun과 c-fos의 발현이 증가하고, cbfa1단백과 결합하여 골아세포의 분열과 성장에 영향을 준다고 보고되었다[3]. 반면에 골육종에서 MAPK가 Ras단백의 영향을 받아 세포증식에 영향을 주게 되고, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)의 신호를 받아 Akt를 통해 골육종세포의 migration을 유도시킨다는 결과를 보여 주목을 받았다[2]. 일부에서는 골육종 세포주에서 JNK의 활성이 활성화된 signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)의 억제를 통해 세포사멸이 촉진된다는 결과가 발표되었다. 이처럼 골육종에서 MAPK 신호전달계의 영향에 관해 많은 연구들이 행해졌지만 아직은 다양한 가능성만 제시할 뿐 더욱더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

또한 많은 연구에서 골육종화에 필수적인 matrix matalloproteinase (MMP)의 발현 및 조절의 이상을 통해 골육종 등 골 관련 질환에 중요한 기능을 수행한다는 연구들이 발표되었다[10]. 이와 관련된 MMPs로는 MMP2, MMP9, MMP13(Collagenase-3), MMP-14, MT1-MMP(MMP40) 등이 발표되었다. 그러나 MAPK와 MMPs와의 상호연계성에 관한 중요성은 제기되고 있지만, 아직은 많은 연구가 이루어지지 않고 있으며, 관련 인자들에 관한 연구도 미

흡한 실정이다.

쥐의 폐에서 전이된 골육종 세포를 관찰한 연구에서 ezrin 발현이 폐까지 도달하는 종양세포의 초기 생존에 높은 유용성을 제공하며, ezrin 발현 감소시 AKT와 ERK의 인산화 활성이 줄어들지만, ezrin과 관련된 초기 전이로 인한 생존이 부분적으로 MAPK의 활성과 연관이 있으나, AKT와의 연관성은 없음을 밝혔다[5]. 그리고 쥐 모델 이외의 개에 자연적으로 유발된 골육종에서 높은 ezrin 발현이 초기 전이의 발전과 연관되고, 골육종 환자들에서도 높은 ezrin 발현이 병의 진행과 연관된다는 것을 밝혔다[5]. 본 연구에서는 골육종에서 MAPK 신호전달계의 MMP 활성과 전이능 관련인자들에 대한 영향에 관해서 밝히고자 하였다.

대상 및 방법

1. 골육종 세포주 배양

골육종 세포주인 MG-63, HOS, U2OS 세포주는 10% 우태아혈청 (Gibco, Carlsbad, CA, USA)과 1% antibiotic-antimycotic (Gibco, Carlsbad, CA, USA) 용액을 함유한 DMEM (Gibco, Carlsbad, CA, USA) 배지에서, SAOS-2 세포주는 20% 우태아혈청과 1% antibiotic-antimycotic 용액을 함유한 McCoy 5A (Gibco, Carlsbad, CA, USA) 배지에서, 골아 세포주인 MC3T3-E1은 10% 우태아혈청과 1% antibiotic-antimycotic 용액을 함유한 MEM-α (Gibco, Carlsbad, CA, USA) 배지에서 37℃, 5% CO_2의 조건에서 배양하였다.

2. 골육종 세포주의 ERK 활성 및 억제효과 분석

골육종 세포주는 우태아혈청이 배제된 배지로 세척 후, 24시간 동안 동일 배지에서 배양되었다. 특이적인 ERK 인산화 억제제인 15 μM U0126 (Promega, Madison, WI, USA)을 6일동안 처리하였다. 세포를 4℃ Phosphate-buffered saline (PBS)로 두번 세척 후 세포를 1% aprotinin, 1 uM leupeptin, and 1 mM sodium orthovanadate가 함유된 1X passive lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA)에 녹인 뒤, 4℃ 12,000 rpm에서 30분간 원심분리를 시킨후 단백이 용해된 상등액만을 취하였다. Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 방법을 이용하여 단백질을 정량한 후 실험전까지 -70℃에 보관하였다. 세포 균질액을 2X sample buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 혼합하여 90℃, 2분간 denaturing 시켰다. 10% SDS-PAGE로 전기영동후 PVDF에 옮겼다. 5% skim milk 가 함유된 Tris-buffered saline-Tween 20으로 비특이적 결합 부위를 차단 시킨후, anti-phospho ERK1/2 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), anti-ERK1/2 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), anti-ezrin (Sigma, Saint Louis, MO, USA), anti-α-tubulin (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), anti-GAPDH (Research Diagnostics Inc, USA)의 항체를 1:5000 희석하여 사용하였으며, 이차 항체를 반응 시킨후 ECL-Plus (Armersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)로 측정하였다.

3. 골육종세포주에서 세포외기질 분해효소의 활성 측정

세포 추출액을 nonreducing sample buffer (10% SDS, 4% sucrose, 0.25 M Tris-HCl [pH 6.8], with 0.1% bromophenol blue)와 혼합후, 세포외기질 분해효소의 양성 대조군인 Gelatinase zymography standards (Chemichon, Temecula, CA, USA)와 골아세포 및 골육종 세포추출액을 1 mg/mL gelatin (Sigma-Aldrich)이 함유된 10% SDS-PAGE에서 전기연동 시켰다. 전기연동후 젤을 2.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 5 mM CaCl2 용액으로 30분씩 세번 세척하여 젤에 존재하는 SDS를 제거하였다. 다시 3회 collagenase substrate buffer (50 mM Tris, 0.2 M NaCl, 5 mM CaCl2, 0.2% Brij-35, pH 7.6)로 세척후, 37℃, 18시간 동안 흔들어주며 반응시켰다. 반응후 Coomassie blue R-250 (Bio-

Rad)로 염색후 탈염색시켜 gelatinolytic band를 관찰하였다.

결 과

1. 골육종 세포주에서 MAPK 신호전달계의 활성 분석

골아세포주 (MC3T3-E1)와 골육종 세포주 (MG-63, HOS, U2OS, SAOS-2)로부터 얻은 세포 추출액을 Western blotting 방법을 이용하여 MAPK 신호전달계 (ERK, JNK, p38)를 관찰한 결과 골아세포와 비교해 대부분의 골육종 세포주 (MG-63, HOS, U2OS)에서 ERK의 강한 활성이 관찰되었고, 골육종 세포주인 SAOS-2 세포주에서 약한 활성이 관찰되었다. JNK, p38의 경우는 뚜렷한 활성의 증가는 관찰되지 않았다. 또한 약한 ERK 활성을 보이는 SAOS-2 세포주에서 αtubulin의 발현이 다른 골육종 세포주나 골아세포주에 비해 아주 강하게 발현되는 것을 확인할수 있었다 (Fig. 1A).

2. 골육종 세포주에서 세포외기질 분해효소의 활성 측정

골아세포주 (MC3T3-E1)와 골육종 세포주 (MG-63, HOS, U2OS, SAOS-2)로부터 얻은 세포 추출액을 gelatin zymography를 이용하여 세포외기질 분해효소의 활성을 측정하였다. MAPK 신호전달계중 ERK1/2의 강한 활성을 보이는 MG-63, HOS, U2OS 골육종 세포주에서 Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2)의 강한 활성이 관찰되었다. 약한 ERK1/2 활성을 보이는 SAOS-2 세포주에서는 약한 MMP2의 활성을 보였고, 상대적으로 골아세포에서는 아주 약한 활성을 보였다(Fig. 1B).

3. 골육종 세포주에서 ERK1/2 활성 억제를 통한 ezrin 발현의 관찰

최근 골육종 세포주와 골아세포에서 초기 전이능 관련 단백으로 알려진 ezrin의 발현과의 연관성을 관찰한 결과, 모든 골육종 세포주에서는 골아세포와 비교시 상대적으로 높은 ezrin 발현이 관찰되었다. 또한 ERK1/2의 인산화 억제가

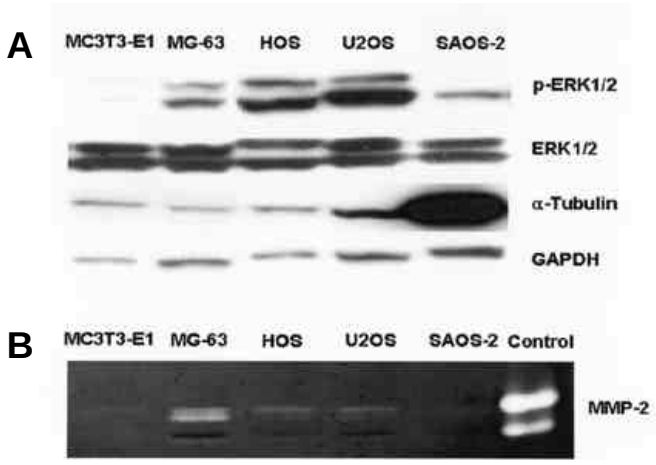

Fig. 1. ERK1/2 activation in osteosarcoma cell lines and zymography of osteosarcoma cell lines and osteoblast-like cell line. (**A**) ERK1/2 was strongly activated in three osteosarcoma cell lines, MG-63, HOS, U2OS, and was weakly activated in SAOS-2 cell line, but wasn't activated in MC3T3-E1 osteoblast-like cell line. But, SAOS-2 cell line was remarkably overexpressed αtubulin, which is a cytoskelectal protein. (**B**) MG-63, HOS, U2OS cell lines showed high ERK1/2 activation. MMP2 seemed to be activated in these cell lines. But SAOS-2 cell line, which weakly activated ERK1/2, showed weak activation of MMP2.

ezrin 발현에 대한 영향을 관찰하기 위하여 6일 동안 U0126으로 ERK1/2 인산화를 억제하여 실험을 진행한 결과, 모든 골육종 세포주에서 ezrin의 발현이 현저하게 억제되었다(Fig. 2).

고 찰

미분화된 간엽조직에서 기원하는 것으로 알려진 골육종은 최근 외과수술의 발달과 화학약물 치료의 발달에 힘입어 생존률이 크게 증가하고 있다. 그렇지만 골육종의 재발, 전이, 외과수술의 어려움, 효과적인 치료법의 부재 등과 같은 임상적인 문제가 여전히 해결해야할 문제로 남아있다[7]. 최근 분자유전학적인 측면에서의 연구가 비교적 활발히 진행되고 있지만, 골육종화의 기전 및 진행에 관한 연구가 아직까지는 부족한 실정이고, 치료법에 있어서 다양한 시도가 이루어지고 있지만, 여러 기전을 응용한 치료에 관한 연구가 과제로 남아있다. 골육종 치료의 여러가지 문제점에서 전이에 관한 분자생물학적인 기전 및 전이능에 연관된 관련인자에 관한 이해는 상당히 부족한 실정이며[7], 이는 골육종의 치료에 있어서 반드시 선행되어야 할 부분이다. 전이와 관련된 신호전달계로 MAPK 신호전달계와의 연관성에 관한 연구들이 일부 제기되고 있으며, 이 MAPK 신호전달계중 ERK1/2의 역할에 관해 많은 관심을 모으고 있다[10]. 또한 최근 골육종에서 전이와 관련된 인자들을 밝히기 위한 연구들이 시행되고 있지만 명확한 결론을 내리지 못하고 있는 상황으로, MAPK 신호전달계와 전이와의 직접적인 연관성 및 기전에 관한 연구의 필요성이 시급한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 신호전달계에서의 분자생물학적인 이해를 돕고자 골육종에서의 MAPK 신호전달계를 살펴보고, 이를 통한 세포의 영향 및 MMP 활성과 관련된 기전을 밝히고자 하였다.

실험 결과, 골아세포주 (MC3T3-E1)와 골육종 세포주(MG-63, HOS, U2OS, SAOS-2)를 Western blotting 방법을 이용하여 MAPK 신호전달계 (ERK, JNK, p38)를 관찰한 결과 골아 세포와 비교시, 대부분의 골육종 세포주 (MG-63, HOS, U2OS)에서 ERK의 강한 활성이 관찰되었고, 일부 골육종 세포주인 SAOS-2 세포주에서 약한 활성이 관찰되었다(Fig. 1A). 이는 골육종 세포주에서 ERK1/2의 활성이 밀접한 관련이 되어지는 것으로 보이고, SAOS-2 세포주와 같은 일부의 골육종에서는 약한 ERK1/2의 활성을 보이지만, 또 다른 기전의 영향을 받을 것이라 생각할 수 있다. 한 예로 SAOS-2 세포주에서 α tubulin의 발현이 현저히 증가한 것이 관찰되었다. 이는 일부 골육종 세포주인 SAOS-2 세포주의 경우 세포의 motility와 같은 다른 기전을 통해서 세포가 영향을 받았을 것으로 생각할

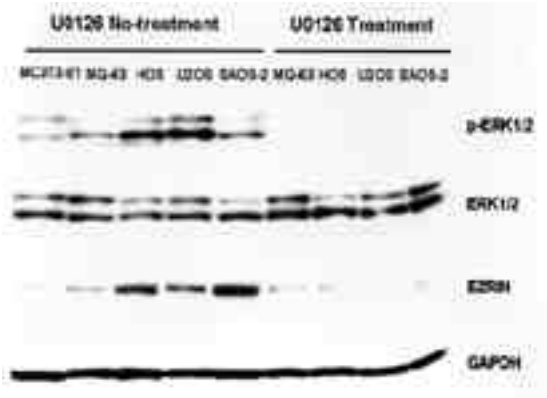

Fig. 2. The supression of ezrin expression was dependent on the ERK1/2 activation in osteosarcoma cell lines. When the ERK1/2 was inhibited by U0126, the specific ERK1/2 phosphorylation inhibitor, the ezrin expression was strongly suppressed in all osteosarcoma cell lines.

수 있다. 그렇지만 ERK1/2의 약한 활성을 보인 SAOS-2 세포주를 포함하더라도 모든 골육종 세포주에서는 MAPK 신호전달계 중 ERK1/2의 활성이 전체적으로 관찰되었다. 이를 통해 골육종 세포주의 세포 증식 및 전이 등에 ERK1/2가 영향을 끼쳤을 것이라 추측할 수 있다. 하지만 SAOS-2 세포주에서 α-tubulin의 강한 발현과 그의 영향에 관해서는 앞으로 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

골육종 세포주에서 MAPK 신호전달 활성화의 연관성을 살펴보기 위해, 세포외기질 분해효소의 활성을 gelatin zymography를 이용하여 관찰하였다. MAPK 신호전달계중 ERK1/2의 강한 활성을 보이는 MG-63, HOS, U2OS 골육종 세포주에서 Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2)의 강한 활성이 관찰되었다. 약한 ERK1/2 활성을 보이는 SAOS-2 세포주에서는 약한 MMP2의 활성을 보였고, 상대적으로 골아세포에서는 아주 약한 활성을 보였다(Fig. 1B). 이는 골육종세포주에서 MAPK 신호전달계 중 ERK1/2의 활성과 아주 밀접한 연관성을 보여주고 있다. 또한 MAPK 신호전달계에 의해서 일부 세포외기질 분해효소의 활성이 조절된다는 보고가 이미 발표되었다[10]. 이를 종합해 볼 때 골육종 세포주에서 MAPK 신호전달계 중에서 ERK1/2가 강하게 활성화되고, 이렇게 활성화된 ERK1/2는 다시 MMP2의 활성을 조절하여 세포외기질의 활성을 높여주게 되며, 이렇게 활성화된 MMP2는 골육종을 비롯한 각종 암 질환에서 문제가 되는 전이능을 높여주게 되는 것으로 사료된다.

골육종 세포주에서 ERK1/2 활성과 관련된 인자를 규명하기 위해 인산화 억제를 시행하여 관련 인자를 관찰하였다. 골육종 세포주와 골아세포에서 초기 전이능 유발 단백으로 최근 알려진 ezrin[5]의 발현과의 연관성을 관찰한 결과, 모든 골육종 세포주에서는 골아세포와 비교시 상대적으로 높은 ezrin 발현이 관찰되었다. 또한 ERK1/2의 인산화 억제를 통한 ezrin 발현에 대한 영향을 관찰하기 위하여 6일 동안 U0126을 처리한 결과, 모든 골육종 세포주에서 ezrin의 발현이 현저하게 억제되었다 (Fig. 2). 이를 통해 골육종에서 MAPK 신호전달계 중에서 ERK1/2의 강한 활성이 유도되고, ERK1/2의 활성에 의존적으로 세포외기질 분해효소인 MMP2의 활성이 증가되었다. 이를 통해서 ERK1/2의 활성이 직접적으로 골육종의 전이능에 영향을 미칠 것으로 사료되며, 다른 한편으로 ERK1/2의 활성에 의해서 기존의 ERM(ezrin-radixin-moesin) 한 구성성분인 ezrin이 세포내에서 신호전달의 매개체로서 작용하게되고 이로인해 골육종에서 전이능과 관련된 간접적인 작용을 하는 것으로 사료된다. 일부 연구에서 최근에 ezrin 발현이 종양에서 초기 전이시 생존에 도움을 주고, ezrin 발현이 억제될 때 AKT와 ERK 인산 활성이 감소함을 밝혔다[5]. 그러나 어떻게 ezrin이 초기 전이와 골육종의 전이능에 관련되는지는 밝혀져 있지 않다. 본 연구를 통해서 ERK1/2의 활성에 의해 골육종에서 전이능 연관인자로 알려진 ezrin 발현이 조절되며, 또한 ERK1/2의 활성을 통해 세포외기질 분해효소인 MMP2의 활성이 조절될 수 있다는 결과는 앞으로 골육종 및 암 질환에서의 전이에 관한 연구에 큰 도움을 줄수 있을 것으로 기대된다. 그러나 실제 골육종 환자의 시료에서의 연구와 ERK1/2의 활성에 의해 조절되는 전이능 관련인자와 기전에 관한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 골육종 세포주에서 ERK1/2 활성과 세포외기질 분해효소인 MMP2의 활성과 상관관계를 보였으며, ERK1/2 활성에 의해 초기 전이능과 연관되는 ezrin의 발현이 연관됨을 보여주고 있다. 결국 ERK1/2 활성은 전이능과 연관되는 ezrin 발현에 밀접하게 관련되며, MMP2 활성의 조절에 중요한 역할을 할 것이라 사료된다. 그러므로 골육종에서 ERK1/2의 활성이 초기 전이능의 조절에 밀접한 관련이 될 것으로 사료된다.

REFERENCES

1) **Al-Romaih K, Bayani J, Vorobyova J et al**: Chromosomal instability in osteosarcoma and its association with centrosome abnormalities. *Can* -

cer Genet Cytogenet. 144:91-99, 2003.

2) **Coltella N, Manara MC, Cerisano V et al**: Role of the MET/HGF receptor in proliferation and invasive behavior of osteosarcoma. *FASEB J*. 17:1162-1164, 2003.
3) **Ducy P: Cbfa1**: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn*. 219: 461-471, 2000.
4) **Hipskind RA, Bilbe G**: MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblasts. *Front Biosci*. 3: D804-816, 1998.
5) **Khanna C, Wan X, Bose S et al**: The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med*. 10: 182-186, 2004.
6) **Kruzelock RP, Murphy EC, Strong LC, Naylor SL, Hansen MF**: Localization of a novel tumor suppressor locus on human chromosome 3q important in osteosarcoma tumorigenesis. *Cancer Res*. 57: 106-109, 1997.
7) **Letson GD, Muro-Cacho CA**: Genetic and molecular abnormalities in tumors of the bone and soft tissues. *Cancer Control*. 8: 239-251, 2001.
8) **Nellissery MJ, Padalecki SS, Brkanac Z et al**: Evidence for a novel osteosarcoma tumor-suppressor gene in the chromosome 18 region genetically linked with Paget disease of bone. Am. *J. Hum. Genet*. 63: 817-824, 1998.
9) **Overholtzer M, Rao PH, Favis R et al**: The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:11547-11552, 2003.
10) **Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N**: Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 22: 395-403, 2003.
11) **San-Julian M, Diaz-De-Rada P, Noain E, Sierrasesumaga L**: Bone metastases from osteosarcoma. *Int Orthop*. 27: 117-120, 2003.