



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ**

**“In Vitro μελέτη του ρόλου των αυξητικών παραγόντων στον  
πολλαπλασιασμό, μετανάστευση και διήθηση κυττάρων  
οστεοσαρκώματος”**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ  
ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΔΑΤΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ**

**ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΟΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2014**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή στην μορφή που παρουσιάζεται στα επόμενα φύλλα χαρτιού είναι, στη σκέψη μου, μια ημιτελής παράσταση, ένα “θανάσιμο αμάρτημα” [Mahatma Ghandi Τα επτά θανάσιμα αμαρτήματα]. Αποτελεί την καταγραφή μιας σειράς ερωτημάτων και αντιστοίχων απαντήσεων με κατα το δυνατόν επιστημονικότερα ορθό τρόπο. Ωστόσο στερείται της αποτύπωσης όλων εκείνων των συναισθημάτων, των σκέψεων και των στιγμών που έζησα και μοιράστηκα με όλους τους άνθρωπους του εργαστηρίου. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή καταγράφεται η διαδικασία της έρευνας (υπόθεση-πείραμα-αποτέλεσμα) χωρίς να γίνεται καμία αναφορά στο παράλληλο σύμπαν των συναισθημάτων που γεννήθηκαν, γιαγαντώθηκαν και χάθηκαν στην πορεία της. Ο ενθουσιασμός της υπόθεσης, η αδημονία για την λήψη αποτελεσμάτων, η χαρά ή η απογοήτευση απο τα πειράματα, η αμηχανία της ερμηνείας των αποτελεσμάτων και τελικά η ικανοποίηση της συνεισφοράς όχι στο αόριστο οικοδόμημα της γνώσης αλλά στην ενίσχυση της πιθανότητας ενός καλύτερου μέλλοντος αποτελούν το άλλο μισό αυτού του γραπτού. Όλα αυτά τα συναισθήματα είναι το απαραίτητο συστατικό στοιχείο της ανθρωπιάς που στη συνείδηση μου εξαγνίζουν το “θανάσιμο αμάρτημα” της στείρας επιστήμης.

Για ολόκληρο αυτό το συνοθύλευμα γνώσης και συναισθημάτων θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όλους τους ανθρώπους με τους οποίους είχα την τιμή και την χαρά να συνεργαστώ όλα αυτά τα χρόνια στο εργαστήριο ιστολογίας προεξάρχοντος του καθηγητή μου κ.Τζανακάκη, χωρίς την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση του οποίου θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση αυτής της διατριβής. Θα ήθελα να εκφράσω επίσης τις θερμές ευχαριστίες μου στην τριμελή επιτροπή: κ.κ Τζανακάκη Γεώργιο-Καθηγητή Ανατομίας-Ιστολογίας, κ.Κατώνη Παύλο-Αναπληρωτή Καθηγητή Ορθοπαιδικής και κ. Ζαφειρόπουλο Αλέξανδρο-Επίκουρο Καθηγητή Ανατομίας-Ιστολογίας) καθώς επίσης και στις Dr Nikitovic Dragana-Λέκτορα Εμβρυολογίας-Ιστολογίας και Dr Βερδιάκη Αικατερίνη για την ουσιαστική βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφεραν.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την βαθειά ευγνωμοσύνη μου στους δικούς μου ανθρώπους: Στη μητέρα μου και τον πρόωρα χαμένο πατέρα μου για τις αρχές και τον τρόπο σκέψης που μου μετέδωσαν καθώς και στη Μαρία χωρίς την βοήθεια, υπομονή και αισιοδοξία της οποίας θα ήταν αδύνατο να ολοκληρωσω αυτό το πόνημα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Υπόβαθρο:** Το οστεοσάρκωμα είναι ο πιο συχνός κακοήθης όγκος των οστών στα παιδιά και τους εφήβους, με συχνότητα 4,4/1000000. Παρά την σημαντική αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των ασθενών με οστεοσάρκωμα τις τελευταίες δεκαετίες, γεγονός που οφείλεται στην έγκαιρη διάγνωση και την χρήση της χημειοθεραπείας, η κυτταρική παθοφυσιολογία του όγκου παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη και η παρουσία μεταστάσεων εξακολουθεί να αποτελεί ένα σημαντικότατο αρνητικό προγνωστικό παράγοντα.

Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη των όγκων έχουν οι σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων, του εξωκυτταρίου χώρου (ECM) και των γειτονικών φυσιολογικών κυττάρων. Η σύσταση της ECM επηρεάζει σημαντικές λειτουργίες των φυσιολογικών και των καρκινικών κυττάρων, όπως ο πολλαπλασιασμός, η προσκόλληση, η μετανάστευση και η διαφοροποίηση. Ένα από τα κύρια συστατικά του εξωκυτταρίου χώρου και της κυτταρικής μεμβράνης είναι οι πρωτεογλυκάνες (PGs), οι οποίες μέσω του πρωτεϊνικού τους κορμού ή διαμέσου των γλυκοζαμινογλυκανικών (GAGs) τους αλυσίδων, είναι ικανές να αλληλεπιδρούν με μακρομόρια του εξωκυτταρίου χώρου, όπως το κολλαγόνο, οι αυξητικοί παράγοντες, οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων και τα μόρια προσκόλλησης, συμμετέχοντας με τον τρόπο αυτό στη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών.

Η παραθυρεοειδής ορμόνη είτε ως μια ενδογενώς παραγόμενη ορμόνη είτε ως ένας εξωγενώς χορηγούμενος αντιοστεοπορωτικός παράγοντας διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην φυσιολογία του οστού. Ωστόσο παραμένει εν πολλοίς άγνωστη η σημασία της δράσης της σε πρωτογενής όγκους των οστών όπως το οστεοσάρκωμα

**Σκοπός:** η μελέτη της επίδρασης τμημάτων της παραθυρεοειδούς ορμόνης στην μετανάστευση κυτταρικών σειρών οστεοσάρκωματος ανθρώπου καθώς και ο

προσδιορισμός των αλλαγών εκείνων του εξωκυτταρίου χώρου που επάγονται από αυτήν και μεταβάλλουν την μεταναστευτική ικανότητα αυτών των κυττάρων. Επίσης η διερεύνηση των πιθανών εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μονοπατιών σηματοδότησης που επιδρούν στη ρύθμιση της συγκεκριμένης κυτταρικής λειτουργίας

**Αποτελέσματα:** Στα πλαίσια της παρούσας έρευνας μελετήθηκε εάν οι αλλαγές του μεταβολισμού του υαλουρονικού (HA) που επάγονται από τα πεπτίδια PTH ( 1-34) και PTH (7-84) της παραθορμόνης, σε μετρίως (MG63) και καλά διαφοροποιημένες (Saos 2) κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος, συσχετίζονται με την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων αυτών. Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι η διαλείπουσα χορήγηση PTH (1-34) οδήγησε σε σημαντική αύξηση ( $P \leq 0,01$ ) της μετανάστευσης των κυττάρων MG63, αύξηση της έκφρασης της συνθάσης του HA, HAS-2 ( $P \leq 0,001$ ) και στην ενισχυμένη εναπόθεση υψηλού μοριακού βάρους HA στον περικυτταριο χώρο. Τόσο η αύξηση της ενδογενούς παραγωγής HA ( $P \leq 0,01$ ) όσο και η εξωγενής χορήγηση υψηλού μοριακού βάρους HA βρέθηκαν να συσχετίζονται ( $P \leq 0,05$ ) με μία σημαντική αύξηση της μεταναστευτικής ικανότητας της κυτταρικής σειράς MG63. Επιμόλυνση με siHAS2 έδειξε ότι η PTH (1-34), κυρίως μέσω της HAS2, ενισχύει την παραγωγή του HA και ρυθμίζει την κυτταρική κινητικότητα των MG63 κυττάρων. Είναι ενδιαφέρον ότι, η συνεχής χορήγηση PTH (1-34) διεγείρει στα Saos 2 κυττάρα την έκφραση της HAS2 ( $P \leq 0,001$ ) και της HAS1 ( $P \leq 0,001$ ) ισομορφής, ενώ αναστέλλει την έκφραση της υαλουρονιδάσης-2 (HYAL2) ( $P \leq 0,001$ ) και ενισχύει μέτρια τη μετανάστευσή τους ( $P \leq 0,05$ ). Ως εκ τούτου, η PTH (1-34) κατά τρόπο που εξαρτάται από την μέθοδο χορήγησης της φαίνεται να ρυθμίζει σημαντικά την μεταναστευτική ικανότητα των MG63 και Saos2 κυτταρικών σειρών οστεοσαρκώματος. Συμπερασματικά, τα δεδομένα που

προκύπτουν αναδεικνύουν την ύπαρξη μιας ρυθμιστικής επίδρασης της PTH (1-34), κατά ένα χρονικά εξαρτώμενο τρόπο χορήγησης, στον μεταβολισμό του HA γεγονός που οδηγεί σε μεταβολές στη μετανάστευση των κυττάρων οστεοσαρκώματος. Κατόπιν θελήσαμε να ερευνήσουμε την συμμετοχή και άλλων πιθανών μονοπατιών διαμέσου των οποίων η PTH (1-34) ρυθμίζει την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος προξενώντας μεταβολές στην σύνθεση του εξωκυτταρίου και περικυτταρίου χώρου. Έτσι, ερευνήσαμε την πιθανή συμμετοχή της σηματοδότησης του FGF2 (αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών 2) στην PTH (1-34)-εξαρτώμενη κυτταρική μετανάστευση του οστεοσαρκώματος. Η χορήγηση FGF2 σε κύτταρα οστεοσαρκώματος οδήγησε σε σημαντική αύξηση ( $P \leq 0,01$ ) της κυτταρικής μετανάστευσης των MG63, παρόμοια με εκείνη που προκαλείται από την PTH (1-34). Η mRNA ανάλυση της έκφρασης των κυττάρων στα οποία χορηγήθηκε PTH (1-34) έδειξε μία έντονη αύξηση του FGF2, σε επίπεδο μεταγραφής ( $P = 0,0015$ ). Είναι ενδιαφέρον ότι η προσθήκη του FGF2 σε κύτταρα MG63 οδήγησε σε σημαντική καταστολή της έκφρασης της διγλυκάνης, μιας μικρής πλούσιας σε λευκίνη πρωτεογλυκάνης, τόσο σε επίπεδο mRNA ( $P \leq 0,0001$ ) όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης (60%). Προκειμένου να εξεταστεί η σημασία της διγλυκάνης στην κυτταρική μετανάστευση των MG63 κυττάρων πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση με siRNA ειδικών για την διγλυκάνη, με αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση ( $P \leq 0,01$ ) στην ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων αυτών. Σε αντίθεση, η εξωγενής χορήγηση ανθρώπινης ανασυνδυασμένης διγλυκάνης ανέστειλε έντονα την μετανάστευση αυτών των κυττάρων ( $P \leq 0,01$ ). Τέλος, διαπιστώθηκε μια άμεση συσχέτιση μεταξύ της δράσης της PTH (1-34) και της έκφρασης της διγλυκάνης με σημαντική μείωση ( $P \leq 0,01$ ) σε επίπεδο μεταγραφής της διγλυκάνης στα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε PTH (1-34). Συνοπτικά, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει ένα

νέο συνεργικό μηχανισμό δράσης της PTH (1-34) με τον FGF2 που οδηγεί σε μεταβολές της παρουσίας της διγλυκάνης στον εξωκυττάριο χώρο, οι οποίες με την σειρά τους προξενούν μεταβολές στη ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης του οστεοσαρκώματος. Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία του TGFβ στα οστά καθώς και την ρυθμιστική επίδραση που έχει η διγλυκάνη σε αυτόν και προκειμένου να διαπιστωθεί η αναγκαιότητα του TGFβ για τη μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος δημιουργήθηκαν κύτταρα MG63 ελλιπή σε διγλυκάνη στα οποία προστέθηκε αντίσωμα έναντι του TGFβ. Διαπιστώθηκε ότι ενώ τα κύτταρα που ήταν ελλιπή σε διγλυκάνη παρουσίασαν αύξηση της μεταναστευτικής δραστηριότητας τους ( $P < 0.01$ ), τα ελλιπή σε διγλυκάνη κύτταρα στα οποία είχε επίσης προστεθεί το αντίσωμα anti-TGFβ1 δεν κατόρθωσαν να αυξήσουν την μεταναστευτική δραστηριότητά τους γεγονός που καταδικνύει την σημασία του TGFβ1 στην μεταναστευτική ικανότητα τους. Λαμβάνοντας υπόψη την σημασία που έχει η συνδεκάνη 4 στην βιολογία διαφορετικών καρκινικών κυττάρων καθώς και την σημασία του συμπλόκου FGFR/συνδεκάνη 4 στην επίτευξη αυτού του ρόλου θελήσαμε να διαπιστώσουμε την σημασία της συνδεκάνη 4 στην μετανάστευση των κυττάρων οστεοσαρκώματος MG63. Έτσι προχωρήσαμε στην δημιουργία κυττάρων MG63 ανεπαρκών σε συνδεκάνη 4 (siSynd4) στα οποία χορηγήσαμε FGF2 και διαπιστώσαμε ότι αυτά δεν παρουσίασαν την αναμενόμενη αύξηση στην ικανότητα τους να μεταναστεύουν. Κατα αυτόν τον τρόπο δείξαμε ότι η συνδεκάνη 4 αποτελεί ένα απαραίτητο μόριο στο μηχανισμό με τον οποίο ο FGF-2 επιτυγχάνει την αύξηση της κυτταρικής μετανάστευσης των MG63 κυττάρων.

**Συμπεράσματα:** Με την παρούσα μελέτη διαπιστώθηκαν 2 πιθανοί μηχανισμοί διαμέσου των οποίων η PTH (1-34) επιτυγχάνει τη δράση της στη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

**1<sup>ος</sup> Μηχανισμός:** Η PTH (1-34) ελέγχοντας τον μεταβολισμό του υαλουρονικού οξέος (HA) αυξάνει τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

**2<sup>ος</sup> Μηχανισμός:** Η PTH (1-34) ελέγχοντας την σύνθεση της διγλυκάνης με τη διαμεσολάβηση του FGF-2 κατορθώνει να μεταβάλλει τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος. Σε αυτή τη δράση του FGF-2 κρίσιμο ρόλο έχει η συνδεκίνη 4.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (ABSTRACT)

**Background:** Osteosarcoma is the most common malignant bone tumor in children and adolescents, with frequency 4,4 / 1000000. Despite the significant increase in the survival rate of patients with osteosarcoma over the past decades, due to early diagnosis and the use of chemotherapy, the tumor cell pathophysiology remains largely unknown and the presence of metastases continues to be a major negative prognostic factor.

Complex interactions between cancer cells, the extracellular matrix (ECM) and the adjacent normal cells play an important role in development and tumor progression. ECM composition affects important functions of normal and tumor cells, such as proliferation, adhesion, migration and differentiation. One of the main components of the extracellular matrix and cell membrane are proteoglycans (PGs), through which their protein core or through their glycosaminoglycans (GAGs) chains are capable to interact with macromolecules of the extracellular matrix such as collagen, growth factors, growth factor receptors and adhesion molecules, participating in this way to the regulation of various cellular functions.

Parathyroid hormone (PTH) as either an endogenous produced hormone or an administered antiosteoporotic factor plays a key role in the physiology of bone. However it remains largely unknown the importance of PTH action in primary bone tumors such as osteosarcoma

**Aim:** To study the effect of different parathyroid hormone peptides in the migration of human osteosarcoma cell lines and to identify possible changes of the extracellular matrix induced by PTH peptides that affect the migratory capacity of these cells.



Moreover, the investigation of potential extracellular and intracellular signaling pathways that may regulate this specific cellular function

**Results:** we investigated whether the changes of HA metabolism induced by PTH (1–34) and PTH (7–84) peptides in moderately MG-63 and well-differentiated Saos 2 osteosarcoma cell lines, are correlated to their migration capabilities. Our results demonstrate that intermittent PTH (1–34) treatment significantly ( $P \leq 0.01$ ) supported the migration of MG-63 cells, increased their HA-synthase-2 (HAS2) expression ( $P \leq 0.001$ ), and enhanced their high-molecular size HA deposition in the pericellular matrix. Both increased endogenous HA production ( $P \leq 0.01$ ) and treatment with exogenous high-molecular weight HA ( $P \leq 0.05$ ) correlated to a significant increase of MG-63 cell migration capacity. Transfection with siHAS2 showed that PTH (1–34), mainly through HAS2, enhanced HA and regulated MG-63 cell motility. Interestingly, continuous PTH (1–34) treatment stimulated both Saos 2 cell HAS2 ( $P \leq 0.001$ ) and HAS1 ( $P \leq 0.001$ ) isoform expression inhibited their HYAL2 expression ( $P \leq 0.001$ ) and modestly ( $P \leq 0.05$ ) enhanced their migration. Therefore, the PTH (1–34) administration mode appears to distinctly modulate the migratory responses of the MG-63 moderately and Saos 2 well-differentiated osteosarcoma cell lines. Conclusively, the obtained data suggest that there is a regulatory effect of PTH (1–34), in an administration mode-dependent manner, on HA metabolism that is essential for osteosarcoma cell migration. Then we wanted to investigate the participation of other potential pathways through which PTH(1-34) regulates the migratory capacity of osteosarcoma cells, through regulation of the composition of the extracellular and pericellular space. Thus, we investigated the possible participation of FGF-2 signaling in PTH(1–34)-dependent osteosarcoma cell migration. FGF-2 treatment of

osteosarcoma cells resulted in a significant increase ( $P \leq 0.01$ ) in MG63 cell migration, similar to that caused by PTH(1–34). mRNA expression analysis of cells treated with PTH(1–34) showed a strong increase in FGF-2 transcript levels ( $P = 0.0015$ ). Interestingly, the addition of FGF-2 to MG63 cells led to significant downregulation of small leucine-rich proteoglycan biglycan expression at both the mRNA ( $P \leq 0.0001$ ) and protein (60%) levels. In order to examine the significance of biglycan on MG63 cell migration, transfection with short interfering RNA specific for biglycan was performed, resulting in a significant increase ( $P \leq 0.01$ ) in the migration capacity of biglycan-deficient MG63 cells. In contrast, exogenous human recombinant biglycan strongly inhibited the migration of these cells ( $P \leq 0.01$ ). Finally, a direct correlation between PTH(1–34) action and biglycan expression was established by the finding of a significant decrease ( $P \leq 0.01$ ) in biglycan transcript levels in PTH(1–34)-treated cells. To summarize, the present study demonstrates a novel cooperative mechanism of PTH(1–34) and FGF-2 action that results in specific alteration of the biglycan extracellular matrix content to regulate osteosarcoma cell migration.. Taking into consideration the importance of TGFb in bone biology and the regulatory effect of the biglycan on TGFb action, in order to determine the necessity of TGF b for cell migration we created MG 63 biglycan-deficient osteosarcoma cells. We treated these cells with an antibody against TGFb and we found that while biglycan-deficient cells increased their migration capacity ( $P < 0.01$ ), biglycan-deficient cells which were treated with the anti - TGFb1 antibody failed to increase their migration activity. These results show the importance of TGFb1 in migration capacity of MG63 cells .It has been shown that syndecan 4 plays an important role in the biology of different tumor cells and that this role is achieved through complex FGFR / syndecan 4 interactions. We sought to determine the importance of syndecan

4 in MG63 osteosarcoma cell migration. We proceeded to create MG 63 cells deficient in syndecan 4 (siSynd 4) in which we administered FGF 2 and found that they did not show the expected increase in their ability to migrate. Thereby shown that syndecan 4 is an essential molecule in the mechanism in which the FGF -2 achieves increased cell migration of MG 63 cells.

**Conclusions:** With this study we identified two possible pathways through which PTH (1-34) achieves its action on migration ability of osteosarcoma cells.

**1<sup>st</sup> Pathway:** PTH (1-34) controlling the metabolism of hyaluronic acid (HA) increases the migratory ability of osteosarcoma cells.

**2<sup>nd</sup> Pathway:** PTH (1-34) controlling the synthesis of biglycan through regulation of FGF2 expression, manages to alter migration ability of osteosarcoma cells. Syndecan4 is an essential component for the action of FGF2 in this pathway.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

### **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

#### **1.1 ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑ**

- 1.1.1 Γενικά
- 1.1.2 Χρωμοσωματικοί παράγοντες
- 1.1.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες
- 1.1.4 Μεταγραφικοί Παράγοντες
- 1.1.5 Αυξητικοί Παράγοντες
- 1.1.6 Ρυθμιστές της κυτταρικής μετανάστευσης (migration) και διήθησης (invasion)
- 1.1.7 Διήθηση-μετάσταση του όγκου (invasion)
- 1.1.8 Ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης

#### **1.2 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ**

#### **1.3 ΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΟΓΛΥΚΑΝΕΣ (GAGs) / ΠΡΩΤΕΟΓΛΥΚΑΝΕΣ (PGs)**

- 1.3.1 Πρωτεογλυκάνες και καρκίνος
- 1.3.2 Διγλυκάνη (BGN)
- 1.3.3 Η σηματοδότηση της διγλυκάνης στο σχηματισμό των οστών
- 1.3.4 Διγλυκάνη και καρκίνος
- 1.3.5 Υαλουρονικό οξύ (Hyaluronan)
- 1.3.6 Υαλουρονικό οξύ (HA) και καρκίνος
- 1.3.7 Συνδεκάνη 4 (Syndecan 4)

#### **1.4 ΠΑΡΑΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΟΡΜΟΝΗ (PTH)**

- 1.4.1 Γενικά
- 1.4.2 Παραθυρεοειδής ορμόνη (PTH) και Οστεοσάρκωμα

## **ΣΚΟΠΟΣ**

### **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

- 2.1 Υλικά
- 2.2 Κυτταροκαλλιέργειες
- 2.3 Απομόνωση RNA – Ποσοτικός Προσδιορισμός
- 2.4 Αντίστροφη Μεταγραφή
- 2.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-Time PCR)
- 2.6 Απομόνωση και Ανάλυση Πρωτεϊνών
- 2.7 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών (SDS PAGE) και Ανοσοαποτύπωση κατά WESTERN (Western Blot)
- 2.8 Ανοσοφθορισμός
- 2.9 Αναστολή Έκφρασης Γονιδίων με siRNA (transfection)
- 2.10 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν
- 2.11 Κυτταρική Μετανάστευση

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (1)

- 3.1 1<sup>ος</sup> Μηχανισμός: Επίδρασεις των πεπτιδίων PTH στην κυτταρική μετανάστευση του οστεοσαρκώματος διαμέσου μεταβολών στον μεταβολισμό του HA
- 3.2 Επίδρασεις των πεπτιδίων PTH στην έκφραση των ισομορφών της HAS
- 3.3 Επίδρασεις των πεπτιδίων PTH στην έκφραση των ισομορφών της Hyal και CD44
- 3.4 Απεικόνιση του HA του εξωκυτταρίου χώρου σε κύτταρα οστεοσαρκώματος
- 3.5 Επίδραση της εξωγενούς χορήγησης HA στην κυτταρική μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος
- 3.6 Επίδραση της αναστολής της έκφρασης της HAS2 από siRNA στη μετανάστευση κυττάρων οστεοσαρκώματος
- 3.7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (2)

- 4.1 2<sup>ος</sup> Μηχανισμός: Επίδραση της PTH (1-34) στην κυτταρική μετανάστευση του οστεοσαρκώματος διαμέσου μεταβολών στον άξονα FGF2-Διγλυκάνης (BGN)
- 4.2 Επίδραση του FGF2 στη μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος- Συμμετοχή της PTH (1-34)
- 4.3 Επίδραση της PTH (1-34) στην έκφραση του FGF2
- 4.4 Επίδραση του FGF2 στην έκφραση της διγλυκάνης
- 4.5 Μείωση των επιπέδων mRNA της Διγλυκάνης με siRNA
- 4.6 Η συμμετοχή της Διγλυκάνης είναι απαραίτητη για την επαγωγή της μετανάστευσης των κυττάρων MG-63 από τον FGF2
- 4.7 Η εξωγενής χορήγηση διγλυκάνης αναστέλλει την μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος
- 4.8 Επίδραση της PTH (1-34) στην έκφραση της διγλυκάνης
- 4.9 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (3)

- 5.1 Ο αυξητικός παράγοντας TGFβ και όχι ο BMP2/4 συμμετέχει στη ρύθμιση της μετανάστευσης των MG63 από την Διγλυκάνη
- 5.2 Η συνδεκίνη 4 (Syndecan 4) είναι απαραίτητη για την δράση του FGF-2 στη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων MG63
- 5.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

#### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Δημοσιεύσεις  
Βιογραφικό

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑ

### 1.1.1 Γενικά

Το οστεοσάρκωμα είναι ο πιο συχνός κακοήθης όγκος των οστών στα παιδιά και τους εφήβους με συχνότητα 4,4/1000000 (Mirabello et al 2009). Συνήθως εμφανίζεται κατά τη δεύτερη δεκαετία της ζωής και με μικρότερη συχνότητα σε ενήλικες μεγαλύτερης ηλικίας. Οι όγκοι των οστών εκδηλώνονται κυρίως με άλγος και οίδημα σε ένα οστό ή σε μια άρθρωση. Τα συμπτώματα συχνά αποδίδονται σε αθλητικές κακώσεις, ειδικά στους εφήβους. Η παρουσία νυχτερινού άλγους, συστηματικών συμπτωμάτων της νόσου, η απώλεια βάρους ή η εμμένουσα συμπτωματολογία μετά από αρκετές εβδομάδες συντηρητικής αντιμετώπισης θα πρέπει να προειδοποιήσει τον κλινικό γιατρό για μια πιο σοβαρή υποκείμενη αιτία και να τον κινητοποιήσει προκειμένου να προχωρήσει σε περαιτέρω διαγνωστικό έλεγχο.

Το οστεοσάρκωμα πιθανότατα προέρχεται από μεσεγχοματικά βλαστικά κύτταρα με τουλάχιστον μερική δέσμευση στην οστεοβλαστική σειρά, αν και η ακριβής προέλευση των κυττάρων αυτών είναι ασαφής. Ασθενείς με κληρονομικό ρετινοβλάστωμα, σύνδρομο Rothmund-Thomson, σύνδρομο Li-Fraumeni και σύνδρομο Werner έχουν προδιάθεση στην ανάπτυξη οστεοσαρκώματος, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι αλλαγές στα γονίδια που συνδέονται με αυτές τις διαταραχές (RB1, RECQL4, TP53 και WRN, αντιστοίχως) μπορεί να παίζουν ρόλο στην παθογένεια της νόσου (Gorlick R 2009). Εντούτοις, η συντριπτική πλειοψηφία των οστεοσαρκωμάτων προκύπτει σε ασθενείς που δεν έχουν γνωστές κληρονομούμενες γονιδιακές μεταλλάξεις. Σε επίπεδο κυτταρογενετικής, το οστεοσάρκωμα έχει εξαιρετικά πολύπλοκους καρυότυπους με πολλές αριθμητικές και δομικές ανωμαλίες.

Ωστόσο, έως τώρα δεν έχει αναγνωριστεί κάποια σταθερά εμφανιζόμενη ανωμαλία. Τρεις μείζονες υπότυποι του συμβατικού οστεοσαρκώματος αναγνωρίζονται: οστεοβλαστικός, χονδροβλαστικός και ινοβλαστικός, γεγονός που αντικατοπτρίζει την κυρίαρχη μορφή του βασικού στρώματος (Folpe 2010). Η θεραπεία και η έκβαση αυτών των υποτύπων δεν παρουσιάζει διαφορές. Το παροστικό, το κεντρικό χαμηλού βαθμού και το περιοστικό οστεοσάρκωμα είναι μορφολογικά και κλινικά διακριτές υποκατηγορίες οστεοσαρκώματος με βελτιωμένη πρόγνωση και αποτελούν λιγότερο από το 5% του συνόλου των περιπτώσεων του οστεοσαρκώματος. Η ηλικία κατά την παρουσίαση του παροστικού και του περιοστικού οστεοσαρκώματος είναι συνήθως η τέταρτη και η πέμπτη δεκαετία της ζωής. Η μικροσκοπική διάγνωση του οστεοσαρκώματος στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στον προσδιορισμό της παραγωγής του οστεοειδούς από τα νεοπλασματικά κύτταρα. Δεν υπάρχουν βοηθητικές ανοσοϊστοχημικές ή μοριακές γενετικές μελέτες που να βοηθούν στη διάγνωση του οστεοσαρκώματος.

### **1.1.2 Χρωμοσωματικοί παράγοντες**

Το οστεοσάρκωμα παρουσιάζεται με πολύπλοκους καρυότυπους και ένα εξαιρετικά ασταθές γονιδίωμα που εμφανίζει όχι μόνο αριθμητικές αλλά και δομικές χρωμοσωμικές μεταβολές (Yang et al 2010). Συγκεκριμένα οι θέσεις 1p35, 1q23.1-1q21.1, 6p22.1-6p21.31 και 19p13.11-19p13.2 παρουσιάζονται ενισχυμένες, ενώ οι θέσεις 5q12.3-5q13.2, 5q14.3-5q22.2 και 13q13.2-13p14.3 παρουσιάζουν διαγραφές. Αυτές οι περιοχές περιλαμβάνουν 1162 γονίδια που είναι σε μεγάλο βαθμό ενισχυμένα και 146 με διαγραφές. Μερικές μεταβολές συσχετίζονται με κλινική πρόγνωση ή εμπλέκονται σε σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια, γεγονός που

υποδηλώνει ότι εμπλέκονται εν μέρει στην ογκογένεση ή την εξέλιξη του όγκου (Yang et al 2010, Yang et al 2011).

### 1.1.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Φυσικοί, χημικοί και βιολογικοί παράγοντες έχουν προταθεί ως πιθανά καρκινογόνα για το οστεοσάρκωμα. Μεταξύ αυτών, ο ρόλος της υπερϊώδους ακτινοβολίας και της ιονίζουσας ακτινοβολία είναι ο καλύτερα διαπιστωμένος. Η αρχική παθογενετική σύνδεση μεταξύ της έκθεσης στην ακτινοβολία και του οστεοσαρκώματος παρατηρήθηκε σε εργαζόμενες στην ορολογιοποιία (Polednak et al 1978). Εντούτοις, η έκθεση σε ακτινοβολία εμπλέκεται μόνο στο 2% των περιπτώσεων του οστεοσαρκώματος (Picci et al 2007) και δεν θεωρείται ότι έχει σημαντικό ρόλο σε παιδιατρικούς ασθενείς. Ένα διάστημα των 10-20 ετών έχει παρατηρηθεί μεταξύ της έκθεσης και της εμφάνισης του οστεοσαρκώματος (Longhi et al 2003). Όταν η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται σε παιδιά ως μέσο θεραπείας για συμπαγείς όγκους, 5,4 % των παιδιών αναπτύσσουν ένα δευτερεύον νεόπλασμα και το 25 % αυτών είναι σαρκώματα (Paulino et al 2005) .

Οι χημικοί παράγοντες που συνδέονται με την εμφάνιση του οστεοσάρκωματος περιλαμβάνουν το μεθυλοχολανθρένιο και τα άλατα χρωμίου (Rani et al 1992), το οξειδίου του βηρυλλίου (Dutra et al 1950), το ψευδάργυρικό πυριτικό βηρύλλιο (Mazabraud et al 1975), τον αμίαντο και τις βαφές ανιλίνης (Tan et al 2009). Παλαιότερα , μια ιικής αρχής αιτιολογία του οστεοσαρκώματος είχε προταθεί. Αυτή προήλθε από την αντίχνευση του ιού πθήκου 40 (SV40) σε κύτταρα οστεοσαρκώματος. Ωστόσο, η παρουσία του SV40 σε αυτά τα κύτταρα διαπιστώθηκε αργότερα ότι είναι το αποτέλεσμα της παρουσίας του ιού SV40 στο εμβόλιο πολιομυελίτιδας που αυτοί οι ασθενείς είχαν λάβει (Mendoza et al 1998, Engels et al



2005). Μελέτες που αξιολογούν τον ρόλο του SV40 στην παθογένεση του μεσοθηλιώματος έχουν προτείνει ότι ανίχνευση του SV40 σε ανθρώπινους καρκίνους μπορεί στην πραγματικότητα να οφείλεται σε εργαστηριακή μόλυνση από πλασμίδια που περιέχουν αλληλουχίες του SV40 (Lopez-Rios et al 2004, Manfredi et al 2005).

#### **1.1.4 Μεταγραφικοί Παράγοντες**

Οι παράγοντες μεταγραφής διευκολύνουν την δέσμευση του προαγωγέα (promoter) συγκεκριμένων γονιδίων ώστε να εκκινήσει η διαδικασία της μεταγραφής. Ενώ η μεταγραφή υπόκειται συνήθως σε αυστηρές ρυθμίσεις, η απορρύθμιση της μπορεί να συμβεί στο οστεοσάρκωμα, όπως και σε άλλους καρκίνους. Η περίσσεια παραγωγής των παραγόντων μεταγραφής ή η παραγωγή ενός νέου υπερδραστήριου μεταγραφικού παράγοντα, μπορεί να προκύψουν από αναδιάταξη του γονιδίου του. Το σύμπλοκο της πρωτεΐνης ενεργοποιητή 1 (AP-1) είναι ένας ρυθμιστής της μεταγραφής που ελέγχει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και το μεταβολισμό των οστών. Το AP - 1 αποτελείται από Fos και Jun πρωτεΐνες, τα προϊόντα του c- fos και c -Jun πρωτο-ογκογονιδίων, αντιστοίχως. Τα Fos και Jun έχουν βρεθεί να είναι σημαντικά αυξημένα σε υψηλής κακοήθειας οστεοσαρκώματα σε σύγκριση με καλοήγη οστεοβλαστικές βλαβες και χαμηλής κακοήθειας οστεοσαρκώματα (Wu et al 1990, Franchi et al 1998) και συνδέονται με την τάση για την ανάπτυξη μεταστάσεων (Gamberi et al 1998). Σε Fos και Jun διπλά διαγονιδιακά ποντίκια βρέθηκε να αναπτύσσονται οστεοσαρκώματα με μεγαλύτερη συχνότητα από ό,τι σε μόνο c- Fos διαγονιδιακά ποντίκια (Wang et al 1995). Σε πρόσφατες μελέτες (Leaner et al 2009) φάνηκε ότι η αναστολή της AP-1-μεσολαβούμενης μεταγραφής προκάλεσε μειωμένη μετανάστευση, εισβολή και μετάσταση σε έναν μοντέλο οστεοσαρκώματος ποντικού.

Το Myc είναι ένας παράγοντας μεταγραφής που δρα στον πυρήνα και διεγείρει την κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση. Η ενίσχυση της έκφρασης του Myc έχει εμπλακεί στην παθογένεση του οστεοσαρκώματος και την αντίσταση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Η υπερέκφραση του Myc στα στρωματικά κύτταρα μυελού των οστών οδηγεί στην ανάπτυξη οστεοσαρκώματος και σε απώλεια της λιπογένεσης (Tan et al 2010). Η καταστολή της έκφρασης του Myc ενίσχυσε την θεραπευτική δραστηριότητα της μεθοτρεξάτης έναντι κυττάρων οστεοσαρκώματος (Scionti et al 2008). Σε MG63 κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος, η επιμόλυνση με antisense Myc οδήγησε σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου και ενισχυμένη απόπτωση (Xie et al 2006). Χρησιμοποιώντας ένα διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού (Arvanitis et al 2008), διαπιστώθηκε ότι η αδρανοποίηση του Myc προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού και προαγωγή της διαφοροποίησης του οστεοσάρκωματος.

Οι μεταγραφικές πρωτεΐνες της οικογένειας του STAT (Σηματοδοτικός μεταγραφικός και μεταφραστικός παράγων) εκφράζονται επίσης ιδιαίτερα σε ιστούς οστεοσάρκωματος και σχετίζονται με μειωμένη διαφοροποίηση του όγκου, αυξημένα ποσοστά μετάστασης και χαμηλά 5ετή ποσοστά επιβίωσης. Η καταστολή της έκφρασης του STAT3 οδήγησε σε αναστολή του πολλαπλασιασμού και σε αυξημένη απόπτωση σε κύτταρα οστεοσαρκώματος. Οι επιδράσεις αυτές σχετίζονται με την αναστολή των αντι αποπτωτικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των Myc και cyclinD1 (Liontos et al 2009).

### **1.1.5 Αυξητικοί Παράγοντες**

Τα κύτταρα του οστεοσαρκώματος παράγουν μια σειρά από αυξητικούς παράγοντες που ασκούν αυτοκρινείς και παρακρινείς επιδράσεις.

Η απορυθμισμένη έκφραση των αυξητικών παραγόντων, όπως του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF), του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης (IGF) και του αυξητικού παράγοντα του συνδετικού ιστού (CTGF) οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων μπορεί να υπερεκφράζονται και να είναι ιδιοσυστατικά ενεργοποιημένοι. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια, επίσης, που συνδέονται με αυτούς τους υποδοχείς μπορεί επίσης να είναι υπερενεργοποιημένα. Ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού βήτα (TGF-β) αποτελεί μια μεγάλη οικογένεια διμερών πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα κύτταρα. Όπως αρκετοί άλλοι αυξητικοί παράγοντες, επηρεάζουν μια ευρεία ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών όπως διαφοροποίησης, πολλαπλασιασμού, απόπτωσης και παραγωγής θεμελίου ουσίας. Οι μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (BMP) αποτελούν μια μεγάλη υποομάδα της οικογένειας του TGF. Τα υψηλής κακοήθειας οστεοσαρκώματα βρέθηκαν να εκφράζουν TGF-β1 σε σημαντικά υψηλότερα ποσά από τα χαμηλής κακοήθειας οστεοσαρκώματα (Franchi et al 1998). Ο αυτοκρινής ρόλος του TGF-β διερευνήθηκε σε δύο κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος, επιδεικνύοντας μείωση 30%-50% της ανάπτυξης όταν τα κύτταρα οστεοσαρκώματος καλλιεργήθηκαν υπό την παρουσία του αντι-TGF-β αντισώματος (Navid et al 2000). Οι IGF1 και IGF2 είναι αυξητικοί παράγοντες που συχνά υπερέκφραζονται στο οστεοσάρκωμα. Αυτοί οι παράγοντες συνδέονται σε αντίστοιχους υποδοχείς όπως IGF-1R, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση των μονοπατιών PI3K και MAPK. Αυτό, στη συνέχεια, ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και μειώνει το ρυθμό της απόπτωσης (Rikhof et al 2009). Η στόχευση του IGF-R1 με siRNA οδήγησε σε ενισχυμένη χημειοευαισθησία των κυττάρων του οστεοσαρκώματος στην docetaxel και σισπλατίνη (Wang et al 2010). Η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων

που στοχεύουν τον IGF-R1 ήταν επίσης αποτελεσματική στην ενίσχυση της απόκρισης της χημειοθεραπείας κατά του όγκου (Dong et al 2010, Kolb et al 2010).

Ο αυξητικός παράγοντας του συνδετικού ιστού (CTGF) σχετίζεται με ένα αριθμό πρωτεϊνών της οικογένειας CCN (TGF/Cyr61/Cef10/NOVH). Η οικογένεια πρωτεϊνών φαίνεται ότι δρα μέσω της σηματοδότησης της οδού των ιντεγκρινών (Lau et al 1999) και όπως ο TNF-β, παρουσιάζει ένα φάσμα διαφορετικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της προσκόλλησης, μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού, επιβίωσης, αγγειογένεσης και διαφοροποίησης. Έχειδειχθεί ότι (Nishida et al 2000) ο CTGF είναι ένας ισχυρός διεγέρτης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων Saos-2, οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση του κολλαγόνου τύπου I, της αλκαλικής φωσφατάσης, της οστεοποντίνης και της οστεοκαλσίνης, που αποτελούν δείκτες οστικής διαφοροποίησης και ωρίμανσης. Μια σχετική πρωτεΐνη, η CCN3, βρέθηκε να υπερεκφράζεται στο οστεοσάρκωμα και να συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση (Perbal et al 2008).

### **1.1.6 Ρυθμιστές της κυτταρικής μετανάστευσης (migration) και διήθησης (invasion)**

Το οστεοσάρκωμα είναι ένας ιδιαίτερα μεταστατικός όγκος, και οι πνευμονικές μεταστάσεις είναι η πιο κοινή αιτία θανάτου. Η σειρά των γεγονότων της μετάστασης περιλαμβάνει την αποκόλληση των κυττάρων του οστεοσάρκωματος από τον πρωτογενή όγκο, την προσκόλληση στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, την τοπική μετανάστευση και διήθηση μέσω του στρώματος, την ενδοαγγείωση και την εξαγγείωση. Η ικανότητα των κυττάρων οστεοσάρκωματος να μεθίστανται διαμέσου μιας τέτοιας οδού βασίζεται σε σύνθετες αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και

κυττάρου-θεμέλιας ουσίας. Μόρια που συμμετέχουν στη μετανάστευση και την διήθηση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος μπορεί να αποτελέσουν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους. Οι Wan et al, 2009 ανέφεραν ότι η ιντεγκρίνη β4, η οποία εκφράζεται ιδιαίτερα σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος και σε ιστοπαθολογικά δείγματα όγκων, προάγει την μετάσταση του οστεοσαρκώματος και αλληλεπιδρά με την ezrin. Η καταστολή είτε της έκφρασης είτε της λειτουργίας της ιντεγκρίνης β4 ήταν επαρκής για να εμποδίσει την εκδήλωση του παρατηρούμενου υψηλού μεταστατικού φαινότυπο που προκλήθηκε από τη μεθυλο-νιτρο νιτρωδογουανιδίνη σε ανθρώπινο οστεοσάρκωμα (HOS). Αξίζει να σημειωθεί ότι, η ezrin περιέχει μια θέση δέσμευσης για την p-γλυκοπρωτεΐνη στις θέσεις 149-242 της πρωτεΐνης. Η θεραπευτική στόχευση αυτής της θέσης μπορεί να συμβάλει ενδεχομένως στην αντιμετώπιση της αντοχής στα φάρμακα σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα (Brambilla et al 2012). Η ezrin έχει επίσης ρόλο στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου, στη μεταγωγή σήματος, στη σύνδεση μεταξύ των νηματίων ακτίνης, και σε υποδοχείς κυτταρικής μεμβράνης όπως είναι ο CD44. Αυξημένη έκφραση της ezrin σε οστεοσάρκωμα παιδικής ηλικίας σχετίζεται με μειωμένο διάστημα ελεύθερο νόσου. Η μείωση της έκφρασης της ezrin σε πειραματικό μοντέλο ανθρώπινου οστεοσάρκωματος έδειξε ότι μειώνει τις μεταστάσεις στους πνεύμονες (Khanna et al 2004). Η Cyt61, που αποτελεί ένα νέο στόχο των στατινών, εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στο οστεοσάρκωμα από ότι στο φυσιολογικό οστό και αυξάνεται περαιτέρω στους μεταστατικούς ιστούς. Η καταστολή του Cyt61 σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος οδηγεί σε αύξηση του κυτταρικού θανάτου και μειωμένη μετανάστευση και διήθηση των κυττάρων (Fromigue et al 2011) .

Αρχικές in-vitro μελέτες έδειξαν ότι το μονοπάτι Notch μειώνει την διαδικασία οστεοβλαστογένεσης / οστεοκλαστογένεσης και παίζει κρίσιμο ρόλο στο

οστεοσάρκωμα. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να έχει κλινική σημασία για τη στόχευση του μονοπατιού σηματοδότησης της Notch στο οστεοσάρκωμα. Η κουρκουμίνη (διαρυλεπτανοειδές προερχόμενο από το φυτό turmeric) οδηγεί σε G2/M παύση σε κύτταρα οστεοσαρκώματος, καταστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξή του. Αυτή η ανασταλτική επίδραση συνοδεύτηκε από την καταστολή του Notch-1 και των μορίων στόχων του, συμπεριλαμβανομένων των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), αποτρέποντας έτσι την διήθηση των κυττάρων. Έτσι, η χρήση της κουρκουμίνης για την μείωση της σηματοδότησης του Notch1 μπορεί να είναι μια χρήσιμη στρατηγική για τη θεραπεία του οστεοσαρκώματος (Li et al 2012).

#### **1.1.7 Διήθηση-μετάσταση του όγκου**

Η διήθηση του οστεοσαρκώματος στους γύρω ιστούς περιλαμβάνει επίσης την αποικοδόμηση της εξωκυτταρίου θεμέλιας ουσίας. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) κατά κύριο λόγο συμμετέχουν στη διάσπαση της εξωκυτταρίου θεμέλιας ουσίας. Οι MMPs αποτελούν μία οικογένεια ψευδαργυροεξαρτώμενων ενδοπεπτιδασών που εμπλέκονται σε μια σειρά από φυσιολογικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, της επούλωσης του τραύματος, της εμβρυογένεσης, και της πόρωσης των καταγμάτων. Σε φυσιολογικούς ιστούς, οι MMPs ρυθμίζονται από φυσικούς αναστολείς όπως οι ιστικοί αναστολείς των MMP (TIMP), RECK και  $\alpha$ 2macroglobulin (Birkedal-Hansen et al 1993). Στη περίπτωση του οστεοσαρκώματος, οι MMPs αποδομούν το εξωκυττάριο κολλαγόνο, διευκολύνοντας την εισβολή τόσο του όγκου όσο και ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι MMPs μπορεί να αναφέρονται ως ζελατινάσες, κολλαγενάσες, ή στρωματολυσίνες (stromelolysins). Οι Ζελατινάσες αποδομούν μετουσιωμένο κολλαγόνο και κολλαγόνο τύπου IV. Οι Κολλαγενάσες αποδομούν κολλαγόνο τύπου I, τύπου II και τύπου III και οι

στρωματολυσίνες διασπών πρωτεογλυκάνες (που βρίσκονται για π.χ στον αρθρικό χόνδρο), κολλαγόνο τύπου III, τύπου IV (σε μεμβράνες) και τον τύπο V, καθώς και την καζεΐνη και την φιβρονεκτίνη (Chakraborti et al 2003). Εκτός από την δημιουργία ενός μονοπατιού για την εισβολή των κυττάρων του οστεοσαρκώματος, οι MMPs παίζουν ενεργό ρόλο και στην αγγειογένεση. Η διαμόρφωση των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων από τις MMPs οδηγεί στην δημιουργία ενός λεπτού διάχυτου αγγειακού δικτύου που επιτρέπει το πέρασμα των καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος (Oh et al 2001). Επιπλέον, η MMP-9 απελευθερώνει τον αποθηκευμένο VEGF εντός της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Bergers et al 2000) και έτσι ο VEGF είναι σε θέση να ρυθμίζει θετικά την MMP-2 (Burbridge et al 2002). Η ιδιαίτερη σημασία των MMP2 και MMP9 στην εξέλιξη του όγκου έχει διαπιστωθεί σε μια *in vivo* μελέτη, όπου ποντίκια με συνδυασμένη ανεπάρκεια MMP2/MMP9 παρουσίαζαν σημαντικά μειωμένη αγγειογένεση και ικανότητα εισβολής/διήθησης (Masson et al 2005).

Ο ενεργοποιητής πλασμινογόνου ουροκινάσης (uPA) αποτελεί έναν άλλο βασικό ρυθμιστή της εισβολής του οστεοσαρκώματος που αλληλεπιδρά με τις MMPs. Ο uPA δεσμεύεται στον υποδοχέα του uPAR ώστε να ενεργοποιηθεί. Μόλις ενεργοποιηθεί, ο uPA διασπά το πλασμινογόνο σε πλασμίνη. Η πλασμίνη διασπά την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, αλλά επίσης, ενεργοποιεί τις proMMPs (Choong et al 2003, Pillay et al 2007). Ο ρόλος του συστήματος uPA - uPAR έχει εδραιωθεί στην παθογένεια του οστεοσαρκώματος καθώς έχει αποδειχθεί μια αντίστροφη σχέση μεταξύ των επιπέδων uPA και του χρόνου επιβίωσης (Choong et al 1996). Η καταστολή της έκφρασης του uPAR σε ένα *in vivo* μοντέλο οστεοσαρκώματος οδήγησε σε μειωμένη ανάπτυξη του πρωτοπαθούς όγκου και λιγότερες μεταστάσεις (Dass et al 2005).

### 1.1.8 Ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης

Εχει διαπιστωθεί ότι η έκφραση της αλδολάσης A, -διφωφορικής φρουκτόζης (ALDOA) ή / και σουλφοτρανσφερασών 3A οικογένειας, μέλους 1 (SULT1A3) ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα που εμφάνισαν μικρότερο χρόνο επιβίωσης, υποδεικνύοντας αυτές τις πρωτεΐνες ως αρνητικούς δείκτες επιβίωσης του οστεοσαρκώματος (Chen et al 2012). Knockdown της Polo-like κινάσης 1 (PLK1) προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού κύκλου της μίτωσης και οδήγησε μετέπειτα σε αυξημένη απόπτωση σε αρκετές κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος και κατέστειλε την ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων οστεοσαρκώματος σε ανοσοανεπαρκείς ποντικούς (Yamaguchi et al 2009). Η Minibrain related kinase (MirK ή Dyrk1B), είναι επίσης ένα πιθανό σημαντικό μόριο στην παθοφυσιολογία του οστεοσάρκωματος. Η συνολική επιβίωση των ασθενών με υψηλή έκφραση MirK ήταν σημαντικά χαμηλότερη από ό, τι σε ασθενείς με χαμηλή ή μέτρια έκφραση MirK. Επιπλέον, η καταστολή της MirK ανέστειλε την ανάπτυξη και την επαγόμενη απόπτωση σε κύτταρα οστεοσαρκώματος (Yang et al 2010). Το Bcl-XL και η midkine αποτελούν επίσης σημαντικά μόρια στην εξέλιξη του οστεοσαρκώματος. Σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του Bcl-xL mRNA σχετίζονται με φτωχότερη επιβίωση σε σύγκριση με τα χαμηλά επίπεδα. Η καταστολή ή αύξηση της έκφρασης Bcl-xL οδήγησε αντίστοιχα σε μείωση ή αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε κύτταρα οστεοσαρκώματος (Wang et al 2010). Επιπλέον, η καταστολή της Bcl-xL είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική ενίσχυση της χημειοευαισθησίας και ακτινοευαισθησίας των κυττάρων οστεοσαρκώματος in vitro, και αυτό θα μπορούσε να σχετίζεται με αυξημένη δραστηριότητα της κασπάσης-3. Η Midkine εκφράζεται ιδιαίτερα σε κύτταρα οστεοσαρκώματος. Η καταστολή της Midkine οδηγεί σε σημαντικά αυξημένη



απόπτωση, ενώ η θεραπεία με ανασυνδυασμένη midkine σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η χρήση Αντι-midkine μονοκλωνικού αντισώματος κατέστειλε την κυτταρική ανάπτυξη και την μετάσταση του οστεοσαρκώματος στον πνεύμονα, γεγονός που υποδηλώνει ότι έχει πιθανή κεντρική θέση στην παθοφυσιολογία του οστεοσαρκώματος (Sueyoshi et al 2012).

## 1.2 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ

Παρά τις κλινικές δοκιμές αρκετών δεκαετιών, με την εφαρμογή διαφόρων χημειοθεραπευτικών σχημάτων, οι πρότυποι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του οστεοσαρκώματος παραμένουν η μεθοτρεξάτη, η δοξορουβικίνη (αδριαμυκίνη), και η σισπλατίνη (MAP) με ή χωρίς ιφωσφαμίδη. Η χειρουργική αφαίρεση όλου του όγκου (πρωτοπαθούς εστίας και μεταστάσεων) απαιτείται για τη θεραπεία. Οι περισσότεροι ασθενείς λαμβάνουν συμπληρωματική χημειοθεραπεία που ακολουθείται από χειρουργική επέμβαση διάσωσης του άκρου. Με τη χημειοθεραπεία και τη χειρουργική επέμβαση, η συνολική επιβίωση και η επιβίωση χωρίς συμβάματα (EFS) για ασθενείς με μη μεταστατική νόσο αναμένεται να είναι περίπου 75% και 65%, αντίστοιχα, στα 5 έτη (Meyers et al 2008). Οι ασθενείς με πνευμονικές ή οστικές μεταστάσεις έχουν χειρότερη πρόγνωση, με μόνο 25% έως 50% επιβίωση στα 5 έτη (Bacci et al 2006). Σε μελέτη με μεγάλο δείγμα ασθενών που αφορά τους προγνωστικούς παράγοντες, η θέση του όγκου και το μέγεθος, η παρουσία μεταστάσεων, η ύφεση της νόσου μετά τη χειρουργική αντιμετώπισή της, καθώς και το ποσοστό της νέκρωσης του όγκου μετά από συμπληρωματική χημειοθεραπεία έχουν αναδειχθεί ως οι περισσότερο σημαντικοί ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες (Bielack et al 2002). Άλλοι τομείς έρευνας για ασθενείς με μεταστατική νόσο κατά την διάγνωση περιλαμβάνουν την προσθήκη του

trastuzumab στο χημειοθεραπευτικό σχήμα ασθενών με όγκους που εκφράζουν HER2/neu39 καθώς και τη χρήση διφωσφορικών (Meyers et al 2011).

Η ευρεία χειρουργική εκτομή παραμένει η κύρια μέθοδος χειρουργικής θεραπείας για το οστεοσάρκωμα. Η πρόοδος στην απεικόνιση, τις χειρουργικές τεχνικές και τα εμφυτεύματα έχει μειώσει δραματικά την ανάγκη για ακρωτηριασμό κατά τις τελευταίες 3 δεκαετίες. Η αύξηση της επιβίωσης συμβαδίζει με την αύξηση του ποσοστού διάσωσης του πάσχοντος μέλους (Ayerza et al 2010). Η χειρουργική αντιμετώπιση του παιδικού οστεοσαρκώματος απαιτεί προσεκτικούς χειρισμούς. Οι περισσότεροι όγκοι προκύπτουν στο μεταφυσιακό τμήμα του οστού και εφάπτονται ή περιλαμβάνουν την επιφυσιακή πλάκα. Έτσι, η χειρουργική εκτομή συχνά οδηγεί σε ανισοσκελία των άκρων κατά την ανάπτυξη του παιδιού. Μικρές αποκλίσεις στο μήκος των άκρων μπορούν να αντιμετωπιστούν με επιμήκυνση κατά το χρόνο της εκτομής και τροποποιήσεις στα υποδύματα. Όσον αφορά τα παιδιά με μεγαλύτερη αναμενόμενη ανισοσκελία, έχουν δημιουργηθεί προθέσεις που επιτρέπουν την in vivo επιμήκυνση του σκέλους κατά την πορεία ανάπτυξης του παιδιού. Αν και τα αρχικά συστήματα απαιτούσαν μεγάλο αριθμό επανεπεμβάσεων και είχαν υψηλά ποσοστά μηχανικής αποτυχίας, πολλά νεότερα σχέδια εμφυτευμάτων επιτρέπουν τη μη επεμβατική επέκταση με τη βοήθεια εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (Neel et al 2003).

Μια μικρή μόνο μειοψηφία ασθενών κρίνονται ακατάλληλοι για θεραπεία διάσωσης των άκρων, κυρίως λόγω της έκτασης του όγκου, της μικρής ηλικίας και της αναμενόμενης ανισοσκελίας των κάτω άκρων, ή την επιθυμία για υψηλή λειτουργικότητα. Αυτοί οι ασθενείς αντιμετωπίζονται με rotationplasty (εφόσον οι νευρολογικές δομές δεν διηθούνται από τον όγκο), ή ακρωτηριασμό. Αν και είναι μια δραματική από άποψη εμφάνισης χειρουργική μέθοδος, η rotationplasty προσφέρει

εξαιρετικά ογκολογικά και λειτουργικά αποτελέσματα με φυσιολογική ψυχοκοινωνική εξέλιξη (Fuchs et al 2003). Όσον αφορά τους ασθενείς που αντιμετωπίζονται με ακρωτηριασμό, οι πρόσφατες εξελίξεις στο χώρο των προθετικών αρθρώσεων με μικροεπεξεργαστή έχει οδηγήσει σε σημαντική βελτίωση των λειτουργικών αποτελεσμάτων σε σύγκριση με τις συμβατικές προθέσεις (Highsmith et al 2010).

Ιστορικά, το οστεοσάρκωμα θεωρείται ακτινοάντοχος όγκος. Παρόλα αυτά, η πρόοδος στην ακτινοθεραπεία, που επιτρέπει την ασφαλή χορήγηση υψηλών δόσεων ακτινοβολίας, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο για τους ασθενείς με ανεγχείρητο όγκο ή με ατελή εκτομή του όγκου στον αξονικό σκελετό (Ciernick et al 2011).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η χειρουργική αφαίρεση του όγκου μπορεί να συνδυαστεί με χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία. Ωστόσο, η τοξικότητα είναι ένα κοινό πρόβλημα που συνδέεται με την επιθετική χημειοθεραπεία. Λόγω του χαμηλού θεραπευτικού εύρους των χημειοθεραπευτικών σχημάτων, ελέγχεται η αποτελεσματικότητα φαρμάκων με στόχο την ανακάλυψη νέων μορίων. Οι νέες αυτές θεραπευτικές προσεγγίσεις ενδεχομένως να επιτρέψουν τη μεγιστοποίηση των δυνατοτήτων θεραπείας του οστεοσαρκώματος με μειωμένες τοξικές επιδράσεις. Το χαρακτηριστικό αυτών των στοχευμένων φαρμάκων είναι η ικανότητά τους να εντοπίζουν και να καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα χωρίς να βλάπτουν τα φυσιολογικά κύτταρα (Vasir et al 2005).

Η ιντερφερόνη- $\gamma$  είναι γνωστό ότι ενισχύει την ευαισθησία του οστεοσαρκώματος σε έναν αριθμό χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, και ταυτόχρονα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση (Ta et al 2009). Μελέτες που διεξήχθησαν πρόσφατα απέδειξαν ότι ο συνδυασμός της ιντερφερόνης- $\gamma$  και

συμβατικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων όπως η δοξορουβικίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπευτική προσέγγιση του οστεοσαρκώματος με ενεργό γονίδιο p53 (Yuan et al 2007). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η ιντερφερόνη-γ ευαισθητοποιεί κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος μέσω της αύξησης των υποδοχέων Fas και κασπάσης (Inaba et al 2004).

Οι ιντερλευκίνες (ILs) έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί πειραματικά σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος. Η ιντερλευκίνη-2 (IL-2) είναι γνωστό ότι διευκολύνει την παραγωγή των ανοσοσφαιρινών και επάγει τη διαφοροποίηση των κύτταρων φυσικών φονέων (NK) (Ta et al 2009).

Κλινικά, η στοχευμένη φαρμακευτική θεραπεία με trastuzumab (Herceptin) υπήρξε πολύ επιτυχής σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού που εμφάνιζαν υπερέκφραση του ανθρώπινου υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2/neu) (Hudis et al 2007). Η έκφραση του HER2 μπορεί να σχετίζεται με την παθογένεση του οστεοσαρκώματος, και ως εκ τούτου μπορεί να αποτελεί ένα ακόμη θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση της νόσου (Hughes et al 2004).

Η οικογένεια των αυξητικών παραγόντων της ινσουλίνης (IGFs) εμπλέκεται στην κυτταρική διαφοροποίηση και την ανάπτυξη, ειδικά όσον αφορά τη φάση της ταχείας ανάπτυξης των οστών. Η υπερέκφραση του IGF-1 και IGF-2 βρέθηκε σε έναν μεγάλο αριθμό καρκινικών κυτταρικών σειρών, περιλαμβανομένων των πρωτογενών σαρκωμάτων (O'Day et al 2009). Η χρησιμότητα των μορίων που στοχεύουν τον IGF-1 υποδοχέα διερευνάται επί του παρόντος, σε μια σειρά από προκλινικές και κλινικές μελέτες.

Ο ρόλος των σηματοδοτικών μονοπατιών σε αρκετές περιπτώσεις κακοήθων νόσων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφόρων φαρμάκων. Είναι γνωστή η έρευνα που διεξάγεται για την κατανόηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που

ενεργοποιούνται με την πρόσδεση των αυξητικών παραγόντων στους υποδοχείς τους. Μια τέτοια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση είναι η χρήση της rapamycin για την καταστολή των κινασών σερίνης/θρεονίνης (mTOR) στο οστεοσάρκωμα (Ferrari et al 2007). Το mTOR είναι μια βασική συνιστώσα του μονοπατιού σηματοδότησης του AKT, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Η ανασταλτική δράση της rapamυκίνης εναντίον καρκινικών κυττάρων έχει αναδειχθεί σε μοντέλα ποντικών με οστεοσάρκωμα, καθώς και σε παιδιατρικές κλινικές μελέτες (Wan et al 2005, Houghton et al 2008).

Ο ρόλος του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), ο οποίος υποστηρίζει την αγγειογένεση μέσω της αναστολής της απόπτωσης, έχει επίσης αναμειχθεί στη θεραπεία του οστεοσαρκώματος. Πρόσφατα, μια μελέτη για τον AZD2171, έναν ειδικό αναστολέα του υποδοχέα VEGF, έχει δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Ο αναστολέας AZD2171 δείχνει μια ανασταλτική δράση επί στερεών καρκινικών ξενομοσχευμάτων οστεοσαρκώματος (Maris et al 2008).

Ο αυξητικός παράγοντας του κερωσμένου επιθηλίου (PEDF), σε αντίθεση με τον VEGF, είναι ένας ισχυρός αναστολέας της αγγειογένεσης, και ένα μειωμένο επίπεδο PEDF συνδέεται με πολλούς τύπους όγκων (Clark et al 2008). Μελέτες που διεξήχθησαν σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος απέδειξαν ότι ο PEDF αναστέλλει την αγγειογένεση από την καταστολή του VEGF και επάγει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της οδού απόπτωσης Fas / FasL (Cai et al 2006, Volpert et al 2002).

Ο υποδοχέας ενεργοποιητής του προσδέτη του πυρηνικού παράγοντα kappa-B ligand (RANKL) είναι γνωστό ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη βιολογία των οστεοκλαστών, ελέγχοντας την οστεοκλαστογένεση και την οστεοκλαστική δραστηριότητα (O'Day et al 2009). Ως εκ τούτου, οι αναστολείς του RANKL

εμφανίζουν θεραπευτικά αντικαρκινικά αποτελέσματα με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες.

Το Denosumab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναστέλλει τη δραστικότητα του RANKL, έχει δείξει ελπιδοφόρα αποτελέσματα στη θεραπεία των ασθενών με οστικές μεταστάσεις του καρκίνου του μαστού (Lipton et al 2009). Το πιθανό όφελος από τη χρήση αυτού του αντισώματος στη θεραπεία του οστεοσάρκωματος χρειάζεται περαιτέρω έλεγχο και μελέτη.

Οι υποδοχείς τρανσφερίνης, οι οποίοι εκφράζονται από τα καρκινικά κύτταρα, μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα της γονιδιακής θεραπείας για τον καρκίνο. Σε σχετική μελέτη εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα του γονιδίου p53 με την εισαγωγή του σε μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος (HOSM-1) η οποία εξέφραζε τον υποδοχέα της τρανσφερίνης (Nakase et al 2005). Λιποσώματα με τον υποδοχέα της τρανσφερίνης χρησιμοποιήθηκαν για την παράδοση. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ανασταλτική δράση της τρανσφερίνης με τη μεσολάβηση λιποσωμάτων στα κύτταρα του όγκου, γεγονός που υποδηλώνει μια αποτελεσματική στρατηγική για τη θεραπεία του οστεοσαρκώματος.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν διεξαχθεί για να διερευνηθεί η επίδραση του συνδυασμού αυτόλογων βλαστικών κυττάρων με υψηλές δόσεις χημειοθεραπείας στην αντιμετώπιση του υποτροπιάζοντος οστεοσαρκώματος (Fagioli et al 2002). Αν και αυτές οι μελέτες απέτυχαν να δείξουν βελτίωση στο ποσοστό επιβίωσης, ο συνδυασμός της μεταμόσχευσης βλαστικών κυττάρων και της χημειοθεραπείας υψηλών δόσεων παραμένει μια σημαντική θεραπευτική στρατηγική για περαιτέρω διερεύνηση.

### 1.3 Γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) / Πρωτεογλυκάνες (PGs)

#### 1.3.1 Πρωτεογλυκάνες και καρκίνος

Είναι γνωστή η συμμετοχή των πρωτεογλυκανών στη βιολογία του καρκίνου εδώ και αρκετές δεκαετίες. Αρχικά, παρατηρήθηκε από παθολογοανατομικές μελέτες ότι ορισμένα καρκινώματα επάγουν μία δεσμοπλαστικού υπερπλαστικού τύπου αντίδραση εντός του στρώματος που περιβάλλει τα κύτταρα του καρκίνου. Συχνά αυτοί οι αντιδραστικοί ιστοί βάφονται με κατιονικές βαφές, όπως μπλε της Αλσατίας υποδεικνύοντας υψηλή συγκέντρωση γλυκοζαμινογλυκανών και πρωτεογλυκανών στο περιεχόμενο της δεσμοπλαστικής αντίδρασης. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η δεσμοπλαστική αντίδραση συμβαίνει σε όγκους με διαφορετικό ιστογενετικό υπόβαθρο (Adany et al 1990), φαίνεται εύλογο να υποθέσει κανείς ότι αυτή η ανώμαλη έκφραση των πρωτεογλυκανών είναι ένα είδος γενικής αντίδρασης στην εισβολή των καρκινικών κυττάρων, με στοιχεία που είτε διευκολύνουν είτε καταστέλλουν την ανάπτυξη του όγκου (Iozzo et al 1995). Με την πρόοδο της μοριακής και κυτταρικής βιολογίας, ο ρόλος των πρωτεογλυκάνων στη βιολογία του καρκίνου έχει οριοθετηθεί καλύτερα. Για παράδειγμα, γνωρίζουμε πλέον ότι κάποιες πρωτεογλυκάνες θεικής ηπαράνης (HSPGs) δρουν ως προ-αγγειογενετικοί παράγοντες δεσμεύοντας διάφορους αυξητικούς παράγοντες και παρουσιάζοντάς τους στους υποδοχείς τους (Iozzo 2001). Αντίθετα, τα O-terminal τμήματα άλλων πρωτεογλυκανών έχει βρεθεί ότι εξουδετερώνουν την αγγειογενετική διαδικασία αναστέλλοντας τη δραστηριότητα αρκετών ιντεγκρινών αναγκαίων για μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Iozzo 2005, Kalluri 2003). Ο προσδιορισμός της δομής και της λειτουργίας των πρωτεογλυκανών θεικής ηπαράνης της κυτταρικής μεμβράνης τις τελευταίες δύο δεκαετίες, έχει οδηγήσει στην κατανόηση του ρόλου

και της σημασίας που έχουν αυτά τα μόρια στην κυτταρική συμπεριφορά (Sanderson 2001).

Τόσο οι συνδεκάνες (syndecans) όσο και οι γλυπικάνες (glypicans) έχουν ενοχοποιηθεί ως ρυθμιστές της εξέλιξης του καρκίνου και επιπλέον μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για την έγκαιρη ανίχνευση ή τη σοβαρότητα της νόσου (Sanderson 2004, Filmus 2001). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι νεότερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι κυτταρικές πρωτεογλυκάνες θεικής ηπαράνης επιφάνειας μπορεί να έχουν διαφορετικούς ρόλους στον καρκίνο και να δρουν είτε ως αναστολείς ή ως ενεργοποιητές της εξέλιξης των όγκων, ανάλογα με τον τύπο και το στάδιο του καρκίνου. Επιπλέον, η λειτουργία αυτών των πρωτεογλυκανών μπορεί να μεταβληθεί με δύο κατηγορίες ενζύμων εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου: 1) Αυτά που μπορούν να απελευθερώσουν πρωτεογλυκάνες από την κυτταρική επιφάνεια (shedases) και 2) Αυτά που μπορούν να τροποποιήσουν τη δομή των αλυσίδων θεικής ηπαράνης (ηπαράνες και ενδοσουλφατάσες) (Manon-Janson et al 2010, Barash et al 2010). Έτσι, η έκφραση αυτών των ενζύμων μπορεί να λειτουργεί ως ένας μηχανισμός για τον έλεγχο της θέσης και της λειτουργίας των πρωτεογλυκανών και ως εκ τούτου, της συμπεριφοράς των κυττάρων του όγκου (Sanderson et al 2008). Μια άλλη κατηγορία πρωτεογλυκανών που φέρουν κυρίως θεική δερματάνη ή θεική χονδροϊτίνη, οι λεγόμενες μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRPs), δρουν ως καταστολείς των όγκων, αναστέλλοντας τη δράση των υποδοχέων κινασών τυροσίνης όπως ο EGFR και Met (Iozzo et al 2010). Επιπλέον, ορισμένες από τις SLRPs αλληλεπιδρούν με τις ιντεγκρίνες και τους υποδοχείς Toll και ελέγχουν την προσκόλληση και την ανοσία (Schaefer et al 2010).



### 1.3.2 Διγλυκάνη (BGN)

Η διγλυκάνη είναι ένα μέλος της κατηγορίας I της οικογένειας των μικρών πλούσιων σε λευκίνη πρωτεογλυκανών (SLRPs) (Schaefer και Iozzo 2008). Το γονίδιο της διγλυκάνης έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα X (McBride et al 1990) και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 42-kDa (Bianco et al 1990) που περιέχει επαναλήψεις αλληλουχιών πλούσιες σε λευκίνη (Lrrs), όπου είναι συνδεδεμένα ομοιοπολικά, ένα ή δύο μόρια γλυκοζαμινογλυκάνης (GAG) ως πλευρικές αλυσίδες. Οι αλυσίδες GAGs της θειικής χονδροϊτίνης ή / της θειικής δερματάνης συνδέονται, μέσω της σερίνης, στο N-τελικό άκρο του πρωτεϊνικού κορμού της διγλυκάνης (Choi et al 1989, Roughley και White 1989). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η διγλυκάνη μπορεί να είναι μια πρωτεογλυκάνη "μερικής απασχόλησης", καθώς, στο γηρασμένο αρθρικό χόνδρο και στους μεσοσπονδύλιους δίσκους, έχει βρεθεί στη μη γλυκοζυλιωμένη της μορφή (Johnstone et al 1993, Roughley et al 1993).

Η διγλυκάνη, η οποία εκφράζεται σε αφθονία (Bianco et al 1990, Ungefroren et al 1998), συντίθεται ως ένα πρόδρομο μόριο από το οποίο ένα N-terminal προπεπτίδιο αποσπάται από την μορφογενετική πρωτεΐνη οστού (BMP) 1 για να δώσει τελικά την ώριμη μορφή της (Scott et al. 2000). Εκκρινόμενη, η διγλυκάνη, αλληλεπιδρά μέσω του πρωτεϊνικού κορμού ή μέσω των αλυσίδων GAG με πολυάριθμες συνιστώσες του εξωκυττάριου χώρου (ECM)-π.χ. κολλαγόνο τύπου I, II, III, VI και ελαστίνη (Schonherr et al 1995, Hunzelmann et al 1996, Reinboth et al 2002, Douglas et al 2006, Hwang et al 2008), με αποτέλεσμα να αθροίζεται στο ECM πολλών οργάνων.

Από την ανακάλυψη της σημασίας της διγλυκάνης στην ανάπτυξη των οστών σχεδόν 30 χρόνια πριν (Fisher et al. 1983), ένα πλήθος μελετών έχουν προσπαθήσει να διαλευκάνουν το βιολογικό ρόλο αυτής της πρωτεογλυκάνης. Αρχικά, η διγλυκάνη

θεωρήθηκε απλώς ένα στατικό δομικό συστατικό του ECM. Μετά από παρατηρήσεις που έγιναν σε μοντέλα οστεοπόρωσης ποντικών, τα οποία δεν εξέφραζαν διγλυκάνη, ξεκίνησε μια σειρά ερευνών που αφορούν τους μηχανισμούς της εξαρτώμενης από την διγλυκάνη ρύθμιση του σχηματισμού των οστών και της διαμόρφωσης των ινών κολλαγόνου (Xu et al 1998, Ameye et al 2002, Corsi et al 2002, Bi et al 2005, Bi et al 2007, Zhang et al 2009, Embree et al 2010). Η ικανότητά της διγλυκάνης να αλληλεπιδρά με το αυξητικό παράγοντα  $\beta$  του μετασχηματισμού (TGF  $\beta$ ) (Hildebrand et al 1994.), τον παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF- $\alpha$ ) (Tufvesson Westergren-Thorsson 2002), τις BMP-2, -4, και -6 (Chen et al 2004, Mochida et al 2006), και την Wnt-εκκρινόμενη πρωτεΐνη 1 (WISP1) (Desnoyers et al 2001), ανέδειξε τη διγλυκάνη ως διαμορφωτή αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών. Πρόσφατες μελέτες ανακάλυψαν τον ρόλο της διγλυκάνης ως ένα μόριο (Schaefer et al 2005, Babelova et al 2009, Moreth et al 2012, Berendsen et al 2011) που προσδένεται στους Toll-like υποδοχείς (TLRs) -2 και -4 (Schaefer et al. 2005), στους P2X7/P2X4 πουρινεργικούς υποδοχείς (Babelova et al. 2009), στους χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνικούς υποδοχείς σχετιζόμενους με την πρωτεΐνη 6, (LRP6) (Berendsen et al. 2011), ή τον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης MuSK (Amenta et al 2012). Όλες οι παραπάνω μελέτες δημιούργησαν ένα νέο πρότυπο για το πώς αυτή η πρωτεογλυκάνη ρυθμίζει μια σειρά από βιολογικές διεργασίες και ανέδειξαν τη σημασία της διγλυκάνης ως μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος (Schaefer et al 2005), ρυθμιστή της οστεογένεσης (Berendsen et al 2011, Moreth et al 2012), ως μόριο που συμμετέχει στη συναπτική σταθερότητα (Amenta et al 2012), καθώς και την ακεραιότητα των μυών (Mercado et al 2006, Amenta et al 2011). Η παρατήρηση ότι η διγλυκάνη είναι ικανή να οδηγεί στην ομαδοποίηση διαφόρων τύπων υποδοχέων και να ενορχηστρώνει τη σηματοδότησή τους (Babelova et al. 2009)

υπογραμμίζει περαιτέρω την πολυπλοκότητα των δικτύων σηματοδότησης στα οποία μετέχει η διγλυκάνη.

Έχει αναφερθεί η συμμετοχή της διγλυκάνης σε αρκετές ασθένειες του ανθρώπου, αντικατοπτρίζοντας με αυτόν τον τρόπο την εκτεταμένη έκφραση καθώς και την πολύπλοκη λειτουργία της. (Πίνακας 1).

**Table 1.** Involvement of Biglycan in Selected Experimental and Human Diseases

Disease	Species	References
Alzheimer disease	Mouse	Lam et al. 2011
Aortic dissection	Mouse, human	Bellucci et al. 2007; Heegaard et al. 2007
Asthma	Mouse, rat, human	Pini et al. 2007; Pinelli et al. 2009; Nihlberg et al. 2010; Venkatesan et al. 2012
Atherosclerosis	Mouse, rat, human	Skalen et al. 2002; Nakashima et al. 2007
Cancer	Human	Mintz et al. 2005; Coulson-Thomas et al. 2011; Gu et al. 2012; Wang B et al. 2011
Diabetes	Mouse, rat, human	Schaefer et al. 2001; Thompson et al. 2011; Bolton et al. 2012
Duchenne muscular dystrophy	Mouse, human	Fadic et al. 2006; Mercado et al. 2006; Brandan et al. 2008; Amenta et al. 2011
Intervertebral disc disorders	Human	Brown et al. 2012
Fibrotic liver disease	Rat, human	Meyer et al. 1992; Krull et al. 1993; Gressner 1994; Hogemann et al. 1997
Myocardial infarction	Mouse, human	Campbell et al. 2008; Westermann et al. 2008
Multiple sclerosis	Human	Mohan et al. 2010
Osteoarthritis	Mouse	Wadhwa et al. 2005; Embree et al. 2010
Osteoporosis	Mouse	Xu et al. 1998
Perimyocarditis	Mouse	Popovic et al. 2011
Fibrotic kidney disease	Mouse, rat, human	Schaefer et al. 1998; Schaefer et al. 2000; Kuroda et al. 2004; Schaefer 2011
Rheumatic arthritis	Human	Polgar et al. 2003; Sokolove et al. 2012; Antipova and Orgel 2012
Sepsis	Mouse	Schaefer et al. 2005; Babelova et al. 2009
Systemic lupus erythematosus	Mouse, human	Moreth et al. 2010

*Πίνακας 1.* Συμμετοχή της Διγλυκάνης σε ασθένειες του ανθρώπου και σε πειραματικά μοντέλα νόσων

Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι ορισμένα από τα συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο της διγλυκάνης σε συγκεκριμένες ασθένειες βασίζονται αποκλειστικά σε ιστολογικά ευρήματα. Νέα ευρήματα δείχνουν ότι μόνο η ελεύθερη (unsequestered) μορφή της διγλυκάνης είναι ικανή να δρα ως μόριο σηματοδότησης, τουλάχιστον στην φλεγμονή (Schaefer et al 2005, Babelova et al 2009). Ως εκ τούτου, η ποσότητα της διγλυκάνης σε παθολογοανατομικές τομές ιστοτεμαχίων δεν αντανακλά

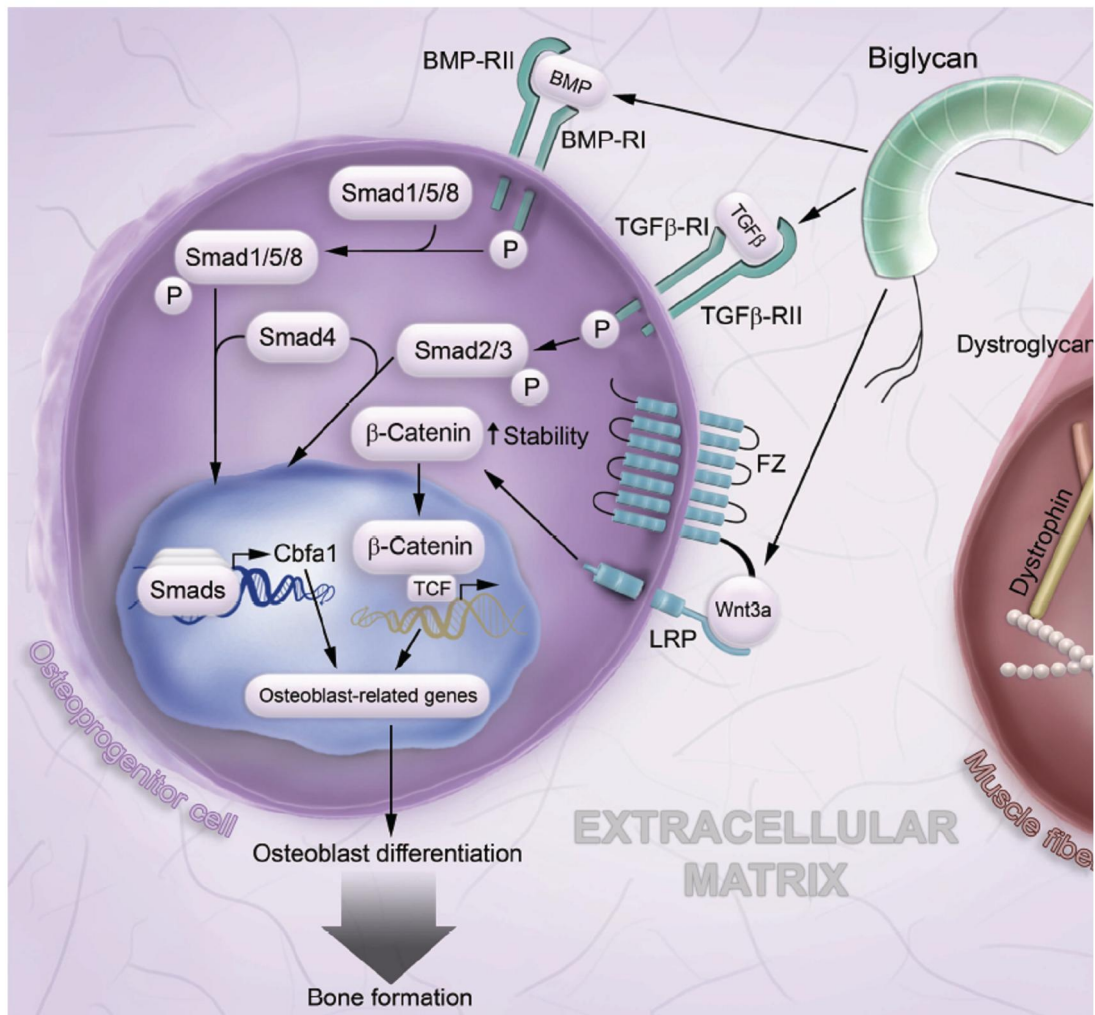
απαραίτητα το βιολογικό αποτέλεσμά της καθώς αντιπροσωπεύει κυρίως τη διγλυκάνη που έχει αθροισθεί στο ECM, για παράδειγμα, ως μέρος της ινώδους ουλής (Schaefer 2011).

Πρόσφατα δεδομένα παρέχουν ενδείξεις για τον κρίσιμο ρόλο της διγλυκάνης στη ρύθμιση της φλεγμονής, την ανάπτυξη των οστών και την ανάπτυξη και αναγέννηση των μυών.

### **1.3.3 Η σηματοδότηση της διγλυκάνης στο σχηματισμό των οστών**

Η υποψία για τον ρόλο που μπορεί να έχει η διγλυκάνη στην ανάπτυξη του οστού ετέθει με βάση την παρατήρηση ότι οι γυναίκες ασθενείς με σύνδρομο Turner, οι οποίες στερούνται του δεύτερου χρωμοσώματος X, έχουν μικρότερο ανάστημα και ασυνήθιστα χαμηλή έκφραση διγλυκάνης, σε αντίθεση με τους ασθενείς με υπεράριθμα χρωμοσώματα X (Ameye και Young 2002). Επιπλέον, ποντίκια με ελλειπή έκφραση της διγλυκάνης εμφάνισαν ένα φαινότυπο παρόμοιο με αυτό της οστεοπόρωσης, δείχνοντας ότι η διγλυκάνη είναι το πρώτο μη κολλαγονώδες συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας των οστών, που είναι ταυτόχρονα ρυθμιστής του σχηματισμού των οστών και της οστικής μάζας (Xu et al 1998, Young et al. 2002). Ο προσδιορισμός των σχετικών μοριακών μηχανισμών για την ανάπτυξη αυτού του οστεοπορωτικού φαινοτύπου σε ποντίκια με ανεπάρκεια στην έκφραση της διγλυκάνης έχει προκαλέσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια (Wadhwa et al 2004, Young et al 2006, Bi et al 2007, Wadhwa et al 2007, Embree et al 2010, Berendsen et al 2011).

Απεδείχθη ότι με την πρόοδο της ηλικίας, τα ελλιπή σε διγλυκάνη ποντίκια παράγουν χαμηλότερους αριθμούς στρωματικών κύτταρων (οστεοβλάστες, ινοβλάστες) που προέρχονται από το μυελό των οστών. Επιπλέον, η ανταπόκριση των κυττάρων αυτών στον TGFβ είναι επίσης μειωμένη, γεγονός που υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο των μονοπατιών σηματοδότησης των BMPs στην ανάπτυξη αυτού του φαινοτύπου (Ameys and Young 2002, XD Chen et al 2002). Πράγματι, η διγλυκάνη φάνηκε να τροποποιεί την μεσολαβούμενη από την BMP4 (οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 4) οστεοβλαστική διαφοροποίηση σε κρανιακά κύτταρα ποντικού έλεγχοντας την φωσφορυλίωση της Smad1 και την έκφραση Cbfa1 (πυρήνας δεσμευτικό παράγοντα α1) (Chen et al XD. 2004) (Εικ. 1).



*Εικόνα 1* Μηχανισμοί Ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων κυττάρων της οστεοβλαστικής σειράς από την Διγλυκάνη

Άλλη μελέτη επιβεβαίωσε επίσης το ρόλο της διγλυκάνης στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση και την επακόλουθη ασβεστοποίηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της BMP4 (Parisuthiman et al 2005). Εκτός της BMP4, *in vitro* δοκιμασίες πρόσδεσης έδειξαν ότι η διγλυκάνη αλληλεπιδρά με άλλες BMPs, όπως η BMP2 και 6. Η διγλυκάνη είναι σε θέση να δεσμεύει άμεσα την BMP2 και τον υποδοχέα της, ALK6 (επίσης γνωστό ως BMP-RIB), γεγονός που συμβάλει στην εξαρτώμενη από την BMP2 διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Moreno et al 2005).

Ωστόσο, ο ρόλος της σηματοδότησης της διγλυκάνης στα οστά δεν περιορίζεται μόνο σε αλληλεπιδράσεις με τις BMPs. Η διγλυκάνη είναι επίσης σε θέση να ενεργοποιεί την σηματοδότηση του κανονικού μονοπατιού Wnt / β-κατενίνης (Εικ. 1). Η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μονοπατιού περιλαμβάνει την πρόσδεση του συνδέτη Wnt στον υποδοχέα Frizzled (FZ) και του συνυποδοχέα, LRP6, αυξάνοντας τη σταθερότητα της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και την προώθηση της στον πυρήνα. Η διγλυκάνη συνδέεται άμεσα με τον προσδέτη Wnt και την LRP6 μέσω του πρωτεϊνικού της κορμού. Η έλλειψη διγλυκάνης οδήγησε σε μειωμένη Wnt-επαγόμενη φωσφορυλίωση και LRP6 LEF1/TCF-εξαρτώμενη μεταγραφική δραστηριότητα σε κρανιακά κύτταρα. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι *in vivo*, η διγλυκάνη ρυθμίζει την έκφραση της WISP1 κατά τη διάρκεια σχηματισμού των οστών σε ένα μοντέλο κατάγματος-πόρωσης (Berendsen et al 2011). Παρολαυτά, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί ο μοριακός μηχανισμός, μέσω του οποίου η διγλυκάνη ρυθμίζει το μονοπάτι του Wnt.

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η διγλυκάνη συνδέεται άμεσα με την πρωτεΐνη WISP1 (Desnoyers et al 2001) και ότι το mRNA της WISP1 συνεντοπίζεται με την διγλυκάνη κατά τη διάρκεια της επασβέστωσης in vivo (French et al 2004, Inkson et al 2009), έχει προταθεί ότι η αλληλεπίδραση αυτή παίζει κάποιο ρόλο στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό πρόδρομων οστεοβλαστικών κυττάρων. Εν συντομία, η διγλυκάνη ως συστατικό της εξωκυτταρίου θεμέλιας ουσίας, διεγείρει τη διαδικασία σχηματισμού οστού μέσω ενός μηχανισμού διπλής σηματοδότησης: του μονοπατιού BMP / TGFβ και της κανονικής επαγόμενης από Wnt / β-κατενίνης οδού. Ως εκ τούτου, η διγλυκάνη μπορεί να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο φαρμακευτικό μόριο-στόχο σε ασθένειες που σχετίζονται με τα οστά και προκαλούνται από ελαττώματα στα συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια.

#### **1.3.4 Διγλυκάνη και καρκίνος**

Έχει προταθεί ότι η διγλυκάνη επηρεάζει την οργάνωση του ECM και την κυτταρική λειτουργία κυτταρικών σειρών του οστεοσάρκωματος. Η απουσία έκφρασης της διγλυκάνης σε U2OS και Saos2 κύτταρα οστεοσαρκώματος θεωρείται εν μέρει υπεύθυνη για την ελαττωματική ασβεστοποίηση των ινιδίων του κολλαγόνου που παρατηρείται στο οστεοσάρκωμα (Benayahu et al 2001). Σε κύτταρα MG63, προκαλείται διακοπή της ανάπτυξης μετά από υπερέκφραση της διγλυκάνης, και αυτά τα κύτταρα βρέθηκαν να εκφράζουν κατά προτίμηση την ντεκορίνη και την διγλυκάνη όταν βρίσκονται παγιδευμένα εντός κολλαγόνου σε καλλιέργεια (Wegrowski et al 2000). Σε άλλη μελέτη δείχθηκε ότι η επίδραση του TGFβ στην έκφραση της διγλυκάνης σε κύτταρα MG63, εξαρτάται από την κυτταρική προσκόλληση (Groth et al 2005).

### 1.3.5 Υαλουρονικό οξύ (Hyaluronan, HA)

Το HA είναι μια γραμμική μη θειωμένη γλυκοζαμινογλυκάνη αποτελούμενη από επαναλαμβανόμενους δισακχαρίτες D-γλυκουρονικό και N-ακετυλογλυκοζαμίνη με ένα ευρύ φάσμα μοριακών βαρών 105 έως 107 Da (Εικ. 3). Το HA παράγεται από τρία ισοένζυμα συνθάσης HA (HAS1, HAS2 και HAS3), οι οποίες είναι ενσωματωμένες πρωτεΐνες στην κυτταρική μεμβράνη, με τα ενεργά τους κέντρα να βρίσκονται στην ενδοκυττάρια επιφάνεια της μεμβράνης (Weigel et al 2007). Καθένα από αυτά τα τρία ένζυμα παράγει αλυσίδες HA διαφορετικού μέγεθους. Η ενεργοποίηση της HAS1 οδηγεί σε παραγωγή υψηλού μοριακού βάρους HA (2000 kDa), αν και η συνθετική δραστηριότητά της είναι χαμηλότερη από τις αντίστοιχες HAS2 και HAS3. HA παρόμοιου μοριακού βάρους παράγεται επίσης από την HAS2, η οποία επιπλέον έχει εμπλακεί σε αναπτυξιακές διεργασίες που περιλαμβάνουν την ιστική επέκταση και την ανάπτυξη. Η HAS3 έχει την υψηλότερη δραστικότητα και παράγει μικρότερες αλυσίδες HA με μοριακά βάρη μεταξύ 100 και 1000 kDa. Η δραστηριότητα της συνθάσης του HA ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες, όπως αυξητικοί παράγοντες, ενεργοποιητές πρωτεϊνικής κινάσης C και κυτοκίνες. Προφλεγμονώδεις παράγοντες, όπως η ιντερλευκίνη-1β, TNFα και TNFβ επάγουν τη σύνθεση HA, ενώ οι TGFα και TGFβ έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα (Karousou et al 2010).

Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες HA βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου, στην περικυττάρια και εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, ή ακόμη και συνδεδεμένες στη HAS και αλληλεπιδρούν με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας. Το HA είναι επίσης παρόν σε ενδοκυττάρια διαμερίσματα. Μια σημαντική ποσότητα του HA είναι επίσης παρούσα σε περιοχές ιστού που χαρακτηρίζονται από υψηλούς ρυθμούς



κυτταρικής διαίρεσης και αυξημένες δυνατότητες διήθησης (Toole et al 2001). Το HA μπορεί επίσης να ενεργεί ως μεσολαβητής της σηματοδότησης μέσω σύνδεσης με υποδοχείς HA όπως ο CD44, ο υποδοχέας RHAMM, οι Toll-like υποδοχείς 2 και 4, οι υποδοχείς LYVE-1 και ο HARE/ stabilin-2 (Jackson 2009, Kouvidi et al 2011). Πρόσφατα, το CD44 και ο υποδοχέας RHAMM έχουν αναγνωρισθεί ως μείζονες υποδοχείς που εμπλέκονται στην εξέλιξη του καρκίνου. Η αποδόμηση του HA επιτυγχάνεται μέσω της ενζυματικής δράσης των υαλουρονιδασών (Hyal-1, Hyal-2, Hyal-3 και PH-20), των οποίων η έκφραση είναι αυξημένη ή καταστέλλεται σε ορισμένες κακοήθεις καταστάσεις σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Η Hyal-1 και η Hyal-2 είναι οι κύριες υαλουρονιδάσες που εμπλέκονται στον καταβολισμό HA και δρούν συνεργικά. Πρώτον, η Hyal-2 αποδομεί υψηλού μοριακού βάρους HA στην κυτταρική επιφάνεια δημιουργώντας ποικίλου μεγέθους θραύσματα HA, τα οποία, μετά από ενδοκύττωση, αποδομούνται από την ενδοκυττάρια Hyal-1 σε υπολείμματα τετρασακχαρίτη. Πιστεύεται ότι τα διαφορετικά θραύσματα ολιγοσακχαρίτη έχουν διακριτές επιδράσεις στην εξέλιξη του καρκίνου, την αγγειογένεση και τη μετάσταση (Stern 2008).

### **1.3.6 Υαλουρονικό οξύ (HA) και καρκίνος**

Είναι γνωστό ότι το μικροπεριβάλλον του όγκου, οι αυξητικοί παράγοντες και οι χημειοκίνες που παράγονται σ' αυτόν επάγουν την παραγωγή HA (Tammi et 2011). Η παρουσία του HA παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλούς τύπους καρκίνου στον άνθρωπο. Οι λειτουργίες του HA στην εξέλιξη του καρκίνου ποικίλλουν ανάλογα με το μέγεθος και την ποσότητά του στο στρώμα του όγκου. Το HA συσσωρεύεται σε υψηλά επίπεδα σε αδενοκαρκινώματα, όπως του μαστού (Auninen et al 2000), του

πνεύμονα (Pirinen et al 2001) και τον καρκίνο των ωοθηκών (Anttila et al 2000). Αντίθετα, η περιεκτικότητα σε HA είναι χαμηλή σε πλακώδες καρκίνωμα και στο μελάνωμα, και η απουσία του είναι άμεσα σχετιζόμενη με το μεταστατικό δυναμικό (Kosunen et al 2004, Karjalainen et al 2000). Το CD44 στον πλούσιο σε HA ECM αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με υποδοχείς σηματοδότησης όπως EGFR, ErbB2 και τον υποδοχέα του TGFβ τύπου I, και έτσι στη συνέχεια ενεργοποιούνται μονοπάτια σηματοδότησης όπως PI3K/AKT ή MAPK κινασών, τα οποία ευνοούν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα καθώς και την εξέλιξη του καρκίνου (Toole 2004, Bourguignon et al 2003, Ponta 2003).

Το προφίλ γονιδιακής έκφρασης των ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του HA μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της καρκινικής εισβολής και της μετάστασης. Στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, τα πιο επιθετικά καρκινικά κύτταρα εκφράζουν τις HAS2 και Hyal-2 ισομορφές, ενώ τα λιγότερο επιθετικά κύτταρα παράγουν περισσότερο HAS3 και Hyal-3 (Udabage et al 2005). Η HAS1 ανιχνεύθηκε σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα και σχετίζεται με την μειωμένη επιβίωση τους (Adamia et al 2005). Σε καρκινώματα του παχέος εντέρου, η υπερβολική έκφραση της Hyal-1 καταστέλλει την ογκογένεση (Jacobson et al 2002). Έχει αποδειχθεί ότι, ανάλογα με τη συγκέντρωσή της, η Hyal-1 λειτουργεί είτε ως προαγωγός του όγκου είτε ως καταστολέας του όγκου (Lokeshwar et al 1996, Okamoto et al 2002). Η διάσπαση του CD44 έχει επίσης αναφερθεί ότι συσχετίζεται με την πρόοδο των όγκων, όπως του μαστού, των ωοθηκών, του γλοιώματος, του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και του παχέος εντέρου (Sugahara et al 2003). Αυτή η επίδραση αποδίδεται στα ποικίλου μεγέθους θραύσματα HA. Σε γενικές γραμμές, οι υαλουρονιδάσες στο μικροπεριβάλλον του όγκου έχουν ως αποτέλεσμα τη μερική ή πλήρη αποδόμηση του HA. Οι προκύπτοντες

ολιγοσακχαρίτες HA προκαλούν τη διάσπαση του CD44 αυξάνοντας έτσι την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων και την ικανότητα εισβολής τους (Sugahara et al 2003). Επιπλέον, οι ολιγοσακχαρίτες του HA επιδεικνύουν αγγειογενετικές ιδιότητες ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος. Θραύσματα του HA μεγέθους 3-15 μονάδων δισακχαρίτη είναι σε θέση να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, την προσκόλληση και το σχηματισμό τριχοειδών αγγείων (Matou-Nasri et al 2009, Takahashi et al 2005). Υψηλά επίπεδα αυτών των θραυσμάτων έχουν ανιχνευθεί σε πλακώδη καρκινώματα που αναπτύχθηκαν στη περιοχή της κεφαλής και του αυχένα (Franzmann et al 2003). Επιπλέον, οι ολιγοσακχαρίτες του HA διαταράσσουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του υψηλού μοριακού βάρους HA και των υποδοχέων του στα κύτταρα του όγκου (Nemec et al 1987), αναστέλλοντας την ανάπτυξη του όγκου σε πειράματα in vitro και in vivo (Zeng et al 1998) με τρόπο που τουλάχιστον κατά ένα μέρος, πραγματοποιείται διαμέσου της καταστολής του μονοπατιού PI3K/Akt (Ghatak et al 2002). Επιπλέον, οι τετρασακχαρίτες εμφανίζουν αντι-αποπτωτικές δράσεις που αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο κάτω από συνθήκες έντασης (Xu et al 2002). Έχει επίσης αναφερθεί ότι οι ολιγοσακχαρίτες του HA αναστέλλουν την εξέλιξη της οστικής μετάστασης στον καρκίνο του μαστού με την κατάργηση της αλληλεπίδρασης HA-CD44 (Urakawa et al 2011).

Το HA παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία μετάπτωσης επιθηλίου/μεσεγγύματος κατά την οποία τα κύτταρα χάνουν τη διάταξη επιθηλίου και αποκτούν μεταναστευτικό φαινότυπο. Ο μεσεγγυματικός φαινότυπος είναι σημαντικός στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και αποτελεί υποχρεωτικό στάδιο της μεταστατικής αλληλουχίας. Ο ρόλος του HA στην οργανογένεση έχει καταδειχθεί σε HAS2-null έμβρυα, στα οποία, κύτταρα του ενδοκαρδίου αποτυγχάνουν να υποστούν

τη διαδικασία επιθηλιακής/μεσεγχυματικής μετάβασης και έτσι δεν μεταναστεύουν, με αποτέλεσμα την ανώμαλη ανάπτυξη της καρδιάς (Cammenisch et al 2002). Η υπερέκφραση της HAS2 συσχετίζεται με μείωση της E-καδχερίνης (επιθηλιακός δείκτης) και της β-κατενίνης, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η υπερπαραγωγή HA επάγει την επιθηλιακή/μεσεγχυματική μετάπτωση σε καρκινικά κύτταρα (Itano et al 2002). Επιπλέον, η αυξημένη ποσότητα του HA αυξάνει την ικανότητα διήθησης των MCF-10A ανθρώπινων μαστικών επιθηλιακών κυτταρών επάγοντας την παραγωγή MMP2 και MMP9 μέσω της οδού PI3K/AKT.

Η συσχέτιση ανάπτυξης του καρκίνου και φλεγμονής έχει από καιρό δειχθεί (Balkwill et al 2001, Coussens et al 2002). Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η μακροχρόνια φλεγμονή σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη μετάσταση του καρκίνου. Σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, η καλά τεκμηριωμένη αύξηση της παραγωγής του στρωματικού HA βοηθά στη δημιουργία εξαιρετικά ενυδατωμένης ECM, διευκολύνοντας έτσι, την τοπική κυτταρική διακίνηση (trafficking) (Hallgren et al 1990, Tufveson et al 1992).

### **1.3.7 Συνδεκάνη 4 (Syndecan 4)**

Οι συνδεκάνες (syndecans) είναι μια οικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεογλυκάνων που φέρουν ως γλυκοζαμινογλυκάνη κυρίως αλυσίδες θειικής ηπαράνης (Bernfield et al 1992, Couchman 2003). Ο πρωτεϊνικός τους κορμός αποτελείται από μια σύντομη ενδοκυτταρική περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή, που είναι εξαιρετικά συντηρημένη και μια εξωκυττάρια περιοχή που παρουσιάζει διαφορές στην αλληλουχία αμινοξέων μεταξύ των τεσσάρων μελών της οικογένειας

των συνδεκανών (Bernfield et al 1992). Οι συνδεκάνες εκφράζονται σε αφθονία καθ'όλη τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και κατά την ενήλικη ζωή, αν και η καθεμία από τις συνδεκάνες παρουσιάζει διαφορετικά πρότυπα έκφρασης. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι το μοτίβο της έκφρασης και / ή η δομή της θειικής ηπαράνης μεταβάλλεται ως απόκριση σε ορισμένα παθοφυσιολογικά ερεθίσματα και αυτό με τη σειρά του μπορεί να ρυθμίσει την εξέλιξη του όγκου (Sanderson 2001, Fears et al 2006). Ως κυτταρικά συστατικά, οι συνδεκάνες μπορούν να λειτουργήσουν τόσο ενδοκυτταρικά όσο και στην κυτταρική επιφάνεια. Επιπλέον, μέσω της τροποποίησης (shedding) από πρωτεάσες, η οποία λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του κυττάρου, οι συνδεκάνες μπορούν να αποκοπούν στο εξωκυτταρικό περιβάλλον όπου μπορούν να διαχέονται μακριά από το κύτταρο και είτε να γίνουν μέρος της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ή να παραμένουν διαλυτές και έτσι να επηρεάζουν τα κύτταρα που περιβάλλουν, καθώς και κύτταρα απομακρυσμένα από την αρχική τους θέση. Στην επιφάνεια του κυττάρου, ο πρωτεϊνικός κορμός και οι αλυσίδες θειικής ηπαράνης των συνδεκανών έχει διάφορες δράσεις στην αλληλεπίδραση κυττάρου με κύτταρο και κυττάρου-ECM και στη ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης, προσκόλλησης και μετανάστευσης (Couchman 2001). Οι συνδεκάνες δεσμεύουν επίσης πολυάριθμα διαλυτά μόρια (π.χ., κυτοκίνες, χημειοκίνες) μέσω των αλυσίδων θειικής ηπαράνης τους, διευκολύνοντας έτσι τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται με αυτά τα μόρια (Tkachenko et al 2005, Perrimon et al 2001). Επιπλέον, οι συνδεκάνες μπορεί να μεταφέρουν σηματοδότηση μέσω των αλληλεπιδράσεων των πυρηνικών τους κορμών με ποικίλλα σηματοδοτικά μόρια (Lambaerts et al 2009). Έτσι, λόγω της ποικιλομορφίας τους, τόσο στον εντοπισμό, όσο και στη λειτουργία τους, οι συνδεκάνες κατέχουν μια σημαντική θέση στη ρύθμιση της ογκογένεσης καθώς και στην εξέλιξη του όγκου.

Η συνδεκάνη-4 εκφράζεται σε κάποιο βαθμό, από τους περισσότερους όγκους και επίσης συχνά βρίσκεται μέσα στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Σε αντίθεση με την συνδεκάνη -2, η οποία ενισχύει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, έχει δειχθεί μέχρι σήμερα ότι η συνδεκάνη -4 είναι παρόμοια με τη συνδεκάνη -1, κατά το ότι διαμεσολαβεί στη προσκόλληση καρκινικών κυττάρων στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και αναστέλλει την εισβολή των καρκινικών κυττάρων σε ορισμένες μορφές καρκίνου. Η συνδεκάνη -4 προάγει την προσκόλληση και τη μετανάστευση σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (Beauvais et al 2003) και βρίσκεται μειωμένη σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (Park et al 2002, Jayson et 1999). Η μειωμένη έκφραση της συνδεκάνης -4 σε κύτταρα μελανώματος οδήγησε σε καταστολή της σηματοδότησης FGF-2, που τη σειρά της οδηγεί σε αύξηση της κινητικότητας των κυττάρων του όγκου και σε μειωμένη προσκόλληση στην ινονεκτίνη (Chalkiadaki et al 2009). Αντίθετα, σε διαφορετική μελέτη προέκυψε ότι η μείωση της έκφρασης της συνδεκάνης -4 προκάλεσε μείωση στην εισβολή των κυττάρων του μελανώματος μειώνοντας την σηματοδότηση μέσω Wnt5A (O'Connell et al 2009). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η συνδεκάνη -4 μπορεί να παίζει διάφορους ρόλους στην μεταναστευτική ικανότητα του όγκου, ανάλογα με τον παράγοντα (εξ) που είναι παρόντες και ρυθμίζουν την μεταναστευτική συμπεριφορά του κάθε όγκου. Επίσης, ο σχηματισμός του συμπλέγματος της συνδεκάνης-4 με τον FGF-2/FGFR-1 προάγει προ-αγγειογενετικά γεγονότα σηματοδότησης μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης Ca (PKCa) (Mundhenke et al 2002). Έχει παρατηρηθεί ότι η διαταραχή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της συνδεκάνης-4 και της ινονεκτίνης που προκαλείται από την εξωκυτταρική τενασίνη-C μειώνει τις εστιακές συνδέσεις στα κύτταρα του όγκου, γεγονός που οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των

καρκινικών κυττάρων (Huang et al 2001). Έτσι, η ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης μέσω της συνδεκάνης-4 είναι κρίσιμη για τον έλεγχο τόσο της μετανάστευσης όσο και του πολλαπλασιασμού ορισμένων τύπων όγκων.

## **1.4 ΠΑΡΑΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΟΡΜΟΝΗ (PTH)**

### **1.4.1 Γενικά**

Η ανθρώπινη PTH είναι ένα πεπτίδιο 84-αμινοξέων που παίζει κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του ασβεστίου στα θηλαστικά (Rosen et al 2001). Το επίπεδο του εξωκυττάρου ασβεστίου οδηγεί σε αύξηση της έκκρισης PTH ως απάντηση στη μείωση της συγκέντρωσης του ασβεστίου μέσω των ευαίσθητων στο ασβέστιο υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης του παραθυρεοειδούς αδένου. Η PTH δρά άμεσα στην επαναρρόφηση ασβεστίου από τα νεφρικά σωληνάρια και έμμεσα ενισχύει την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου μέσω της 1-α υδροξυλιωμένης χοληκαλσιφερόλης (αυξάνοντας έτσι την κυκλοφορία της καλσιτριόλης). Ο φυσιολογικός ρόλος της PTH στη ομοιόσταση του σκελετού, όταν εκκρίνεται ενδογενώς, είναι πιο πολύπλοκος, αλλά μάλλον χρησιμεύει για τη ρύθμιση της ανακατασκευής (remodeling) των οστών και όχι τόσο για τη συνολική σκελετική μάζα.

Από πρώιμες μελέτες σχετικά με τη δομή και τη λειτουργία της PTH, έγινε γενικά αποδεκτό ότι το σύνολο της βιολογικής δραστηριότητας του ολικού μορίου της PTH (hPTH 1-84) ωφείλεται στην N-terminal αλληλουχία του. Περισσότερες κλινικές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει το πεπτίδιο των 34-αμινοξέων hPTH (1-34), που ονομάζεται τεριπαρατίδη. Τα πρώτα δύο αμινοξέα είναι απαραίτητα για τη βιολογική δραστηριότητα της ορμόνης, και φαίνεται ότι οι αναβολικές ιδιότητές της

επί του οστού διατηρούνται πλήρως από το βραχυσμένο τμήμα της hPTH (1-31). Μολονότι η ολική PTH των 84-αμινοξέων είναι το φυσικό προϊόν της γονιδιακής μεταγραφής και μετάφρασης του γονιδίου της PTH, η μεγάλη πλειοψηφία της ανοσοαντίδρασης της PTH που ανιχνεύεται στην αιματική κυκλοφορία αποτελείται από καρβοξύλιο (C)-τελικά τμήματα της ορμόνης. Αυτά τα τμήματα εκκρίνονται από τα κύτταρα του παραθυρεοειδούς αδένου και προκύπτουν με ενδοκυττάρια διάσπαση της PTH η οποία ενισχύεται από τα αυξημένα επίπεδα εξωκυττάρου ασβέστιου στον ορό (Watson et al 1993). Τα θραύσματα αυτά μπορούν επίσης να προκύψουν από διάσπαση της ολικής PTH από τους περιφερικούς ιστούς στόχους (Segre et al 1976). Τα N-terminal τμήματα που είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα της PTH δεν υπάρχουν στην κυκλοφορία υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η μόνη γνωστή μορφή που κυκλοφορεί με βιολογική δραστηριότητα στον υποδοχέα PTH / PTHrP είναι η πλήρης PTH (1-84).

Είναι πιθανό ότι τα C-τελικά θραύσματα της PTH μπορεί να έχουν διακριτές βιολογικές ιδιότητες. Τόσο in vitro όσο και in vivo μελέτες έδειξαν ότι το C-terminal τμήμα της PTH μπορεί να έχει σημαντικές βιολογικές επιδράσεις στα οστά. Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν την πιθανή ύπαρξη ενός ξεχωριστού υποδοχέα για τα C-τελικά θραύσματα της PTH. Έχει δειχθεί (Divieti et al 2001) ότι τα C-PTH θραύσματα μπορεί να ενισχύουν την απόπτωση των οστεοκυττάρων. Επίσης, προηγούμενες μελέτες κυτταρικής καλλιέργειας οστεοβλαστών έχουν δείξει ότι τα C-τελικά θραύσματα που περιέχουν τουλάχιστον τα τελευταία 30 ή περισσότερα αμινοξέα της PTH είναι ικανά να διεγείρουν την παραγωγή αλκαλικής φωσφατάσης αλλά και άλλους δείκτες της δραστηριότητας των οστεοβλαστών (Sutherland et al 1994). Συνεπώς, είναι εύλογο ότι η ολική PTH, όταν χρησιμοποιείται ως θεραπεία για την



οστεοπόρωση, μπορεί να έχει ελαφρώς διαφορετικές βιολογικές δράσεις σε σύγκριση με την τεριπαρατίδη.

Η PTH παρουσιάζει ισχυρή αναβολική δράση στο σκελετό όταν χορηγείται εξωγενώς με διαλείπουσα χορήγηση. Η δράση αυτή για πρώτη φορά αναφέρθηκε στον άνθρωπο από τους Reeve et al το 1980 (Reeve et al 1980). Σε αυτή τη μελέτη μια μικρή ομάδα ασθενών έλαβε τεριπαρατίδη με καθημερινές υποδόριες ενέσεις για 6-24 μήνες. Οι βιοψίες των οστών που έγιναν αποκάλυψαν σημαντικές αυξήσεις στον όγκο του δοκιδωτού λαγόνιου οστού και ενδείξεις σχηματισμού νέου οστού. Πολυάριθμες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τις βελτιώσεις στον ιστό των οστών μετά από καθημερινές ενέσεις αναλόγων της PTH (Hodsman et al 2002). Οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η PTH επιτυγχάνει το αποτέλεσμά της στην ανακατασκευή της αρχιτεκτονικής των οστών σε άτομα με σοβαρή οστεοπόρωση είναι ακόμη ασαφής. Ωστόσο, η επανεξέταση της πρόσφατης βιβλιογραφίας υποστηρίζει την παρατήρηση ότι αρχιτεκτονικές βελτιώσεις συμβαίνουν στο σκελετό μετά από καθημερινές ενέσεις PTH. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις αλλαγές στη σκελετική αρχιτεκτονική που παρατηρήθηκαν μετά τη θεραπεία με αντιαπορροφητικούς παράγοντες, που δρουν κυρίως με μείωση του οστικού μεταβολισμού και τη διατήρηση των οστών, παρά με τη βελτίωση της αρχιτεκτονικής των οστών.

#### **1.4.2 Παραθυρεοειδής ορμόνη (PTH) και Οστεοσάρκωμα**

Τρεις από τις σημαντικότερες αρχικές κλινικές μελέτες με τεριπαρατίδη (σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με σοβαρή οστεοπόρωση, σε άνδρες με οστεοπόρωση, και σε συγκριτική μελέτη με την αλενδρονάτη) (Body et al 2002, Neer et al 2001,

Orwoll et al 2003) τερματίστηκαν πρόωρα λόγω της εμφάνισης σε in vivo μελέτη οστεοσαρκώματος από την χορήγηση PTH. Σε αυτή τη μελέτη, χορηγήθηκε PTH σε αρουραίους από τη βρεφική ηλικία έως τη γήρανση (από 8 εβδομάδων έως 2 ετών) (Vahle et al 2002). Οι χορηγούμενες δόσεις ήταν περίπου 30 - 4500  $\mu\text{g} / \text{d}$  (η αντίστοιχη δόση σε έναν άνθρωπο 60 kg). Ανάπτυξη οστεοσαρκώματος βρέθηκε σε πειραματόζωα όλων των δόσεων, ακόμα και στις ομάδες που χορηγήθηκαν οι χαμηλότερες δόσεις, και εντοπίστηκε για πρώτη φορά μετά από περίπου 20 μήνες θεραπείας. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η θεραπεία με τεριπαρατίδη σε αυτές τις δόσεις προκαλεί ανωμαλίες στον οστίτη ιστό στο μοντέλο του αρουραίου, με την υπερανάπτυξη του δοκιδωτού οστού σε σημείο που ο χώρος του μυελού του οστού, τόσο στην περιοχή της μετάφυσης όσο και της διάφυσης να έχει σχεδόν πλήρως αντικατασταθεί από οστίτη ιστό (Tashjian et al 2002).

Επί του παρόντος δεν υπάρχει καμία ουσιαστική ένδειξη της κλινικής επαγωγής οστεοσαρκώματος στις κλινικές καταστάσεις υψηλής και πολύ παρατεταμένης έκκρισης παραθορμόνης (π.χ. νεφρική οστεοδυστροφία). Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί τέσσερις περιπτώσεις οστεοσαρκώματος σε ασθενείς με πρωτοπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό, αλλά η σχέση αιτίας-αιτιατού παραμένει αναπόδεικτη (Betancourt et al 2003). Στη μελέτη των Neer et al (Neer et al 2001), δεν διαπιστώθηκε ανάπτυξη οστεοσαρκωμάτων, αλλά η σπανιότητα αυτών των όγκων στον άνθρωπο κάνει την εκτίμηση του σχετικού κινδύνου αδύνατη προς το παρόν.

Λαμβάνοντας υπόψη τις μελέτες καρκινογένεσης σε ζώα, έχουν εκδοθεί ορισμένες προειδοποιήσεις για την αποφυγή της χρήσης της τεριπαρατίδης και πιθανώς και άλλων πεπτιδίων PTH σε ασθενείς οι οποίοι μπορεί να είναι σε αυξημένο κίνδυνο για οστεοσάρκωμα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν ασθενείς με νόσο του Paget, ασθενείς πριν από ακτινοβολήση, ασθενείς με ανεξήγητη αύξηση στον ορό της

ειδικής για τα οστά αλκαλική φωσφατάσης και οι έφηβοι στους οποίους δεν έχουν κλείσει ακόμη οι επιφύσεις. Εκτός των οστών και των νεφρών, πολλοί φυσιολογικοί ιστοί εκφράζουν τον υποδοχέα PTH / PTHrP, συμπεριλαμβανομένων εκείνων επιθηλιακής και ενδοθηλιακής προέλευσης. Επίσης, ο υποδοχέας έχει βρεθεί σε ορισμένους συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένου του μαστού και του εκ διαυγών κυττάρων νεφρικού καρκίνου. Το γεγονός αυτό αυξάνει τη θεωρητική πιθανότητα πρόκλησης μη οστικού καρκίνου κατά τη διάρκεια της θεραπείας με PTH. Η χρήση της παραθορμόνης σε ασθενείς με πρόσφατο ιστορικό καρκίνου δεν έχει διερευνηθεί, επειδή σε κλινικές μελέτες αποκλείονται συνήθως οι συγκεκριμένοι ασθενείς.

Στο επίπεδο της βασικής έρευνας η παραθυρεοειδής ορμόνη (PTH), το πεπτίδιο που σχετίζονται με την παραθυρεοειδή ορμόνη (PTHrP), και ο υποδοχέας (PTHrP1) έχουν ενοχοποιηθεί για την εξέλιξη και τη μετάσταση του οστεοσαρκώματος. Το PTHrP ανακαλύφθηκε ως ο χυμικός παράγοντας που σχετίζεται με την μετάσταση του όγκου και την υπερασβεστιαμία (Rodda et al 1988). Όσον αφορά τις άμεσες επιδράσεις στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος, όταν σε HOS κύτταρα οστεοσαρκώματος έγινε υπερέκφραση του PTHrP1, παρατηρήθηκε αύξηση του πολλαπλασιασμού, της κινητικότητας και της διήθησης τους μέσω Matrigel (Yang et al 2007). Πρόσφατα διαπιστώθηκε (Gagiannis et al 2009) ότι η PTHrP οδηγεί σε αυξημένη αντοχή στη χημειοθεραπευτική αγωγή του οστεοσαρκώματος μέσω της αναστολής της σηματοδότηση του p53 και της μιτοχονδριακής απόπτωσης.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η μελέτη της επίδρασης τμημάτων της παραθυρεοειδούς ορμόνης στην μετανάστευση κυτταρικών σειρών οστεοσαρκώματος ανθρώπου καθώς και ο προσδιορισμός των αλλαγών εκείνων του εξωκυτταρίου χώρου που επάγονται από αυτήν και μεταβάλλουν την μεταναστευτική ικανότητα αυτών των κυττάρων. Επίσης σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση των πιθανών εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μονοπατιών σηματοδότησης που επιδρούν στη ρύθμιση της συγκεκριμένης κυτταρικής λειτουργίας.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Υλικά

Η ανασυνδυσμένη ανθρώπινη PTH (1-34) και η υαλουρονιδάση (*Streptomyces hyalurolyticus*) αγοράστηκαν από την Sigma, ενώ η ανασυνδυσμένη ανθρώπινη PTH (7-84) αγοράστηκε από την Bachem (UK). Η εμπορική ονομασία του υψηλού μοριακού βάρους HA είναι Healon (10 mg / ml, που περιέχει επίσης χλωριούχο νατρίο 8,5 mg, όξινο φωσφορικό δινάτριο διένυδρο 0,28 mg, δισόξινο φωσφορικό νάτριο ένυδρο 0,04 mg, και νερό Pharmacia AB Sweden). Η HA δεσμευτική πρωτεΐνη (FABP) αγοράστηκε από την Seikagaku (Ιαπωνία). Τα αντίστοιχα, πρώτα και δευτερα αντισώματα (πολυκλωνικό κατσίικας αντι-ακτίνης, sc-1616, πολυκλωνικό κατσίικας αντι-HAS2, sc-34068) αγοράστηκαν από τη SantaCruz. Τα αντιδραστήρια καλλιέργειας κυττάρων ήταν από την GIBCO-Invitrogen και

Biosera (Ringer, UK). Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε, αντι-IgG διγλυκάνης (ποντικού μονοκλωνικό MAB2667) αγοράστηκε από τη Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη διγλυκάνη (2667-CM) αγοράστηκε από την R & D (Minneapolis, MN, USA).

## **2.2 Κυτταροκαλλιέργειες**

Χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος Saos 2 και MG63 χαμηλού και υψηλού μεταστατικού δυναμικού αντίστοιχα. Τα Saos 2 είναι καλά διαφοροποιημένα οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα, ενώ τα MG63 κύτταρα είναι μετρίως διαφοροποιημένα ινοβλαστοειδή τύπου κύτταρα. Τα Saos 2 και MG63 κύτταρα αναπτύχθηκαν σε DMEM (Biochrom KG) συμπληρωμένο με 10% ορό (FBS, fetal bovine serum). Πριν από τη διέγερση με τα PTH πεπτιδία, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό χωρίς ορό για 24 ώρες στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>. Η χορήγηση των πεπτιδίων PTH (1-34) και PTH (7-84) πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό είτε διακεκομμένα (κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 ωρών σε κάθε περίοδο 24 ωρών) για δύο κύκλους ή συνεχόμενα για 48 ώρες. Πριν από την χορήγηση FGF-2, αντι-FGF-2 IgG, διγλυκάνης και PTH (1-34) τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό για 24 ώρες στους 37<sup>0</sup> C και 5% CO<sub>2</sub>.

## **2.3 Απομόνωση RNA – Ποσοτικός Προσδιορισμός**

Μετά από 48 ώρες επώασης των κυττάρων με τους παράγοντες ακολούθησε απομόνωση του RNA. Αρχικά αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε στα προσκολλημένα κύτταρα 1 ml TRIZOL, το οποίο είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, που διαλυτοποιεί τα κυτταρικά συστατικά

χωρίς να επηρεάζει το RNA και διασπά τις κυτταρικές μεμβράνες ελευθερώνοντας έτσι το γενετικό υλικό. Ακολούθησε η εκχύλιση με χλωροφόρμιο και η κατακρήμνιση του RNA χρησιμοποιώντας ισοπροπανόλη. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός με αιθανόλη (75%) και τέλος επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10-20  $\mu$ l DEPC χωρίς RNase/DNase νερό. Η ποσότητα και η καθαρότητα του RNA που απομονώθηκε μετρήθηκε με φωτομέτρηση στα 260nm και 260/280nm αντίστοιχα και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι να αναλυθεί.

#### **2.4 Αντίστροφη Μεταγραφή**

1  $\mu$ g του συνολικού RNA χρησιμοποιήθηκε από κάθε δείγμα για τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) παρουσία τυχαίων εκκινητών (random hexamers) και του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση Thermoscript. Αρχικά, 1  $\mu$ g του συνολικού RNA μαζί με τους εκκινητές, τα ολιγονουκλεοτίδια (dNTPs) και το ειδικό διάλυμα αλάτων θερμαίνονται στους  $65^{\circ}\text{C}$ . Στη συνέχεια προστίθεται η Thermoscript στους  $27^{\circ}\text{C}$  για 10 λεπτά και η αντίστροφη μεταγραφή τελείται στους  $55^{\circ}\text{C}$  για 50 λεπτά. Τέλος, προστίθεται το ένζυμο RNAase H που καταστρέφει τα υπολείμματα του RNA. Το cDNA αποθηκεύτηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου(Real-TimePCR)**

Η μέθοδος της Real-Time PCR χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του mRNA των γονιδίων που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Η ανίχνευση των προϊόντων της Real- Time PCR έγινε με τη χρήση SYBR Green σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Αρχικά έγινε προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών της Real- Time PCR, όπως η συγκέντρωση

των εκκινητών και η θερμοκρασία πρόσδεσής τους στο cDNA, όπου είναι οι παρακάτω: 1x SYBR Green Master Mix, 300 nM εκκινητές (primers) και 100 ng cDNA σε τελικό όγκο 20 µl. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο Mx3000 Real Time Thermal Cycler (Stratagene) με το παρακάτω πρόγραμμα: αρχική θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C για 10 λεπτά για την αποδιάταξη των δειγμάτων και την ενεργοποίηση της πολυμεράσης, 35 κύκλοι με θέρμανση στο 95°C για 30 δευτερόλεπτα, θερμοκρασία αναδιάταξης των εκκινητών (annealing temperature) 55°C για 30 δευτερόλεπτα και πολυμερισμός (extension) των προϊόντων της PCR αντίδρασης στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα. Έπειτα, προσδιορίστηκε η καμπύλη αποδιάταξης (melting curve), όπου τα δείγματα υποβλήθηκαν σε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από τους 55°C έως τους 95°C. Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της GAPDH ή της ACTIN. Η ποσοτικοποίηση των γονιδίων στόχων πραγματοποιήθηκε με καμπύλη έκφρασης (αντίγραφα/Ct). Στη συνέχεια, τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν με βάση τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους.

## **2.6 Απομόνωση και Ανάλυση Πρωτεϊνών**

Οι πρωτεΐνες που περιέχονται στα κύτταρα απομονώθηκαν με τη χρήση ενός διαλύματος RIPA (παράγραφος 2.3.3). Πριν τη χορήγηση RIPA τα νεκρά κύτταρα απομακρύνθηκαν με μια πλύση PBS και έπειτα προστέθηκε το RIPA μαζί με αναστολείς πρωτεασών (1/200) για 5 min περίπου. Τα κύτταρα μαζεύτηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C. Η ποσότητα πρωτεΐνης που περιείχε κάθε δείγμα μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford στα 620nm

## 2.7 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών (SDS PAGE) και Ανοσοαποτύπωση κατά

### WESTERN (Western Blot)

Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 8%, το οποίο περιλαμβάνει το πήκτωμα επιστοιβάξης των πρωτεϊνών (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Το stacking gel εξασφαλίζει την ομοιόμορφη εισαγωγή των δειγμάτων στο separating gel. 25 µg συνολικής πρωτεΐνης από κάθε δείγμα αναμειχθηκε με ειδικό διάλυμα αποδιάταξης και μετά από 10 λεπτά βρασμού το μείγμα φορτώθηκε στο πήκτωμα ακρυλαμιδίου και ηλεκτροφορήθηκε στα 200 V για 1-2 ώρες (ανάλογα το μοριακό μέγεθος της υπό μελέτη πρωτεΐνης). Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη βοήθεια ειδικής συσκευής ηλεκτροφόρησης και κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (CAPs 1x, pH 11). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε για 2-3 ώρες (ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης) στα 15 V. Στη συνέχεια, οι ελεύθερες πρωτεϊνικές περιοχές της μεμβράνης δεσμεύτηκαν (blocking) μέσω επώασης της μεμβράνης με 5% (w/v) αποβουτυρωμένου γάλακτος σε PBS/Tween για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C για 16-20 ώρες. Έπειτα, ακλούθησαν πλύσεις της μεμβράνης για μισή ώρα με PBS/Tween (10 λεπτά η καθεμιά). Κατόπιν, προστέθηκε διάλυμα ειδικής αραίωσης του αντισώματος (ειδικό αντίσωμα για την κάθε πρωτεΐνη που μελετήθηκε) σε διάλυμα PBS/Tween που περιείχε 1% γάλα και επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS/Tween και στη συνέχεια η προσθήκη του αντίστοιχου δευτέρου αντισώματος σε συγκεκριμένη συγκέντρωση και επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη στη συνέχεια πλύθηκε χρησιμοποιώντας PBS/Tween όπως και προηγουμένως. Τέλος, η μεμβράνη, μετά την επώασή της για 5 λεπτά με το διάλυμα εμφάνισης ECL, εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ όπου αποτυπώθηκε η



εκπομπή χημειοφωταύγειας από τις πρωτεΐνες. Στη συνέχεια τα φιλμ εμφανίστηκαν σε ειδικό μηχάνημα της Kodak. Η πυκνότητα των ζωνών χρησιμοποιήθηκε ως ποσοτική παράμετρος και υπολογίστηκε αναλύοντας τη ψηφιακή εικόνα με το πρόγραμμα J image. Η ημιποσοτικοποίηση των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό του λόγου της πυκνότητας της ζώνης της πρωτεΐνης στόχου προς την πυκνότητα της ζώνης της β-ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

## 2.8 Ανοσοφθορισμός

$10^5$  κύτταρα στρώθηκαν σε ειδικές καλυπτρίδες ενός 24 οπών πιάτου και στο τέλος της επώασης τους, ξεκίνησε η διαδικασία του ανοσοφθορισμού αφού πρώτα απομακρύνθηκαν τα νεκρά κύτταρα με μια πλύση PBS. Ακολούθησε η μονιμοποίηση των κυττάρων για 10 min και έπειτα μια πλύση σε PBS. Η επόμενη φάση για να αυξηθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης χρησιμοποιήθηκε το ειδικό διάλυμα Triton 1% για 10 min. Μετά από μια πλύση σε PBS ακολούθησε η επώαση με τα αντισώματα, που έγινε για μια ώρα σε 1%FBS/PBS. Η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1/50 για τα πρώτα και 1/200 για τα δεύτερα αντισώματα. Τα ινίδια της ακτίνης βάφτηκαν χρησιμοποιώντας τη Phalloidin/Rhodamine, 1/200 αραιωμένη σε PBS για 40min. Μετά τις πλύσεις με PBS έγινε η χρώση των πυρήνων χρησιμοποιώντας είτε το (1/1000) TO-PRO3 είτε τη Hoetch χρώση για 10 min. Στο τέλος χρησιμοποιήθηκε το Glycerol (DACO) προκειμένου να μονιμοποιηθεί η καλυπτρίδα στο slide. Για την ανάλυση των εικόνων χρησιμοποιήθηκε είτε το confocal είτε το fluorescence μικροσκόπιο.

## 2.9 Αναστολή Έκφρασης Γονιδίων με siRNA (transfection)

Για τα πειράματα επιμόλυνσης, τα κύτταρα απλώθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό και αντιβιοτικό μέσο σε πιάτο 24 οπών για 24 h. Ειδικό siRNA για τη διγλυκάνη (siBGN), ειδικό siRNA για HAS-2 (παραλλαγή 97, 98, και 99) και RNAi αρνητικού έλεγχου (siSCR ) αγοράστηκαν από την Invitrogen (Carlsbad , CA , USA) . Για να παρέχουν τη βέλτιστη επιμόλυνση, το siRNA και η Lipofectamine 2000 (Invitrogen , Carlsbad , CA , USA) αραιώθηκαν σε Opti- MEM <sup>a</sup> IMedium (Invitrogen) . Μετά από 5 λεπτά επώασης , η αραιωμένη Lipofectamine 2000 (1 μL ανά 50 μL μέσου) αναμίχθηκε με αραιωμένο siRNA (100 pmol ανά 50 μL μέσου) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επιτραπεί ο σχηματισμός σύμπλοκου siRNA - λιποσώματος, και προστέθηκε στα ήδη στρωμένα κύτταρα. Η επιμόλυνση είχε διάρκεια 6 ωρών, μετά το διάστημα αυτό το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε με φρέσκο θρεπτικό μέσο που περιείχε αντιβιοτικά και η επώαση συνεχίστηκε για 48 ώρες. Τα κύτταρα στη συνέχεια συλλέχθηκαν και το RNA εκχυλίστηκε . Όλα τα πειράματα επιμόλυνσης επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές και εκτελέστηκαν σε τριπλέτες .

## 2.10 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν

HYAL1\_F 50 CCG GTG CTG CCC TAT GTC 30

HYAL1\_R 50 AGG CTG TGC TCC AGC TCA TC 30

HYAL2\_F 50 GGC GCA GCT GGT GTC ATC 30

HYAL2\_R 50 CCG TGT CAG GTA ATC TTT GAG GTA CT30

CD44\_F 50 GGT CCT ATA AGG ACA CCC CAA AT 30

CD44\_R 50 AAT CAA AGC CAA GGC CAA GA 30

HAS2\_F 50 GTG TTA TAC ATG TCG AGT TTA CTT CC 30

HAS2\_R 50 GTC ATA TTG TTG TCC CTT CTT CCG C 30

HAS1\_F 50 GGT GGG GAC GTG GGA TC 30

HAS1\_R 50 ATG CAG GAT ACA CAG TGG AAG TAG 30

HAS3\_F 50 GGT ACC ATC AGA AGT TCC TAG GCA GC 30

HAS3\_R 50 GAG GAG AAT GTT CCA GAT GCG 30

PTH1R\_F 50 CCT GTC CGG ACT ACA TTT ATG 30

PTH1R\_R 50 GCC CAC GGT GTA AAT CAT GC 30

GAPDH\_F 50 GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA 30

GAPDH\_R 50 GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CAC T 30

FGF2\_F GAA GAG CGA CCC TCA CAT CAA G

FGF2\_R CTG CCC AGT TCG TTT CAG TG

FGFR1\_F ACA ACC TGC CTT ATG TCC AGA TC

FGFR1\_R TGC GTC CTC AAA GGA GAC ATT

FGFR2\_F GGT CAC CAT GGC AAC CTT GT

FGFR2\_R TCT GGT TGA GAG ATT TGG TAT TTG G

FGFR3\_F GGG CAA TTC TAT TGG GTT TTC TC

FGFR3\_R GAA GCC CAC CCC GTA GCT

FGFR4\_F TCA TCA ACG GCA GCA GCT T

FGFR4\_R CAG GAC CTC CAC CTC TGA GCT A

Biglycan\_F TCT GAA GTC TGT GCC CAA

Biglycan\_R TCT GAG ATG CGC AGG TA

## 2.11 Κυτταρική Μετανάστευση

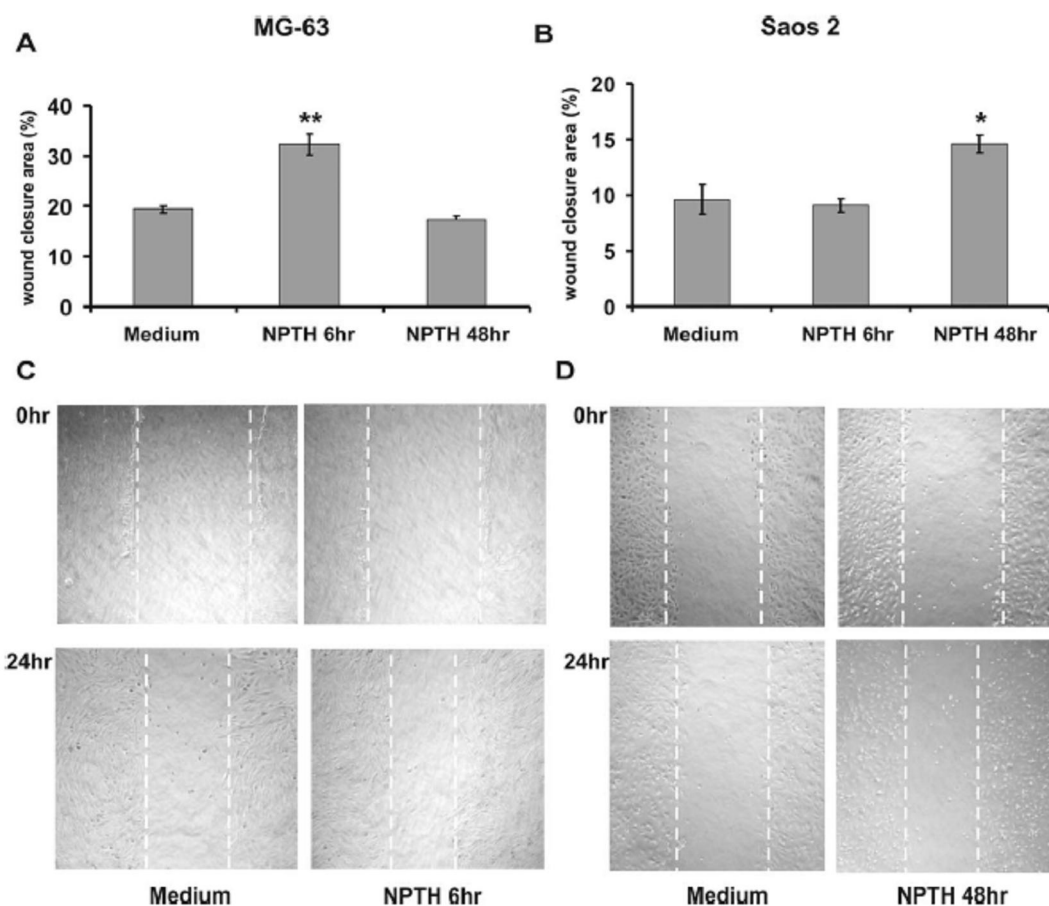
Για την εκτίμηση της κινητικότητας των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε η καθιερωμένη μέθοδος που ονομάζεται δοκιμασία επούλωσης της πληγής. MG63 κύτταρα αναπτύχθηκαν σε πιάτο 24 οπών και σε συγκέντρωση  $8 \times 10^4$  κύτταρα ανά οπή. Η βέλτιστη συγκέντρωση για καλλιέργεια επελέγη έτσι ώστε τα κύτταρα να είναι πλήρως ανεπτυγμένα στο διαθέσιμο χώρο της οπής μετά από 72 ώρες καλλιέργειας στους  $37^{\circ}\text{C}$  και 5%  $\text{CO}_2$ . Μετά από επώαση 24 ωρών χωρίς ορό, χορηγήθηκαν τα παρακάτω [ PTH (1-34), 50 nm, FGF2, 10 ng/mL ], Αντι- FGF2 IgG, 1 μg/mL, Διγλυκάνη, 5 και 10 μg/mL], είτε διακεκομμένα ( για 6 ώρες σε κάθε περίοδο 24 ωρών ) για δύο κύκλους ή συνεχόμενα για 48 ώρες. Στο τέλος της επώασης με τους παράγοντες για 48 h δημιουργήθηκε μια πληγή με ένα ρύγχος των 10μl κατά μήκος της επιφάνειας καλλιέργειας. Ακολούθησαν 2 πλύσεις με PBS προκειμένου να απομακρυνθούν τα ξεκολλημένα κύτταρα, και προστέθηκε πάλι DMEM. Η κινητικότητα, μετρήθηκε αναλύοντας την ικανότητα των κυττάρων να κλείσουν το wound με την πάροδο του χρόνου 6 ωρών και 24 ωρών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα image J και μετρήσαμε την επιφάνεια της επουλωμένης πληγής.

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **Μηχανισμοί δράσης της PTH που οδηγούν στην αύξηση της μετανάστευσης των κυττάρων του οστεοσαρκώματος**

##### **3.1 1<sup>ος</sup> Μηχανισμός: Επιδράσεις των πεπτιδίων PTH στην κυτταρική μετανάστευση του οστεοσαρκώματος, συσχέτιση με τον μεταβολισμό του ΗΑ**

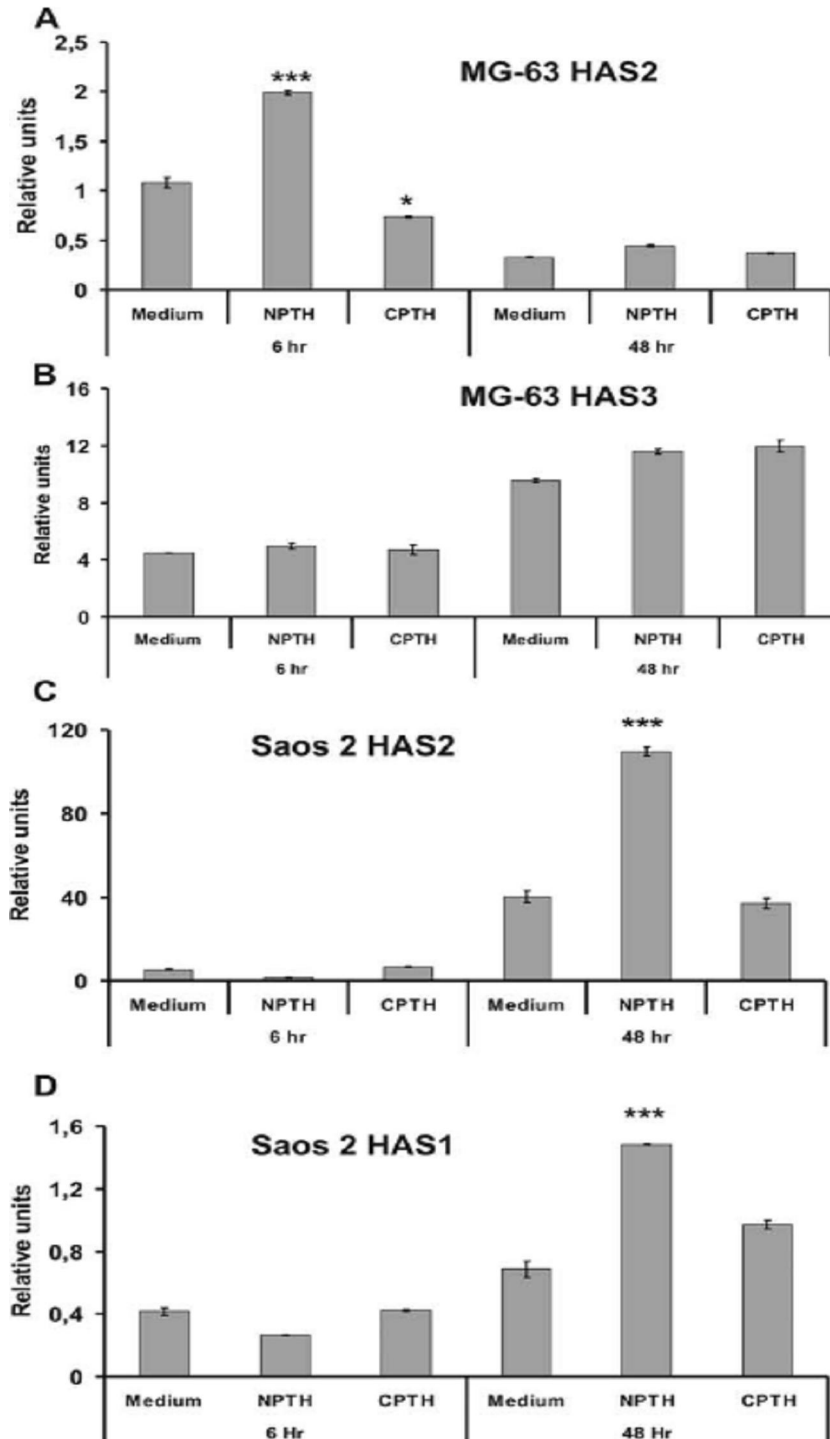
Σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος MG63 και Saos2 με διαφορετική διαφοροποίηση, που εκφράζουν υποδοχείς PTHR, χορηγήθηκε κατά διαστήματα η PTH (1-34) και η PTH (7-84) (κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 ωρών σε κάθε 24 ωρο) για δύο κύκλους ή συνεχόμενα για 48 ώρες και η κινητικότητα των κυττάρων τους προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία επούλωσης της πληγής. Η διαλείπουσα χορήγηση PTH (1-34) σε κύτταρα MG63 είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση ( $P \leq 0,01$ ) της μετανάστευσης αυτών των κυττάρων (Σχ. 2A και 2C). Σε αντίθεση, τα κύτταρα Saos 2 υπό τις ίδιες συνθήκες χορήγησης δεν παρουσίασαν μεταβολές στην ικανότητά τους να μεταναστεύσουν (Σχ. 2B και 2D), ενώ η επώαση με PTH (1-34) σε συνεχή χορήγηση κατά τη διάρκεια 48 h (Σχ. 2A και 2C) οδήγησε σε μέτρια αύξηση της μετανάστευσης των κυττάρων Saos 2 ( $P = 0,05$  Σχ. 2B και 2D). Η χορήγηση PTH (7-84) δεν επηρέασε την κινητικότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος κάτω από οποιαδήποτε τύπου χορήγησης (συνεχής ή διαλείπουσα) που χρησιμοποιήθηκαν. Μετά τις παραπάνω παρατηρήσεις, οι περαιτέρω μελέτες διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας διαλείπουσα χορήγηση για τα κύτταρα MG63 και συνεχή χορήγηση για τα κύτταρα Saos2.



Εικονα 2. Επιδράσεις των πεπτιδίων της PTH στη μετανάστευση των κυττάρων οστεοσαρκώματος. MG-63 (A) και Saos 2 (B) Σε αυτές τις κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος χορηγήθηκε PTH (1-34) (PTH) (50 ηΜ) διακοπτόμενα (κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 h σε κάθε περίοδο 24h) για δύο κύκλους ή συνεχόμενα για 48 ώρες. Ακολούθησε η μέθοδος επούλωσης πληγής όπως περιγράφεται στην παραγραφο υλικά και μέθοδοι. Στατιστική σημαντικότητα: \*  $P \leq 0.05$  \*\*  $P \leq 0.001$  σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου.

### 3.2 Επιδράσεις των πεπτιδίων PTH στην έκφραση των ισομορφών της HAS

Αμφότερες οι κυτταρικές σειρές, οι οποίες είχαν διαφορετικά επίπεδα βασικής έκφρασης HA υποβλήθηκαν σε διαλείπουσα χορήγηση PTH (1-34) και PTH (7-84) πεπτιδίων διακοπτόμενα (κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 ωρών κάθε 24 ωρου) για δύο κύκλους ή συνεχόμενα για 48 ώρες, και μετρήθηκε με Real Time-PCR η έκφραση των γονιδίων HAS1, HAS2, HAS3. Διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα MG63 εκφράζουν HAS2 και HAS3 (Σχ. 3A και 3B), ενώ τα κύτταρα Saos 2 εκφράζουν HAS1 και HAS2 (Σχ. 3C και 3D). Η διαλείπουσα χορήγηση PTH (1-34) στα κύτταρα MG63, οδήγησε σε μια έντονη διέγερση ( $P \leq 0.001$ ) της έκφρασης της HAS2 (Εικ. 3A), ενώ η διαλείπουσα χορήγηση PTH (7-84) ανέστειλε μετρίως την έκφραση αυτής της ισομορφής ( $P \leq 0,05$ ) (Εικ. 3A). Είναι ενδιαφέρον ότι, η συνεχής χορήγηση των δύο πεπτιδίων της PTH στα κύτταρα MG63 δεν επηρέασε την έκφραση καμίας από τις ισομορφές της HAS. Όσον αφορά δε τα κύτταρα Saos2, η συνεχής χορήγηση της PTH (1-34), οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης αμφοτέρων των ισομορφών HAS1 ( $P \leq 0.001$ ) και HAS2 ( $P \leq 0.001$ ) (Σχ. 3C και 3D). Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι οι HAS1 και HAS2 παράγουν υψηλού μοριακού βάρους HA, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η χορήγηση PTH (1-34) αυξάνει την περιεκτικότητα σε υψηλό μοριακό βάρος HA των υπο μελέτη κύτταρων του οστεοσαρκώματος (MG63, Saos2), ανάλογα με τον τρόπο χορήγησης της PTH (1-34).

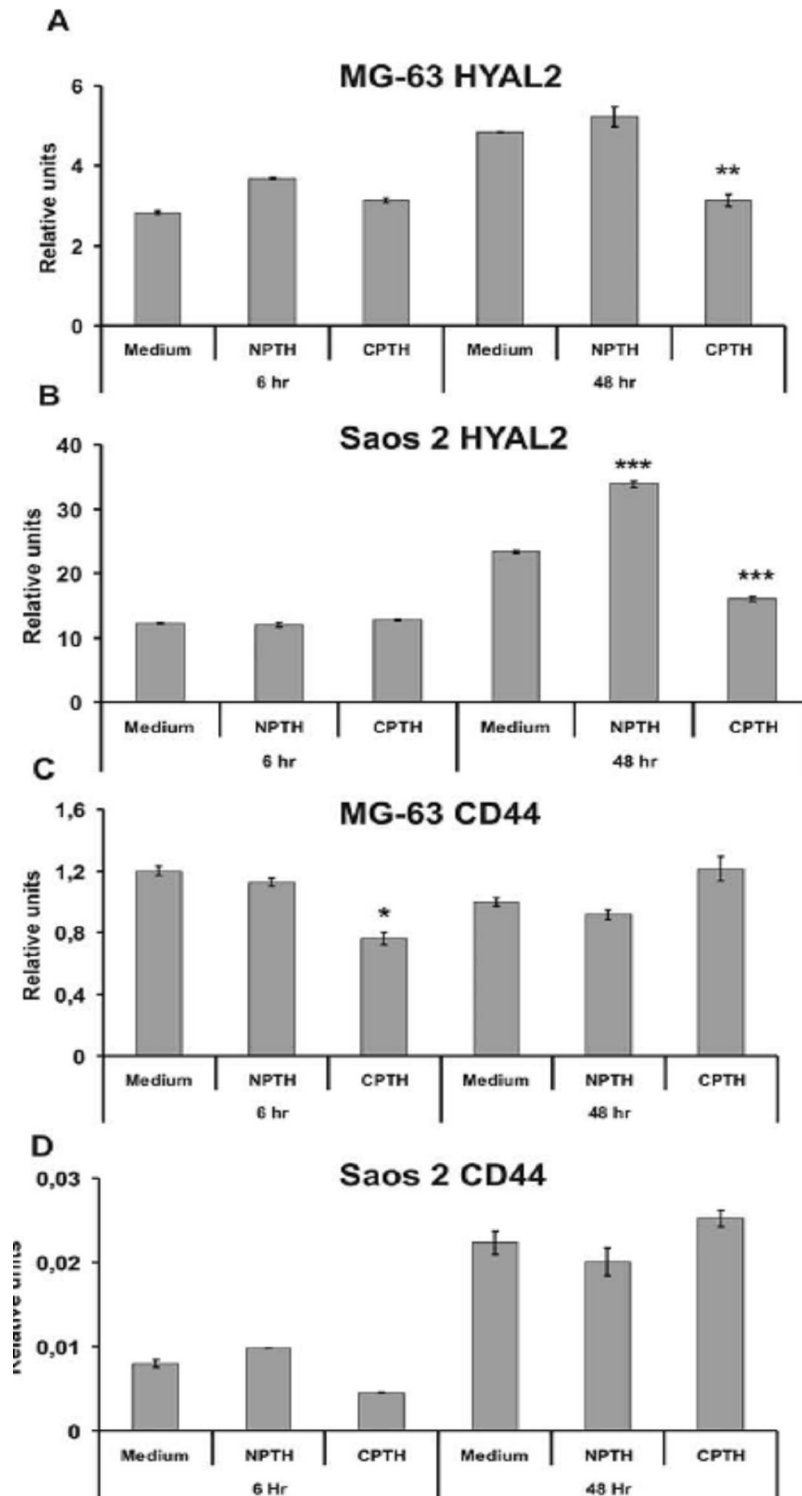


Εικονα 3. Επιδράσεις των πεπτιδίων PTH στην έκφραση των ισομορφών της HAS. Σε ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος MG-63 και Saos χορηγήθηκε PTH (1-34) (NPTH) (10 ηΜ) ή PTH (7-34) (CPTH) (10 ηΜ) διακοπτόμενα (κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 h σε κάθε περίοδο 24h) για δύο κύκλους ή συνεχόμενα για 48 ώρες, και η έκφραση των ισομορφών της HAS προσδιορίστηκε με τη χρησιμοποίηση Real Time PCR. (A) MG-63 έκφραση ισομορφής HAS2 (B) MG-63 έκφραση ισομορφής HAS3 (C) Saos 2 έκφραση ισομορφής HAS2 και (D) Saos2 έκφραση ισομορφής HAS1. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Στατιστική σημαντικότητα: \*  $P \leq 0.05$  \*\*\*  $P \leq 0.001$  σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου.



### 3.3 **Επιδράσεις των πεπτιδίων PTH στην έκφραση των ισομορφών της Hyal και CD44**

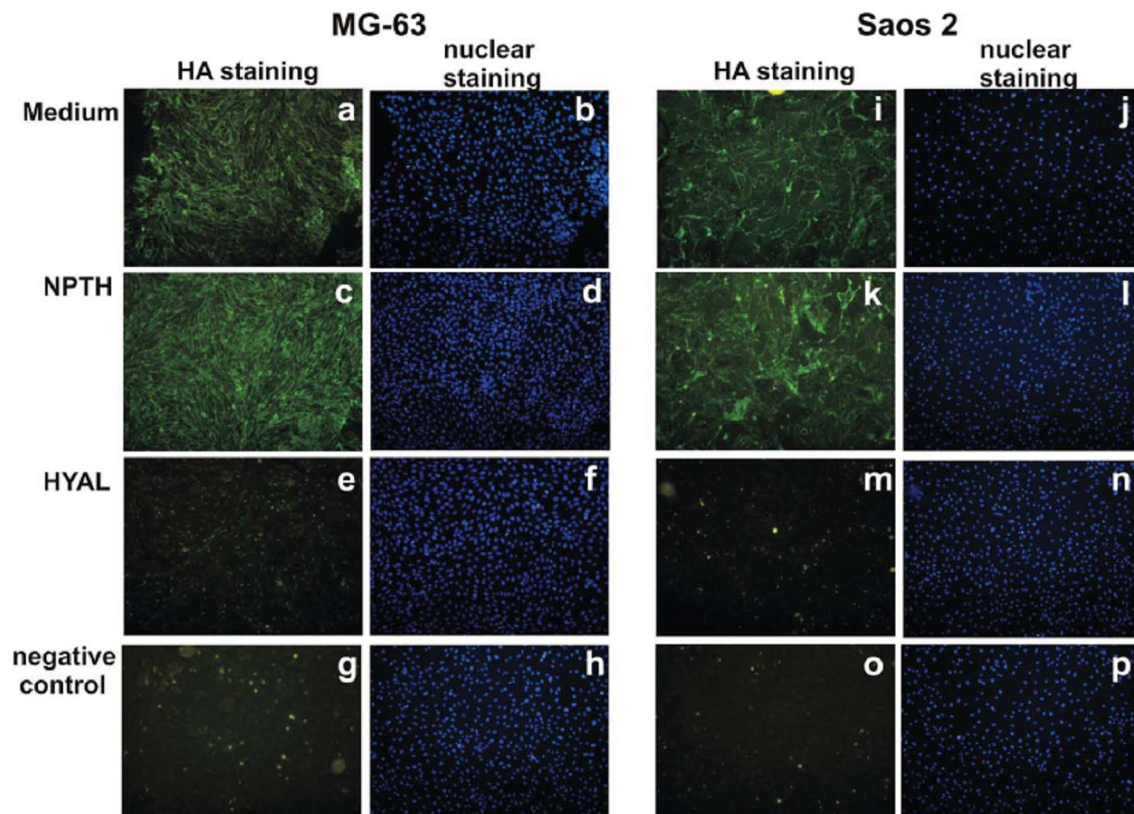
Με τη χρήση της Real Time-PCR φάνηκε ότι η ισομορφή HYAL2, αλλά όχι η HYAL1, εκφράζεται τόσο από τα κύτταρα MG63 όσο και τα Saos2. Η διαλείπουσα χορήγηση των πεπτιδίων PTH (1-34) και PTH (7-84), δεν βρέθηκε να μεταβάλλει τα επίπεδα της έκφρασης της HYAL2 (Σχ. 4A και 4B). Αντιθέτως, και οι δύο κυτταρικές σειρές MG63 και Saos2 εμφάνισαν μία στατιστικώς σημαντική μείωση της έκφρασης του mRNA της HYAL2 ( $P \leq 0,01$  και  $P \leq 0.001$ ) μετά από συνεχή χορήγηση της PTH (7-84) (Σχήματα 4A και 4B). Αντίθετα, μια σημαντική αύξηση στην έκφραση της HYAL2 ( $P \leq 0,001$ ) παρατηρήθηκε στα κύτταρα Saos2 με την συνεχή χορήγηση της PTH (1-34) ( Εικ. 4B). Η συνεχής χορήγηση τόσο της PTH (1-34) όσο και της PTH (7-84) δεν επηρέασε την έκφραση του CD44 στα κύτταρα MG63 και Saos2, (Σχ. 4D), ενώ μια μέτρια αναστολή στα επίπεδα έκφρασης του CD44 των κυττάρων MG-63 ( $P \leq 0,05$ ) διαπιστώθηκε μετά από διαλείπουσα χορήγηση της PTH (7-84).



Εικόνα 4 Επιδράσεις των PTH πεπτιδίων στην έκφραση των ισομορφών της HYLAL και του CD44. Σε ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος MG-63 και Saos χορηγήθηκε PTH (1-34) (NPTH) (10 ηΜ) ή PTH (7-34) (CPTH) (10 ηΜ) διακοπτόμενα (κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 h σε κάθε περίοδο 24h) για δύο κύκλους ή συνεχόμενα για 48 ώρες, και η έκφραση των ισομορφών της HYLAL και του CD44 προσδιορίστηκε με τη χρησιμοποίηση Real Time PCR. (A) MG-63 έκφραση ισομορφής HYLAL2 (B) Saos2 έκφραση ισομορφής HYLAL2 (C) MG63 έκφραση CD44 και (D) Saos2 έκφραση CD44. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Στατιστική σημαντικότητα: \*  $P \leq 0.05$  \*\*\*  $P \leq 0.001$  σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου.

### 3.4 Απεικόνιση του ΗΑ του εξωκυτταρίου χώρου σε κύτταρα οστεοσαρκώματος

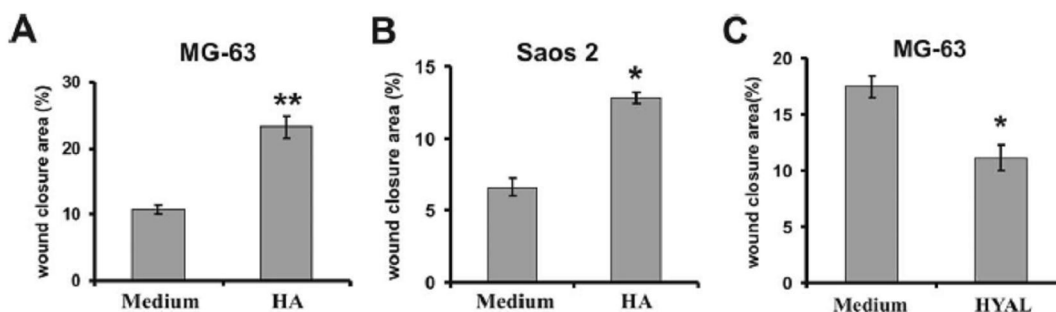
Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) που περιβάλλει τα κύτταρα MG63 βρέθηκε να έχει μία αισθητά υψηλότερη ένταση χρώσης με τη διαλείπουσα χορήγηση PTH (1-34), ενώ μόνο μια μικρή αύξηση στην ένταση της χρώσης των κυττάρων Saos2 διαπιστώθηκε με τη συνεχή χορήγηση της PTH (1-34) (Σχ 5α, ε, ι, και κ). Αυτά τα ευρήματα συσχετίζονται με τα αποτελέσματα που δείχνουν μια διακριτή μεταβολή της έκφρασης των HAS1, HAS2 και HYAL2 από τη χορήγηση PTH (1-34) σε αυτές τις κυτταρικές σειρές (Σχ. 3,4). Σε πειράματα ελέγχου, η επώαση με εξωγενή υαλουρονιδάση μειώνει τη χρώση του εξωκυτταρίου ΗΑ, η οποία ήταν ιδιαίτερα εμφανής στον περικυττάριο χώρο αυτών των κυττάρων (Σχ. 5E και 5M). Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι η PTH (1-34), ειδικά με έναν χρονοεξαρτώμενο τρόπο, διαμορφώνει την κατανομή του ΗΑ στον περικυττάριο χώρο των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.



*Εικόνα 5* Εντόπιση του HA της θεμέλιας ουσίας σε κύτταρα οστεοσαρκώματος. Κύτταρα MG-63 (A-H) και κύτταρα Saos 2 (i-p) βάφτηκαν για HA χρησιμοποιώντας βιοτινυλιωμένη HABP (πρωτεΐνη δέσμησης υαλουρονικού), καθώς και με αντίστοιχη πυρηνική χρώση (χρησιμοποιώντας Hoechst), μετά από 48 ώρες επώασης με (MG-63 a και b, Saos2 i και j) 0% ορό, (MG-63 c και d Saos2 k και l) NPTH (50 nM) διακοπτόμενα (κατά τη διάρκεια του πρώτου 6 h σε κάθε περίοδο 24-h) για δύο κύκλους για τα κύτταρα MG-63 ή συνεχώς για 48 h για τα κύτταρα Saos 2, (MG-63 e και f, Saos2 m και n) υαλουρονιδάση (*Streptomyces* υαλουρονικού) (7 μονάδες / ml) ως αρνητικό έλεγχο και (MG-63 g και h, Saos2 o και p) ως δεύτερο αρνητικό έλεγχο όπου παραλείφθηκε η επώαση με βιοτινυλιωμένο HABP. Μεγένθυση εικόνων: x20.

### 3.5 Επίδραση της εξωγενούς χορήγησης HA στην κυτταρική μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσάρκωματος

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι οι ισομορφές HAS1 και HAS2 συνθέτουν υψηλού μοριακού μεγέθους HA, εξετάσαμε την επίδραση 1<sup>ov</sup> της εξωγενούς χορήγησης υψηλού μοριακού βάρους HA (Healon MW 3–4 × 10<sup>6</sup> Da) και 2<sup>ov</sup> της χορήγησης υαλουρονιδάσης στην ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων οστεοσάρκωματος χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία επούλωσης της πληγής. Η εξωγενής χορήγηση HA βρέθηκε να προάγει σημαντικά τη μετανάστευση των κυττάρων MG63 (P <0,0354) και μετρίως των κυττάρων Saos2 (P <0,05) (Σχήματα 6A και 6B). Από την άλλη πλευρά, η θεραπεία με υαλουρονιδάση μείωσε σημαντικά την ικανότητα των κυττάρων MG63 να μεταναστεύουν (P <0,001. Εικ. 6C).

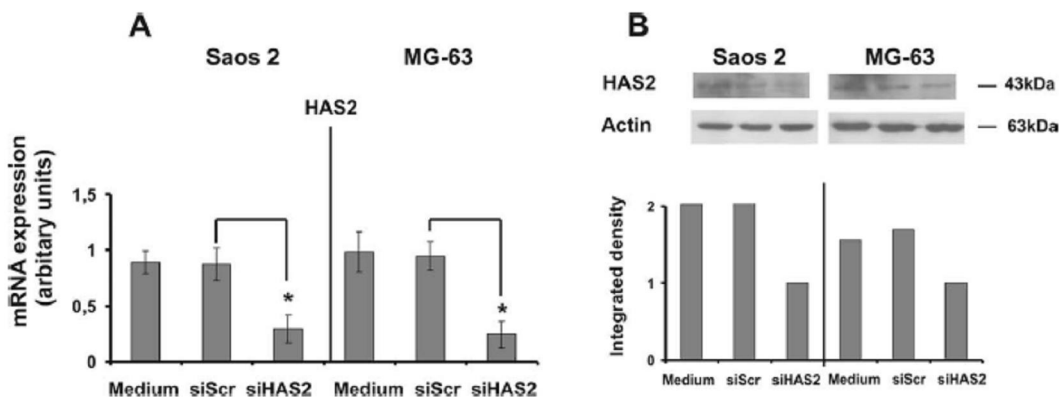


Εικόνα 6 Σε κύτταρα MG-63 χορηγήθηκε (A) HA (50 µg / mL, Healon), και (C) υαλουρονιδάση (*Streptomyces hyalurolyticus* 7 μονάδες / mL), ενώ σε κύτταρα Saos 2 χορηγήθηκε με (B) HA (50 µg / mL, Healon) για 48 ώρες. Ακολούθησε η δοκιμασία επούλωσης πληγής. Στατιστική σημαντικότητα: \* P<0.05 \*\* P≤ 0.001 σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου.

### 3.6 Επίδραση της αναστολής της έκφρασης της HAS2 με siRNA στη μετανάστευση κυττάρων οστεοσάρκωματος

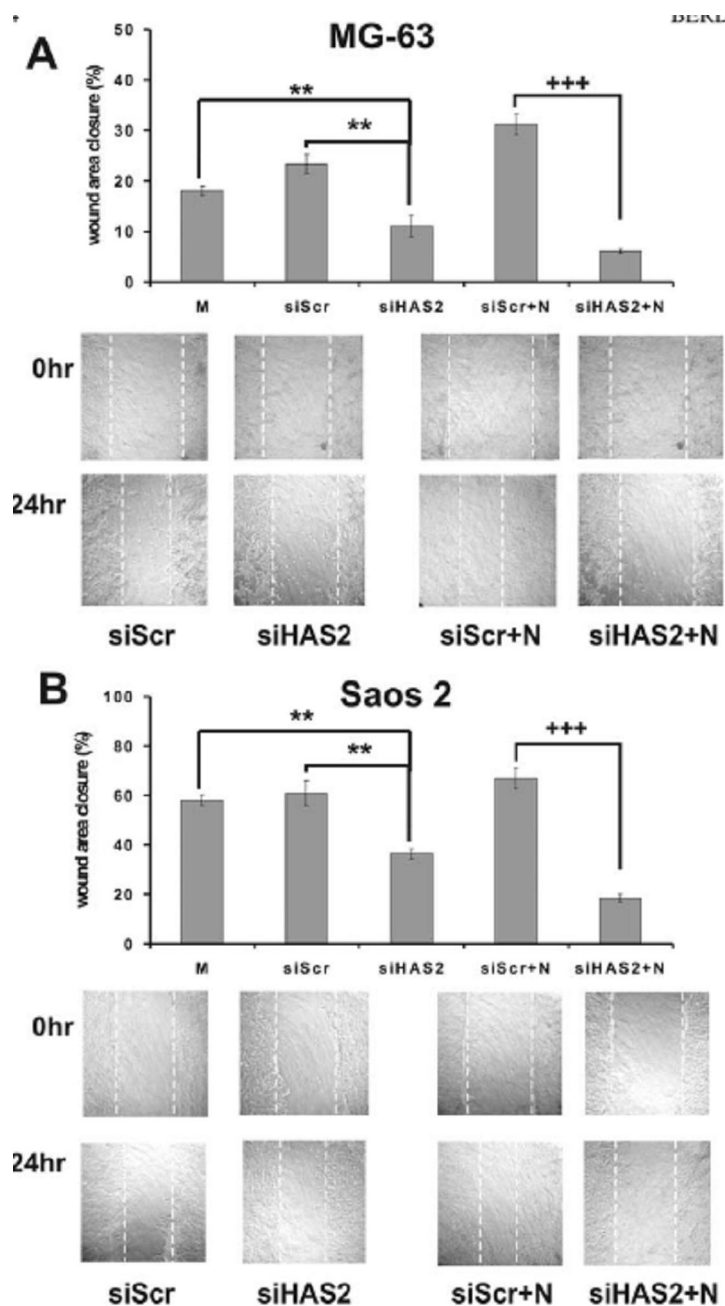
Προκειμένου να επαληθεύσουμε την υπόθεση μας, πραγματοποιήθηκε καταστολή της έκφρασης της HAS2 με την μέθοδο του siRNA. Η επιμόλυνση των

κυττάρων MG63 και Saos2 με siHAS2 οδήγησε σε σημαντική μείωση της έκφρασης του mRNA της HAS2 κατά 61% και 88% αντίστοιχα. Η μείωση δε στο επίπεδο της πρωτεϊνικής έκφρασης βρέθηκε στο 66% και 74% αντιστοίχως (Σχήματα 7A και 7B).



Εικόνα 7 Επιμόλυνση MG-63 και Saos 2 κυττάρων με HAS2 siRNA. Επίσης κύτταρα MG-63, και Saos2 επιμολύνθηκαν με scrambled RNA (siSCR) τα οποία χρησιμοποιούνται ως κύτταρα ελέγχου. (A) Η αναστολή της έκφρασης mRNA HAS2 επαληθεύθηκε με Real Time PCR σε σύγκριση με το siScr ελέγχου, 48 ώρες μετά τη επιμόλυνση. Στατιστική σημαντικότητα: \*  $P \leq 0.05$  σε σύγκριση με κύτταρα ελέγχου siScr. (B) Αναστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης HAS2 επαληθεύεται με ανάλυση Western. Πυκνομετρική ανάλυση των ζωνών πρωτεΐνης HAS2 σε σύγκριση με την ακτίνη έδειξε συμφωνία με τα αποτελέσματα της Real Time PCR.

Τα ελλειπή σε HAS2 MG63 κύτταρα (siHAS2) είχαν σημαντικά μειωμένη την ικανότητα να μεταναστεύουν ( $P \leq 0,001$ ) σε σύγκριση τόσο με τα κύτταρα αναφοράς (siScr) όσο και με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα (M) ( $P \leq 0.001$ . Εικ. 8A). Επιπλέον, όταν στα επιμολυσμένα με siHAS2 MG63 κύτταρα χορηγήθηκε διακοπτόμενα PTH (1-34), παρατηρήθηκε μια ισχυρή μείωση της ικανότητας μετανάστευσής τους σε σύγκριση με τα επιμολυσμένα κύτταρα με μη ειδικό siScr, στα οποία ομοίως χορηγήθηκε PTH (1-34) ( $P \leq 0.001$ . Εικ. 8A). Η κινητικότητα των κυττάρων Saos2 επηρεάστηκε αρνητικά με την καταστολή έκφρασης της HAS2 (Εικ. 8B), η δε συνεχής χορήγηση PTH (1-34) δεν ήταν δυνατόν να αποκαταστήσει τη μετανάστευση στο βασικό (αρχικό) επίπεδο (Σχ. 8B).



Εικόνα 8 Επίδραση της αναστολής HAS2 με siRNA στην κυτταρική μετανάστευση του οστεοσάρκωματος. (A) Η ικανότητα μετανάστευσης των MG-63 siHAS2 επιμολυσμένων κύτταρων (siHAS2) συγκρίθηκε με μη επιμολυσμένα κύτταρα (M) και επιμολυσμένα κύτταρα με μη ειδικό scrambled siRNA (siScr). Επιπλέον σε επιμολυσμένα κύτταρα χορηγήθηκε διακεκομμένα για δύο 24 - h κύκλους PTH (1-34) (siHAS2 + N) καθώς και χρησιμοποιήθηκαν scrambled siRNA με PTH κύτταρα ως μάρτυρας (siScr + N) . B : Η ικανότητα της μετανάστευσης των Saos2 siHAS2 επιμολυσμένων κύτταρων (siHAS2) συγκρίθηκε με μη επιμολυσμένα κύτταρα (M) και επιμολυσμένων κύτταρων με μη ειδικό scrambled siRNA (siScr). Σε αντίθεση με τα MG-63 , στα siHAS2 επιμολυσμένα Saos 2 κύτταρα χορηγήθηκε PTH (1-34 ) συνεχώς για 48 ώρες με (siHAS2 + N) χρησιμοποιώντας scrambled siRNA (siScr + N) ως έλεγχο. Ακολούθησε η δοκιμασία επούλωσης πληγής. Στατιστική σημαντικότητα \*\*  $P \leq 0,01$  σε σύγκριση με κύτταρα έλεγχου \*\*\*  $P \leq 0.01$  σε σύγκριση με κύτταρα έλεγχου.

### 3.7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν το ρόλο της PTH (1-34) στην κυτταρική κινητικότητα του οστεοσάρκωματος και οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η PTH (1-34) με τη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης της HAS2 μπορεί να τροποποιήσει τις δυνατότητες της μετανάστευσης των κυττάρων του οστεοσάρκωματος.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων της οστεοβλαστικής σειράς και του περιβάλλοντος ECM διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς που υπαγορεύουν την κυτταρική συμπεριφορά (Nikitovic et al 2006). Η PTH αποτελεί έναν ισχυρό οστεοτροπικό παράγοντα, ο οποίος έχει αναγνωριστεί για την σημαντική αναβολική επίδραση του στα οστά (Datta et al 2009). Με τα παραπάνω πειράματα δείξαμε για πρώτη φορά ότι οι μεταβολές στην παραγωγή HA που επάγονται από την PTH (1-34) διαμορφώνουν τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του οστεοσάρκωματος η οποία εξαρτάται από τον τρόπο χορήγησης της PTH και από τον βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων του οστεοσάρκωματος.

Έχει βρεθεί ότι η PTH (1-84) διεγείρει έντονα την παραγωγή HA, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές οστεοβλαστικής αρχής (Luben et al 1974, Midura et al 2003, Midura et al 1994). Ομοίως, έχει αναφερθεί ότι η PTH (1-34) διεγείρει τη σύνθεση HA σε κυτταρικές σειρές κρανιακών μοσχευμάτων, σε περιστατικούς οστεοβλάστες αρουραίου και σε κύτταρα που ομοιάζουν με τους οστεοβλάστες αρουραίου (Midura et al 2003, Midura et al 1994), ενώ τα αποτελέσματα της επίδρασης της PTH (7-84) στο μεταβολισμό του HA των οστεοβλαστικών κυττάρων δεν έχουν μέχρι στιγμής μελετηθεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι προηγούμενες μελέτες έχουν αναγνωρίσει μια συσχέτιση μεταξύ της επίδρασης της PTH (1-34) στο μεταβολισμό του HA των κυττάρων οστεοβλαστικής αρχής και



στο βαθμό της διαφοροποίησής τους (Midura et al 2003, Midura et al 1994). Στην παρούσα μελέτη, τα αποτελέσματα της PTH (1-34) στο μεταβολισμό του HA σχετίζονται στενά με τον τρόπο χορήγησης και το βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων του οστεοσαρκώματος, επιβεβαιώνοντας τα προηγούμενα ευρήματα. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η διαλείπουσα χορήγηση PTH (1-34) αύξησε τη σύνθεση του HA και την εναπόθεσή του στον περικυττάριο χώρο των κυττάρων MG63 με την αύξηση της έκφρασης της HAS2. Αυτή η αυξημένη περιεκτικότητα σε ενδογενές HA συσχετίζεται με μία σημαντική αύξηση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων MG63. Η εξωγενής χορήγηση HA υψηλού μοριακού βάρους σε αυτά τα κύτταρα ανέδειξε μια παρόμοια αύξηση στην κυτταρική κινητικότητα, η οποία επίσης παρατηρήθηκε σε αντίστοιχες μελέτες και από άλλους ερευνητές επιβεβαιώνοντας τα ευρήματά μας (Nishida et al 2005). Στην παρούσα μελέτη και σε συμφωνία με προηγούμενες (18), η καταστολή της έκφρασης της HAS2 με siRNA ανέστειλε την ικανότητα των κυττάρων MG63 να μεταναστεύουν. Η προσθήκη της PTH (1-34) σε κύτταρα οστεοσάρκωματος ελλιπή σε HAS2 δεν οδήγησε στην αύξηση της μετανάστευσης τους, γεγονός που υποδηλώνει ότι το παραγόμενο από τη HAS2 HA συμμετέχει στην επίδραση της PTH (1-34) στη μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος. Είναι ενδιαφέρον ότι μια *in vivo* μελέτη (Lossdorfer et al 2010) απέδειξε ότι η διαλείπουσα χορήγηση PTH (1-34) συσχετίστηκε με την είσοδο των κυττάρων οστεοβλαστικού τύπου στα βοθρία επαναρρόφησης (resorption lacunae) του οστού.

Αυτά τα πρόσφατα στοιχεία οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η PTH (1-34) μέσω ενός άγνωστου, μέχρι τώρα, μηχανισμού (-ών) μπορεί να επηρεάσει τη μετανάστευση των κυττάρων οστεοβλαστικής αρχής. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η διαλείπουσα χορήγηση PTH (1-34) του οστεοσαρκώματος διεγείρει την κυτταρική

μετανάστευση μέσω ενός HA-εξαρτώμενου μηχανισμού. Έτσι, συνολικά αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η PTH (1-34) πέραν του καθιερωμένου αναβολικού αποτελέσματος στα οστά μπορεί να ρυθμίζει επίσης την ικανότητα των κυττάρων οστεοβλαστικής αρχής να μεταναστεύουν. Επιπλέον, αυτή η ρυθμιστική επίδραση της PTH (1-34) πραγματοποιείται, τουλάχιστον εν μέρει, από τις μεταβολές που αυτή προκαλεί στο μεταβολισμό του HA. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν εξαρτώμενο από τον τρόπο χορήγησης της PTH καθώς η συνεχής χορήγηση της PTH (1-34) δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά τον μεταβολισμό του HA και τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων οστεοσαρκώματος MG63.

Τα καλώς διαφοροποιημένα κύτταρα Saos2 (Benayahu et al 1998) παρουσίασαν μία σαφώς διαφορετική απάντηση στη διαλείπουσα και συνεχή χορήγηση PTH (1-34). Το γεγονός αυτό συσχετίζεται με προηγούμενα ευρήματα που αποδεικνύουν ότι η δράση της PTH εξαρτάται από τη εντόπιση των κυττάρων καθώς και το βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων οστεοβλαστικής αρχής (Ogata et al 2000). Η διακεκομμένη χορήγηση PTH (1-34) δεν φάνηκε να επηρεάζει τα κύτταρα Saos2, όσον αφορά την έκφραση των ισομορφών HAS και Hyal και δεν είχε καμία επίδραση στην ικανότητα μετανάστευσής τους. Αντιθέτως, η συνεχής χορήγηση PTH (1-34) οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης των HAS1, 2 και της Hyal και συσχετίστηκε με ελαφρώς αυξημένη μετανάστευση των κυττάρων αυτών.

Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί αξιοσημείωτη πρόοδος στην κατανόηση της φυσιολογίας της PTH καθώς επίσης και στην αναγνώριση των ποικίλων βιολογικών ρόλων των πεπτιδίων της PTH διαφορετικού μεγέθους. Έτσι, έχει βρεθεί ότι η συσσώρευση της PTH (7-84) σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια μπορεί να επάγει την αντίσταση στην PTH οδηγώντας στην ενδοκύττωση (internalization) και τη μείωση της έκφρασης των υποδοχέων της και κατά συνέπεια, σε ανασταλτική

δράση του μονοπατιού σηματοδότησης της (Langub et al 2003). Σε αυτή τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση των δύο πεπτιδίων της PTH, δηλαδή των PTH (1-34) και PTH (7-84) στις δύο κυτταρικές σειρές ασκεί συχνά ανταγωνιστική δράση στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του HA.

Οι δράσεις τις PTH (7-84) θα μπορούσαν να εξηγηθούν ως αποτέλεσμα της σύνδεσης της στον υποδοχέα της PTH (PTH1R), που όμως δεν έχει το ίδιο τελικό αποτέλεσμα με την ενεργοποίηση του υποδοχέα από την PTH (1-34) καθώς την αναστέλλει, δρώντας ανταγωνιστικά προς αυτήν και οδηγώντας στη είσοδο του υποδοχέα μέσα στο κύτταρο (Langub et al 2003). Εναλλακτικά, έχει προταθεί η σηματοδότηση της PTH (7-84) μέσω ενός νέου υποθετικού υποδοχέα PTH με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης για το καρβοξυ-τελικό τμήμα της PTH (Divieti et al 2002) .

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα μας αποδεικνύουν για πρώτη φορά ότι τα πεπτίδια PTH (1-34) και PTH (7-84) ρυθμίζουν διακριτά την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του HA στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος και ότι αυτή η ρύθμιση εξαρτάται από τον τρόπο χορήγησης και τον βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων. Αυτή η ρύθμιση του μεταβολισμού του HA από τα διαφορετικά πεπτίδια της PTH φάνηκε να αποτελεί έναν παράγοντα που καθορίζει την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

#### **4.1 2<sup>ος</sup> Μηχανισμός: Επίδραση της PTH (1-34) στην κυτταρική μετανάστευση του οστεοσάρκωματος μέσω του άξονα FGF2-Διγλυκάνης (BGN)**

Η αναβολική δράση της PTH (1-34) έχει βρεθεί ότι εξαρτάται εν μέρει από την ικανότητά της να ρυθμίζει την έκφραση του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών

FGF2, και κατ' επέκταση του τρόπου σηματοδότησης των μονοπατιών του FGF2 (Hurley et al 1999, Hurley et al 2006). Πιο συγκεκριμένα, ο ενδογενής FGF2 είναι σημαντικός για την επίτευξη των δράσεων της PTH στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των οστεοβλαστών (Sabbieti et al 2009).

Ο FGF2 έχει βρεθεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ως ισχυρός τροποποιητής της λειτουργίας των κυττάρων των οστών (Gospodarowicz 1990, Sobue et al 2002). Στον οστίτη ιστό, τα μετάγραφα του FGF2 έχουν ανιχνευθεί σε μεσεγχυματικά κύτταρα και οστεοβλάστες. Αυτά τα κύτταρα εκκρίνουν FGF2 στον εξωκυττάριο χώρο (ECM), όπου ο συγκεκριμένος αυξητικός παράγοντας δρα ως ένας τοπικός ρυθμιστής της οστικής ανακατασκευής (Sobue et al 2002, Globus et al 1989). In vitro μελέτες έχουν αποδείξει ότι η συνεχής χορήγηση FGF2 διεγείρει τον οστικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Globus et al 1989) και μειώνει τα επίπεδα των δεικτών διαφοροποίησης, συμπεριλαμβανομένων της αλκαλικής φωσφατάσης (Shen et al 1989) και της PTH (1-34)-ανταποκρινόμενης αδενυλικής κυκλάσης (Rodan et al 1989). Σε στρωματικά κύτταρα μυελού των μακρών οστών, ο FGF2 προάγει την κυτταρική ανάπτυξη, η οποία οδηγεί σε διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και στην ασβεστοποίηση της θεμέλιας ουσίας (Pitaru et al 1993, Noff et al 1989). Επιπλέον, ο σημαντικός ρόλος της σηματοδότησης του FGF2 στην ανάπτυξη των οστών έχει αποδειχθεί χρησιμοποιώντας knockout (FGF2) ποντίκια, τα οποία βρέθηκε ότι παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη οστική μάζα και οστικό σχηματισμό. Η επίδραση του FGF2 επί της οστικής κυτταρικής μετανάστευσης δεν έχει εξεταστεί στο παρελθόν.

Έχει δειχθεί ότι ο FGF2 ενεργεί μέσω των αντίστοιχων υψηλής συγγένειας υποδοχέων κινάσης της τυροσίνης (FGFR) (Kim et al 1998, Molteni et al 2009) ρυθμίζοντας κρίσιμες βιολογικές διεργασίες κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής

ανάπτυξης, καθώς και την ομοιόσταση των ιστών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μειωμένη σηματοδότηση του FGF2 είναι επιβλαβής για τη σκελετική μορφογένεση (Mancilla et al 1998). Αν και in vivo και in vitro μελέτες έχουν αποδείξει έναν ουσιαστικό ρόλο για τον FGF2 και την PTH (1-34) στον οστικό σχηματισμό, μέχρι στιγμής δεν έχει ανευρεθεί κάποιος μηχανισμός για την συνεργιστική δράση του FGF2 και της PTH (1-34) στο μεταβολισμό των οστών καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις αυτών.

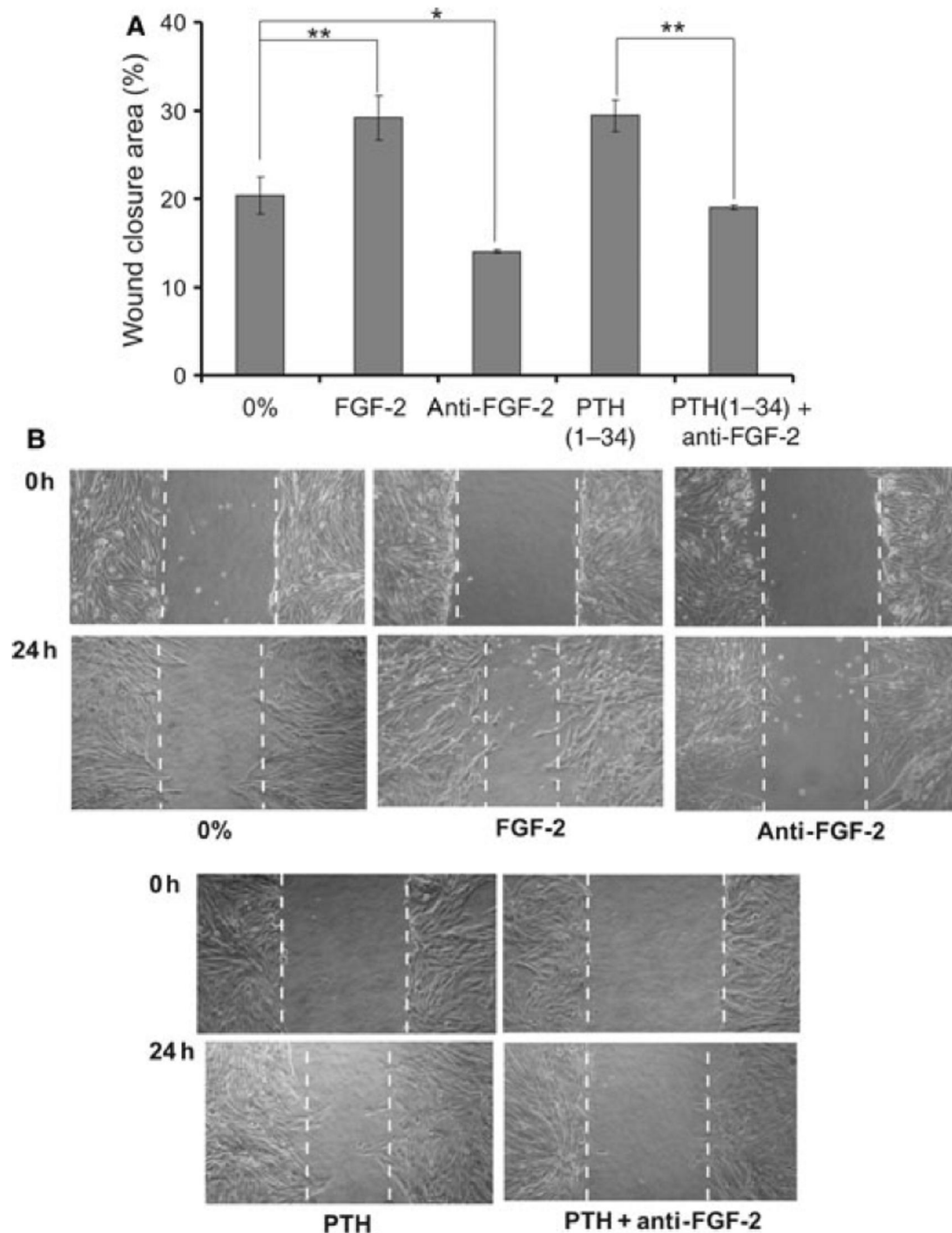
Έχοντας αναδείξει από τα προηγούμενα πειράματά μας τη σημασία της PTH στη μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος και λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω στοιχεία για τη σημασία του FGF2 στον οστίτη ιστό, θέσαμε ως επόμενο στόχο να διερευνήσουμε την πιθανή συσχέτιση της PTH με τον FGF2 στην κυτταρική μετανάστευση του οστεοσαρκώματος

#### **4.2 Επίδραση του FGF2 στη μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος, συμμετοχή της PTH (1-34)**

Ο FGF2 έχει δειχθεί προηγουμένως ότι επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων των οστεοβλαστών και τα ποσοστά απόπτωσής τους με τρόπο συνεργιστικό με την δράση της PTH (1-34) (Hurley et al 1999). Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η PTH (1-34) και η σηματοδότηση του FGF2 συνεργάζονται για τη ρύθμιση της ανάπτυξης των οστικών κυττάρων, υποθέσαμε ότι ο FGF2 θα μπορούσε επίσης να συμμετέχει στην κυτταρική μετανάστευση του οστεοσαρκώματος που εξαρτάται από την PTH (1-34).

Χρησιμοποιήθηκαν MG63 κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος με επιθετική συμπεριφορά καθώς και η δοκιμασία επούλωσης της πληγής (wound

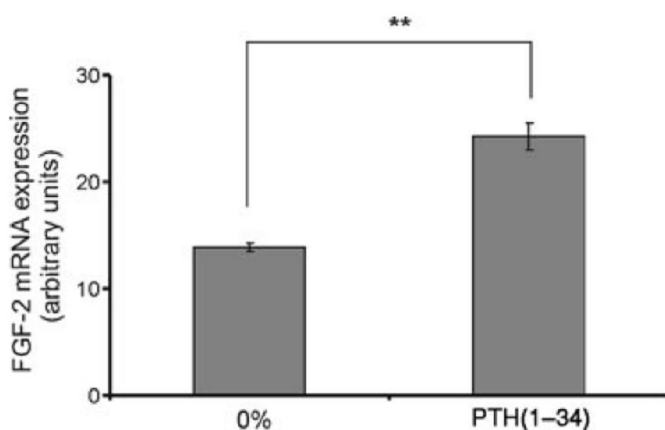
healing) για να αξιολογηθεί η πιθανή επίδραση του FGF2 στην ικανότητα των κύτταρων του οστεοσαρκώματος να μεταναστεύουν. Κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε FGF2 παρουσίασαν ισχυρή αύξηση της μετανάστευσης, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου ( $P \leq 0,01$ ) (Εικ. 9). Η εξουδετέρωση του ενδογενούς FGF2 με την προσθήκη ενός αντισώματος ειδικού για τον FGF2, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική καταστολή της μετανάστευσης των κυττάρων MG63 ( $P \leq 0,05$ ) ακόμη και κάτω από τα επίπεδα ελέγχου. Επίσης, ο συνδυασμός χορήγησης της PTH (1-34) και του αντισώματος ενάντια στον FGF2, μείωσε σημαντικά την PTH (1-34)-εξαρτώμενη κυτταρική μετανάστευση των MG63 ( $P \leq 0,01$ ), αποδεικνύοντας ότι ο FGF2 συμμετέχει στην PTH (1-34)-εξαρτώμενη κυτταρική μετανάστευση του οστεοσαρκώματος (Εικ. 9).



*Εικόνα 9* Επίδραση του FGF-2 στη μετανάστευση των κυττάρων οστεοσάρκωματος - συμμετοχή της PTH (1-34). (A) Σε MG63 κύτταρα χορηγήθηκε FGF-2 (10 ng/mL) και αντι-FGF-2 IgG (1 µg/mL) για 48 ώρες ή χορηγήθηκε PTH (1-34) (50 nM) και PTH (1-34) (50 nM) / anti-FGF-2 IgG (1 µg/mL) για τις πρώτες 6 ώρες σε κάθε περίοδο 24 ωρών για δύο κύκλους (48 ώρες). Ακολούθησε δοκιμασία επούλωσης πληγής. Κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε μέσο καλλιέργειας χωρίς ορό χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα ελέγχου. Στατιστική σημαντικότητα \*  $P \leq 0,05$  και \*\*  $P \leq 0,01$ , σε σύγκριση με κύτταρα ελέγχου 0%. (B) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες της δοκιμασίας επούλωσης της πληγής στις 0 h και 24 ώρες.

### 4.3 Επίδραση της PTH (1-34) στην έκφραση του FGF2

Η PTH (1-34) έχει προηγουμένως αποδειχθεί ότι αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα των μεταγράφων του FGF2 σε καλλιεργημένα οστεοβλαστικών κυττάρων ποντικού (Hurley et al 1999). Ως εκ τούτου, ερευνήσαμε τα αποτελέσματα της διαλείπουσας χορήγησης PTH (1-34) στην έκφραση mRNA του FGF2 σε κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος. Η Real Time PCR ανάλυση έδειξε ότι τα MG63 κύτταρα εκφράζουν FGF2 σε επίπεδο mRNA. Η 6ωρη χορήγηση PTH (1-34) σε MG63 κύτταρα οδήγησε σε σημαντική αύξηση ( $P < 0,0015$ ) της έκφρασης του FGF2 (Εικ. 10). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν μια άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ της PTH (1-34) και των σηματοδοτικών μονοπατιών του FGF2 στα κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος. Σε πειράματα ελέγχου τα MG63 κύτταρα βρέθηκαν να εκφράζουν FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 (πίνακας 2)



Εικόνα 10 Επίδραση της PTH (1-34) στην έκφραση FGF-2.

Σε MG63 ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος χορηγήθηκε PTH (1-34) (50 nM) για 6 ώρες, και προσδιορίστηκε η έκφραση του FGF-2 mRNA με real time PCR. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Στατιστική σημαντικότητα \*\*  $P \leq 0.01$  συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου 0%.

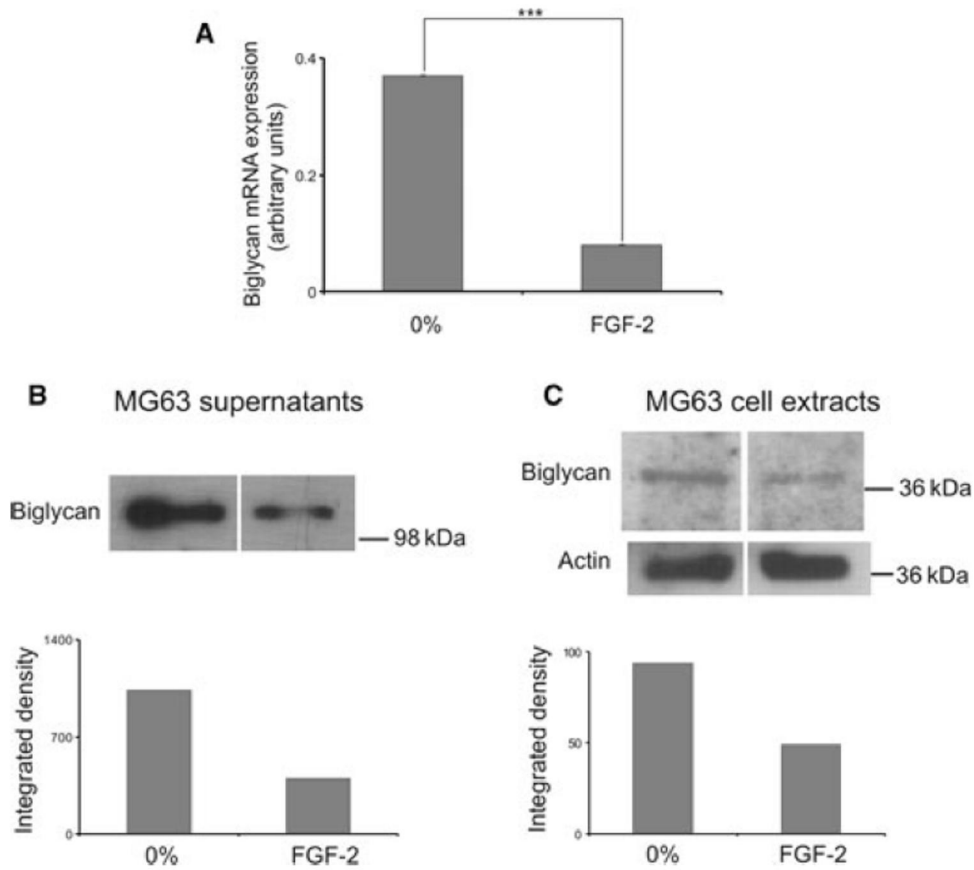


Πίνακας 2. Έκφραση των υποδοχέων του FGF στα MG63 κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος

FGFR1	+++
FGFR2	+
FGFR3	++
FGFR4	+

#### 4.4 Επίδραση του FGF2 στην έκφραση της διγλυκάνης

Η σηματοδότηση του FGF2 έχει συσχετιστεί με τις αλλαγές της σύστασης του ECM σε κύτταρα οστεοβλαστικής αρχής (Bodo et al 2002, Terplyuk et al 2009). Έτσι, προχωρήσαμε στον έλεγχο της έκφρασης mRNA διαφορετικών μορίων του ECM στα κύτταρα MG63 με την προσθήκη του FGF2. Είναι ενδιαφέρον ότι η Real Time PCR ανάλυση αποκάλυψε μία σημαντική μείωση της διγλυκάνης σε επίπεδο μεταγραφής ( $P \leq 0,0001$ ). Η διγλυκάνη είναι ένα από τα βασικά συστατικά του ECM σε κύτταρα οστεοβλαστικής αρχής και είναι ένα από τα κύρια συστατικά του ECM στον ανθρώπινο οστίτη ιστό (Waddington et al 2003) (Εικ. 11Α). Η καταστολή της έκφρασης του mRNA της διγλυκάνης οδήγησε σε έντονη μείωση της έκφρασης, τόσο της εκκρινόμενης, όσο και της ενδοκυττάριας διγλυκάνης κατά 60% και 50% αντίστοιχα. Η ύπαρξη των δύο διακριτών εντοπίσεων της διγλυκάνης (ενδοκυττάρια και περικυττάρια) συσχετίζεται καλά με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι μετά την γλυκοζυλίωση, η διγλυκάνη εκκρίνεται γρήγορα στο ECM.



Εικόνα 11 Επίδραση του FGF-2 στην έκφραση της διγλυκάνης.

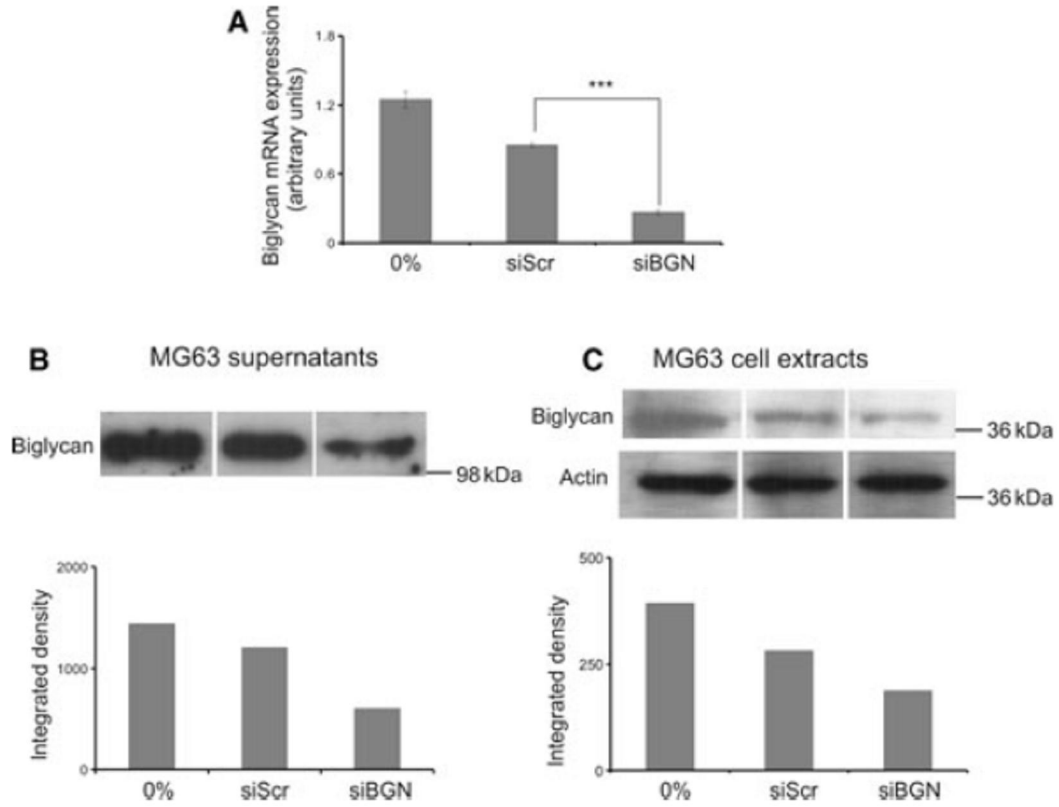
(A) Σε MG63 κύτταρα χορηγήθηκε FGF-2 (10 ng/mL) επί 48 ώρες και προσδιορίστηκε έκφραση του mRNA της διγλυκάνης με real time PCR.

(B) Από κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε FGF- 2 και από κύτταρα ελέγχου που καλλιεργήθηκαν χωρίς ορό ( 0 % ) συλλέχθηκε η υπερκείμενη πρωτεΐνη και συμπυκνώθηκε και κατοπιν χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα ενάντια στη διγλυκάνη για Western Blot.

(C) Από κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε FGF- 2 και από κύτταρα ελέγχου που καλλιεργήθηκαν χωρίς ορό ( 0 % ) συλλέχθηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα, και κατοπιν χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα ενάντια στη διγλυκάνη για Western Blot , τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Στατιστική σημαντικότητα\*\*\*  $P \leq 0,0001$  σε σύγκριση με κύτταρα ελέγχου 0 %.

#### 4.5 Μείωση των επιπέδων mRNA της Διγλυκάνης με siRNA

Λαμβάνοντας υπόψην το γεγονός ότι η διγλυκάνη έχει φανεί να ασκεί τροποποιητική δράση σε διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες των οστεοβλαστικών κυττάρων (Bi et al 2006, Inkson et al 2009), υποθέσαμε ότι ο FGF2 επηρεάζει τη μετανάστευση των κυττάρων MG63 με κάποιον εξαρτώμενο από τη διγλυκάνη τρόπο. Προκειμένου να ελεγχθεί η υπόθεσή μας, επιμολύναμε MG63 κύτταρα με siRNA ειδικά για το γονίδιο της διγλυκάνης. Κατόπιν, με τη χρήση Real Time PCR διαπιστώθηκε μια σημαντική μείωση (69%) στα επίπεδα mRNA της διγλυκάνης σε διάστημα 72 ωρών ( $P \leq 0.001$ ) (Εικ. 12A), σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου που επιμολύνθηκαν με μη ειδικό siScr. Η μείωση της μεταγραφής της διγλυκάνης ακολουθήθηκε από σημαντική καταστολή (55%) της έκκρισης της πρωτεΐνης σε 72 ώρες, όπως φαίνεται με ανάλυση Western Blot (Εικ. 12B).



Εικόνα 12 Μείωση της έκφρασης της διγλυκάνης μετά από επιμόλυνση με siRNA.

(A) Η αναστολή της έκφρασης του mRNA της διγλυκάνη επαληθεύθηκε με real time PCR, siBGN σε σχέση με siScr. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Στατιστική σημαντικότητα \*\*\*  $P \leq 0,001$  σε σύγκριση με το μάρτυρα. (B) Από θεραπευτικό μέσο προερχόμενο από siBGN επιμολυσμένα και siScr επιμολυσμένα κύτταρα πραγματοποιήθηκε Western Blot με ειδικό αντίσωμα εναντι της διγλυκάνης. (Γ) Απο κυτταρικά εκχυλίσματα των επιμολυσμένων siBGN και siScr κύτταρων πραγματοποιήθηκε Western Blot με ειδικό αντίσωμα εναντι της διγλυκάνης

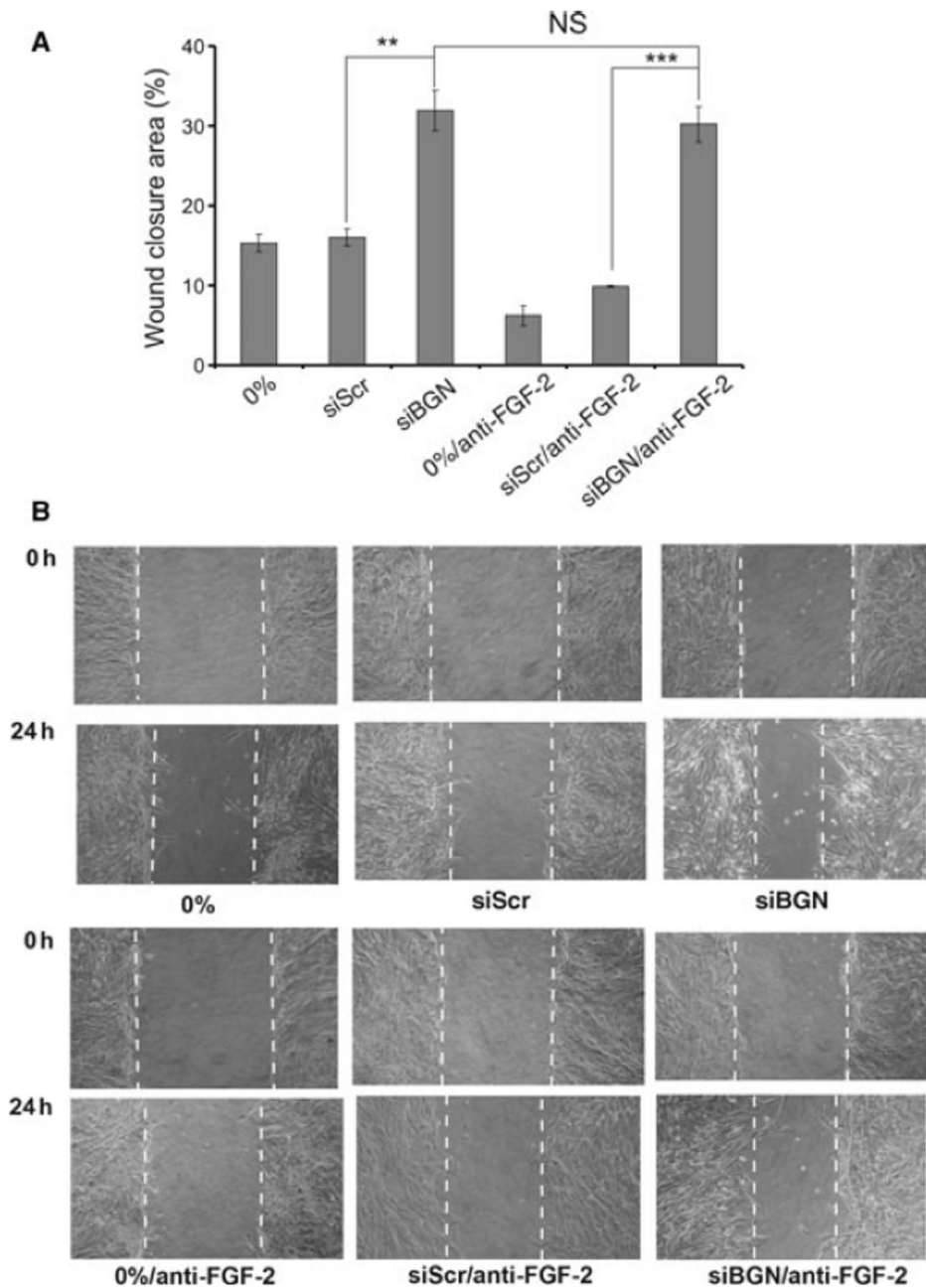
#### 4.6 Η συμμετοχή της Διγλυκάνης είναι απαραίτητη για την επαγωγή της μετανάστευσης των κυττάρων MG63 από τον FGF2

Η αναστολή της σύνθεσης της διγλυκάνης μετά την χορήγηση siBGN σε κύτταρα MG63 οδήγησε σε σημαντικά αυξημένη μετανάστευση σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες στα οποία χορηγήθηκε SiScr ( $P \leq 0,01$ ) (Εικ. 13). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε να υπάρχει διαφορά στην ικανότητα της μετανάστευσης ανάμεσα στα SiScr κύτταρα και τα μη επιμολυνθέντα (0%) κύτταρα ελέγχου (Εικ. 13). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η ενδογενώς εκκρινόμενη διγλυκάνη έχει κατασταλτική επίδραση στις μεταναστευτικές ικανότητες των MG63 κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

Προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανή συμβολή της μεταβολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MG63 στον εξαρτώμενο από τη διγλυκάνη μηχανισμό αύξησης της κυτταρικής μετανάστευσης, MG63 κύτταρα επιμολυσμένα με SiBGN και SiScr υποβλήθηκαν σε δοκιμασία πολλαπλασιασμού για 48 ώρες. Διαπιστώθηκε ότι τα MG63 κύτταρα ελλιπή σε Διγλυκάνης δεν παρουσίασαν μεταβολή στο ρυθμό ανάπτυξής τους, σε σύγκριση με κύτταρα ελέγχου SiScr ( $P = NS$ ).

Προκειμένου να συσχετιστεί η επίδραση του FGF2 στην ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων του οστεοσαρκώματος με την επαγόμενη από τον FGF2 μείωση της έκφρασης της διγλυκάνης, αξιολογήθηκε η ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων ελλιπή σε διγλυκάνη, στα οποία επιπλέον, η σηματοδότηση του FGF2 είχε μπλοκαριστεί από ένα ειδικό αντίσωμα κατά του FGF2.

Η προσθήκη του αντισώματος εναντίον του FGF2 σε κύτταρα ελλιπή σε διγλυκάνη (siBGN/αντι-FGF-2, IgG) οδήγησε σε αύξηση της μετανάστευσης των κυττάρων οστεοσαρκώματος ( $P \leq 0,001$ ), παρόμοια με αυτή που προκαλείται από την καταστολή της έκφρασης της διγλυκάνης ( $P = NS$  μεταξύ siBGN κυττάρων και siBGN/αντι-FGF-2, IgG κυττάρων) (Εικ. 13). Ταυτόχρονα, τα MG-63 κύτταρα ελλιπή σε διγλυκάνη, όταν τους χορηγήθηκε anti-FGF-2 IgG, παρουσίασαν σημαντική αύξηση της μετανάστευσής τους σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου siScr στα οποία χορηγήθηκε ο FGF2 ( $P \leq 0.001$ ). Αυτά τα ευρήματα αποδεικνύουν ότι ο FGF2 ενισχύει τη μετανάστευση των κυττάρων MG63 μέσω της διαφοροποίησης της έκφρασης της διγλυκάνης.



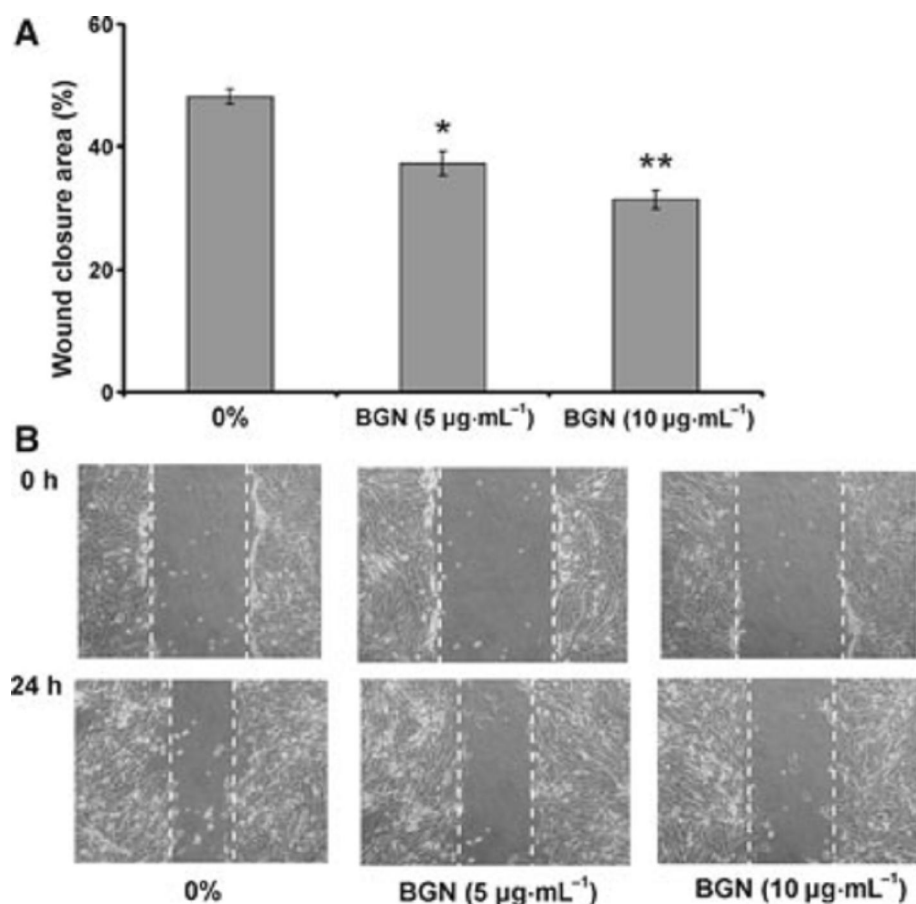
Εικόνα 13 Συμμετοχή της Διγλυκάνη στην επαγόμενη από τον FGF2 κυτταρική μετανάστευση των MG63 κυττάρων.

(A) Εβδομήντα δύο ώρες μετά την επιμόλυνση, τα siBGN επιμολυσμένα, τα siScr - επιμολυσμένα, τα siBGN - επιμολυσμένα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε αντι- FGF2 IgG και τα siScr - επιμολυσμένα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε αντι- FGF2 IgG υπεβλήθησαν στη δοκιμασία επούλωσης πληγής. Στατιστική σημαντικότητα\*\*  $P \leq 0.01$  μεταξύ siBGN και siScr επιμολυσμένων κυττάρων \*\*\*  $P \leq 0.001$  μεταξύ siBGN / αντι- FGF2 IgG και siScr / αντι- FGF-2 IgG επιμολυσμένων κυττάρων NS, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ siBGN και siBGN / αντι- FGF2 IgG επιμολυσμένων κυττάρων. (B) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από τη δοκιμασία επούλωσης πληγής στις 0h και στις 24h.

#### **4.7 Η εξωγενής χορήγηση διγλυκάνης αναστέλλει την μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος**

Για να εξεταστεί η επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης διγλυκάνης στη μετανάστευση των κυττάρων MG63, χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένη ανθρώπινη διγλυκάνη. Σε κύτταρα MG63 χορηγήθηκε για 48 ώρες ανασυνδυασμένη ανθρώπινη διγλυκάνη (5 και 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) και κατόπιν αξιολογήθηκε η ικανότητά τους να μεταναστεύσουν. Η χορήγηση εξωγενούς διγλυκάνης ανέστειλε σημαντικά τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων αυτών ( $P \leq 0,01$ ) με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, όπως φαίνεται στην εικόνα 14. Τα πειράματα αυτά επαληθεύουν το ρυθμιστικό ρόλο της διγλυκάνης στην κινητικότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

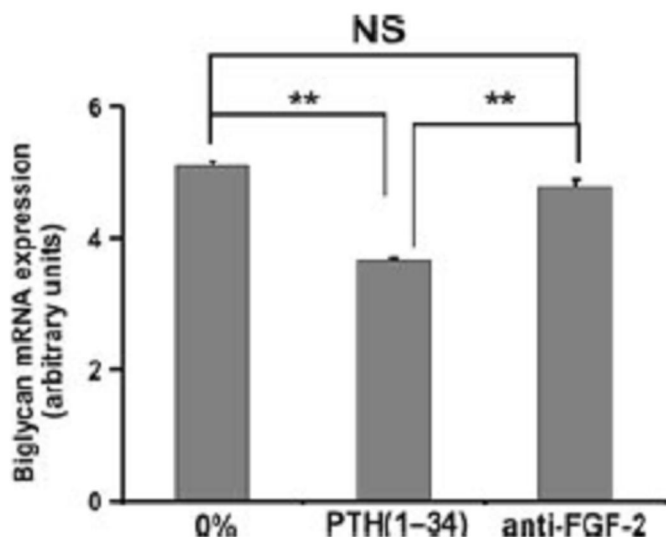




*Εικόνα 14* Επίδραση της Διγλυκάνης στη μετανάστευση των κυττάρων οστεοσαρκώματος. (A) Σε MG63 κύτταρα χορηγήθηκε συνεχώς επί 48 ώρες διγλυκάνη (BGN 5 και 10 µg/mL). Ακολούθησε η δοκιμασία επούλωσης πληγής. Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε μέσο καλλιέργειας χωρίς ορό χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα έλεγχου. Στατιστική σημαντικότητα \*  $P \leq 0,05$  και \*\*  $P \leq 0,01$ , σε σύγκριση με τα κύτταρα έλεγχου. (B) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες της δοκιμασίας επούλωσης πληγής στις 0h και στις 24h.

#### 4.8 Επίδραση της PTH (1-34) στην έκφραση της διγλυκάνης

Για να εξετασθεί η πιθανή συμμετοχή της διγλυκάνης στην μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος που εξαρτάται από τη PTH (1-34), εξετάστηκε η έκφραση της διγλυκάνης σε κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί PTH (1-34). Η Real Time PCR ανάλυση έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης mRNA της διγλυκάνης ήταν σημαντικά χαμηλότερα στα κύτταρα που χορηγήθηκε PTH (1-34) σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου ( $P \leq 0,05$ ) (Εικ. 15). Η προσθήκη αντι-FGF2, IgG κατόπιν χορήγησης PTH (1-34) αναστέλλει σημαντικά την επίδραση της PTH (1-34) στην έκφραση της διγλυκάνης ( $P \leq 0.01$ )(Εικ. 15). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η PTH (1-34) και η σηματοδότηση του FGF2 συνεργάζονται για τη ρύθμιση της μετανάστευσης των κυττάρων του οστεοσαρκώματος με τρόπο που εξαρτάται από την έκφραση της διγλυκάνης .



Εικόνα 15 Επίδραση της PTH (1-34) στην έκφραση της διγλυκάνης.

Σε MG63 κύτταρα χορηγήθηκε PTH (1-34) (50 nM) για 6 h ή PTH (1-34) για 6 ώρες και αντι-FGF IgG για 24 ώρες και κατόπιν προσδιορίστηκε η έκφραση του mRNA της διγλυκάνης σε 24 ώρες ήταν με real time PCR. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Στατιστική σημαντικότητα NS = μη σημαντικό και \*\*  $P \leq 0.01$  σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου 0% χωρίς ορό.

## 4.9 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη, δείχνουμε την ύπαρξη ενός παράλληλου μηχανισμού, εξαρτώμενου από τον άξονα PTH (1-34) / FGF2, ο οποίος ενισχύει τη μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος. Προηγούμενες *in vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι ο FGF2 ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση, διεγείροντας κατ'αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό των οστών [Hock et al 1989, Hurley et al 2006]. Από την άλλη πλευρά, η επίδραση του FGF2, στην ικανότητα μετανάστευσης των οστεοβλαστικών κυττάρων δεν έχει, μέχρι σήμερα, διερευνηθεί. Τα MG63 κύτταρα έχει αποδειχθεί ότι εκκρίνουν FGF2 και εκφράζουν τους αντίστοιχους FGFRs, παρουσιάζοντας έτσι ένα αυτοκρινή τρόπο δράσης (Bodo et al 2002). Η εξουδετέρωση του ενδογενούς FGF2 ανέστειλε σημαντικά τη μετανάστευση των MG63 κυττάρων οστεοσαρκώματος, λαμβάνοντας υπόψη ότι η εξωγενής χορήγηση FGF2 ενισχύει έντονα την κινητικότητα των κυττάρων αυτών. Έτσι επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ενός αυτοκρινούς, εξαρτώμενου από τον FGF2 βρόχου, στη ρύθμιση της MG63 κυτταρικής μετανάστευσης. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, η διαλείπουσα χορήγηση PTH (1-34) προκάλεσε ισχυρή αύξηση στη μεταγραφική δραστηριότητα του FGF2. Τα αποτελέσματα αυτά: (α) παρουσιάζουν ένα νέο μηχανισμό ρύθμισης της μετανάστευσης των κυττάρων του οστεοσαρκώματος από τον FGF2 και (β) υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός συνεργιστικού μηχανισμού μεταξύ της σηματοδότησης της PTH (1-34) και του FGF2 στην ρύθμιση της μετανάστευσης των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

Η αναβολική δράση της PTH (1-34) στο σχηματισμό του οστού είναι εν μέρει εξαρτώμενη από τις διακυμάνσεις της έκφρασης του FGF2, οι οποίες με την σειρά τους ρυθμίζουν την έκφραση και τη συσσώρευση μεταγραφικών παραγόντων στον πυρήνα, συμπεριλαμβανομένων των Runx-2 και CREBs, που είναι ζωτικής σημασίας

στη διαδικασία πολλαπλασιασμού και ωρίμανσης των οστεοβλαστών (Sabietti et al 2009). Είναι αξιοσημείωτο ότι κατόπιν διέγερσης από τον FGF2, ο Runx2 ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με σηματοδοτικά μονοπάτια που διαμεσολαβούνται από πρωτεογλυκάνες. Σ'αυτά συμπεριλαμβάνονται εκείνα που κωδικοποιούν τους FGFRs (π.χ. FGFR2 και FGFR3) και τις πρωτεογλυκάνες (π.χ. συνδεκάνη, γλυπικάνη, και βερσικάνη) και τα ένζυμα που εμπλέκονται στην σύνθεση των πρωτεογλυκανών (Terlyuk et al 2009). Επιπλέον, πρόσφατα προτάθηκε ότι ο Runx2 και ο άξονας FGF2-πρωτεογλυκάνης μπορεί να αποτελούν έναν σχετιζόμενο με την ECM ρυθμιστικό βρόχο ανάδρασης που ελέγχει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων οστεοβλαστικής αρχής και την εκτέλεση του προγράμματος οστεογένεσης (Terlyuk et al 2009). Ως εκ τούτου, υποθέσαμε ότι ο FGF2 ρυθμίζει την μετανάστευση του οστεοσαρκώματος, εν μέρει μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των πρωτεογλυκανών της ECM. Έλεγχος της έκφρασης των πρωτεογλυκανών της ECM σε MG63 κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί ο FGF2 έδειξαν μια ενδιαφέρουσα μεταβολή της μεταγραφής της διγλυκάνης. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι ο FGF2 βρέθηκε να μην επηρεάζει στα κύτταρα MG63 τα επίπεδα μεταγραφής της διγλυκάνης. Αυτά τα αντιφατικά δεδομένα θα μπορούσαν ενδεχομένως να αποδοθούν στην υψηλότερη συγκέντρωση του FGF2 που χρησιμοποιήθηκε σε αυτά τα πειράματα καθώς και στην παρουσία ορού στο μέσο καλλιέργειας (Bodo et al 2002).

Η διγλυκάνη, ένα μέλος των μικρών πλούσιων σε λευκίνη πρωτεογλυκανών (SLRP), είναι ένα βιολογικά ενεργό συστατικό της ECM (Wadhwa et al 2004) με υψηλή έκφραση στα οστά (Waddington et al 2003). Ο κρίσιμος ρόλος της διγλυκάνης στο σχηματισμό των οστών έχει δειχθεί προηγουμένως σε ποντίκια knock-out για τη διγλυκάνη. Αυτά τα ποντίκια δεν κατορθώνουν να επιτύχουν την κορυφαία οστική μάζα λόγω της μείωσης του αριθμού των οστεοβλαστών και της αναβολικής τους

δραστηριότητας (Xu et al 1998). Επιπλέον, τα φαινοτυπικά αποτελέσματα της ανεπάρκειας της διγλυκάνης συνδέονται με ανωμαλίες των ινιδίων του κολλαγόνου και έχουν συνεργιστική δράση με την ανεπάρκεια των άλλων κύριων SLRP των οστών όπως η διακοσμητίνη. Έτσι, κατ'αυτόν τον τρόπο μιμούνται το σύνδρομο Ehlers-Danlos όσον αφορά τις αλλαγές στα οστά και στους συνδετικούς ιστούς (Corsi et al 2002). Προκειμένου να ελεγχθεί η υπόθεση ότι η FGF2-εξαρτώμενη μείωση στην έκφραση της διγλυκάνης ενισχύει την κυτταρική μετανάστευση, δημιουργήθηκαν MG63 κύτταρα ελλιπή σε διγλυκάνη. Η καταστολή της έκφρασης της διγλυκάνης βρέθηκε να αυξάνει τη μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος, αποκαλύπτοντας ένα άγνωστο μέχρι τώρα ρόλο της διγλυκάνης. Επιπλέον, επιμολυσμένα με siBGN κύτταρα MG63 διατήρησαν ενισχυμένη την ικανότητά τους να μεταναστεύουν μετά την εξουδετέρωση του ενδογενούς FGF2 με χρήση ενός ειδικού αντισώματος εναντίον του FGF2, σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα.

Επιπρόσθετα σε κύτταρα οστεοσαρκώματος που χορηγήθηκε PTH (1-34) φάνηκε μειωμένη η έκφραση της διγλυκάνης. Ως εκ τούτου, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι η PTH (1-34)-ρυθμιζόμενη και FGF2-εξαρτώμενη καταστολή της έκφρασης της διγλυκάνης, είναι επαρκής για την ενίσχυση της κυτταρικής μετανάστευσης του οστεοσαρκώματος.

Η διγλυκάνη αλληλεπιδρά με μια ευρεία κλίμακα αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών όπως ο TGFβ, TGFα (Xu et al 1998), TNFα (Wegrowski et al 2000), EGF (Schaefer et Iozzo 2008), BMP4 (Kinsella et al 2004), BMP2 (Kinsella et al 1997) όπως επίσης και με τους αντίστοιχους κυτταρικούς υποδοχείς ρυθμίζοντας βασικές κυτταρικές λειτουργίες (Wegrowski et al 2000, Schaefer και Iozzo 2008). Αυτή η SLRP, σε αντίθεση με την πλειοψηφία των SLRPs, ως επί το πλείστον

διανέμεται στον περικυττάριο χώρο, όπου δρα ως ειδικός ρυθμιστής της βιοδιαθεσιμότητας των διαφόρων αυξητικών παράγοντων, και ως εκ τούτου επηρεάζει την βιολογική δραστικότητα τους (Schaefer και Iozzo 2008). Δια μέσου αυτών των αλληλεπιδράσεων, η διγλυκάνη δύναται να επηρεάζει, τόσο άμεσα όσο και έμμεσα, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τον κυτταρικό φαινότυπο (Kinsella et al 2004).

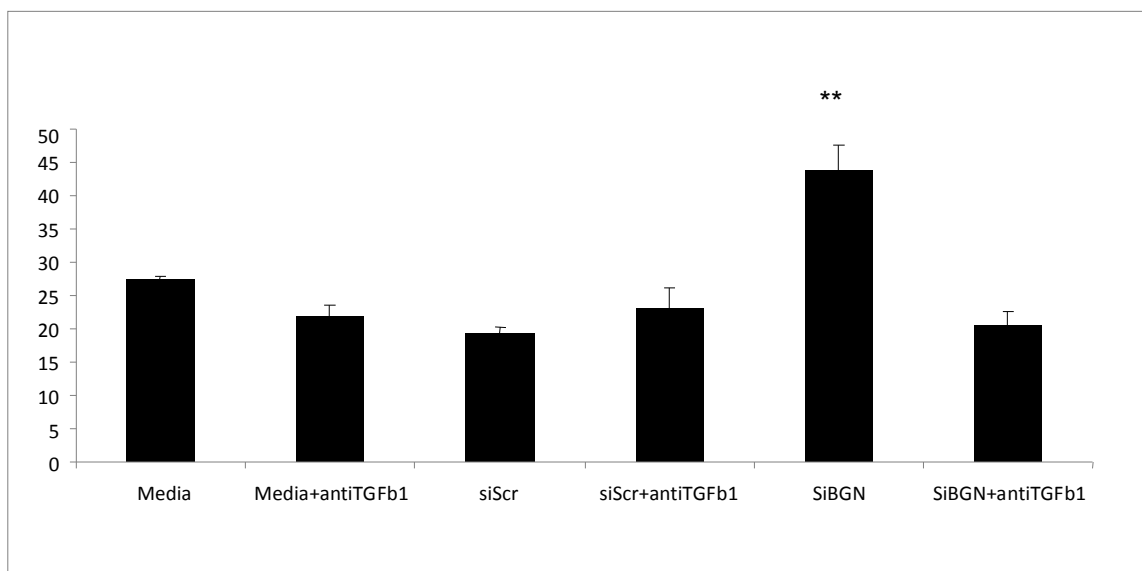
Σε αυτό το σημείο, είναι ακόμα ασαφής ο τρόπος με τον οποίον η διγλυκάνη αναστέλλει την κυτταρική μετανάστευση του οστεοσαρκώματος. Αλλαγές στην έκφραση της διγλυκάνης μπορεί να επηρεάσουν τη δομή της ECM, την κυτταρική προσκόλληση ή την αξιοποίηση αυξητικών παράγοντων που είναι ζωτικής σημασίας για τη μετανάστευση των κυττάρων (Kinsella et al 1997). Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι ο άξονας PTH (1-34)-FGF2, προκαλώντας ισχυρή καταστολή της έκφρασης της διγλυκάνης, αλλάζει δραματικά την αναλογία μεταξύ των μελών της οικογενείας των SLRPs, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η βιοδιαθεσιμότητα των αυξητικών παραγόντων που εμπλέκονται στην κυτταρική μετανάστευση του οστεοσάρκωματος. Ο ρόλος των SLRPs στη ρύθμιση της δράσης των αυξητικών παράγοντων σε κύτταρα οστεοσαρκώματος έχει προηγουμένως αποδειχθεί και για άλλες SLRPs, συμπεριλαμβανομένης της λουμικάνης (Nikitovic et al 2008) και της διακοσμητίνης (Zafiroopoulos et al 2008).

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (3)

### 5.1 Ο αυξητικός παράγοντας TGFβ και όχι ο BMP2/4 πιθανόν να συμμετέχει στη ρύθμιση της μετανάστευσης των MG63 από την διγλυκάνη.

Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία του TGFβ στα οστά καθώς και την ρυθμιστική επίδραση που έχει η διγλυκάνη σε αυτόν και προκειμένου να διαπιστωθεί η αναγκαιότητα του TGFβ για τη μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος δημιουργήθηκαν κύτταρα MG63 ελλιπή σε διγλυκάνη στα οποία προστέθηκε αντίσωμα έναντι του TGFβ. Διαπιστώθηκε ότι ενώ τα κύτταρα που ήταν ελλιπή σε διγλυκάνη παρουσίασαν αύξηση της μεταναστευτικής δραστηριότητας τους ( $P \leq 0.01$ ), τα ελλιπή σε διγλυκάνη κύτταρα στα οποία είχε επίσης προστεθεί το αντίσωμα anti-TGFβ1 δεν κατόρθωσαν να αυξήσουν την μεταναστευτική δραστηριότητά τους (Εικ 16).

Επίσης, MG63 κύτταρα μάρτυρες δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μεταβολή της μεταναστευτικής δραστηριότητάς τους όταν σε αυτά προστέθηκε το anti-TGFβ1 (Εικ 16). Από τα πειράματα αυτά γίνεται αντιληπτό ότι η παρουσία του TGFβ είναι απαραίτητη, ώστε τα ελλιπή σε διγλυκάνη κύτταρα να παρουσιάσουν την αυξημένη μεταναστευτική ικανότητά τους.

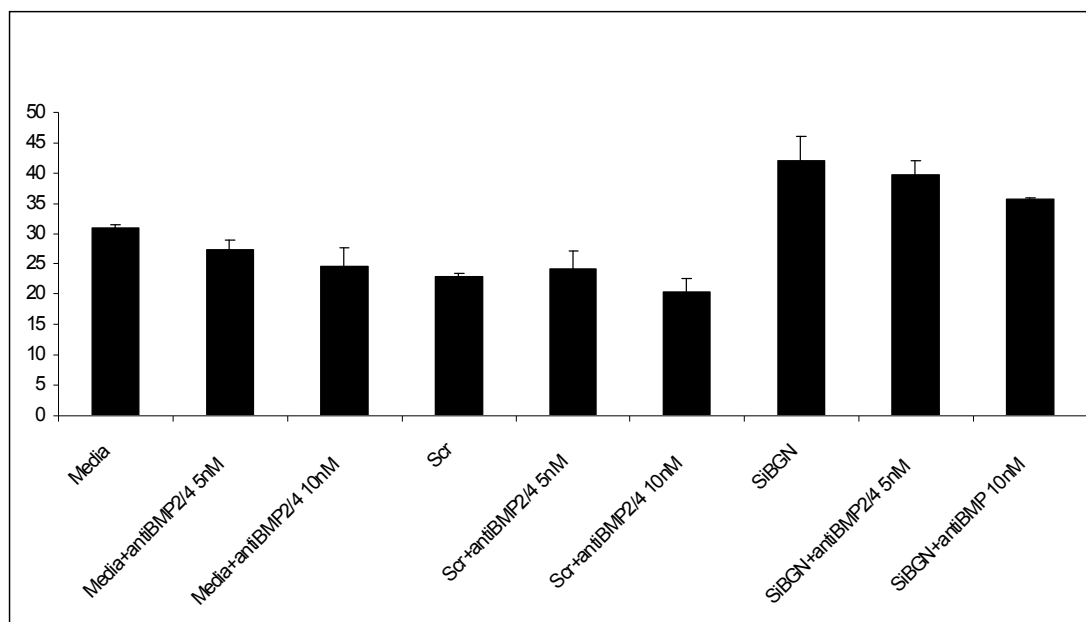


Εικόνα 16 Συμμετοχή του TGFβ στην κυτταρική μετανάστευση των ανεπαρκών σε διγλυκάνη MG63 κυττάρων. Εβδομήντα δύο ώρες μετά την επιμόλυνση, τα siBGN επιμολυσμένα, τα siScr - επιμολυσμένα, τα siBGN - επιμολυσμένα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε αντι- TGFβ1 IgG (1 μg/ml) και τα siScr - επιμολυσμένα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε αντι- TGFβ1 IgG (1 μg/ml) υπεβλήθησαν στη δοκιμασία επούλωσης πληγής και συγκρήθηκαν με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα καθώς και με τα επιμολυσμένα με siSCR. Στατιστική σημαντικότητα \*\*  $P \leq 0.01$ .

Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε με την χρήση του αντισώματος έναντι της BMP2/4 (1 μg/ml) ώστε να διαπιστωθεί εάν και κατά πόσον η αναστολή της δράσης της BMP2/4 μεταβάλλει την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων MG63 και επίσης αν η διγλυκάνη είναι απαραίτητη για την μεταβολή αυτή. Πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία επούλωσης πληγής σε κύτταρα MG63 τα οποία ήταν επιμολυσμένα με siBGN, siSCR με ή χωρίς την προσθήκη ειδικού αντισώματος έναντι του BMP2/4 σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις 5 nM και 10 nM αντίστοιχα. Διαπιστώθηκε (εικόνα 17) ότι η παρουσία του αντισώματος έναντι του BMP2/4 δεν είχε καμία επίδραση ( $P = NS$ ) στην μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων MG63



ανεξάρτητα με την επιμόλυνση τους με siRNA. Το γεγονός αυτό καταδικνύει την μη συμμετοχή του παράγοντα BMP2/4 στην μετανάστευση των κυττάρων MG63.

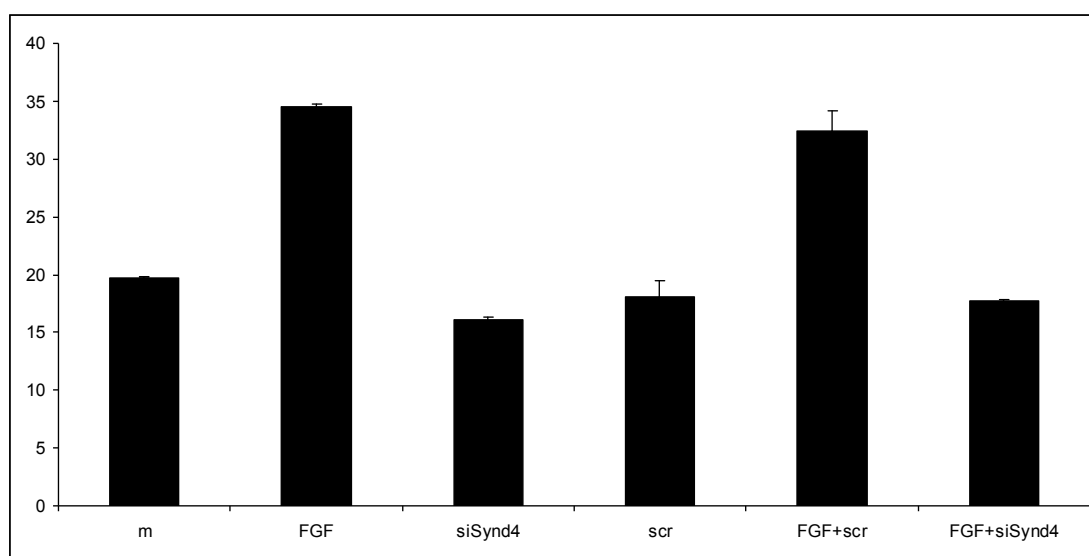


*Εικόνα 17* Η συμμετοχή της BMP2/4 στην ρύθμιση της μετανάστευσης των κυττάρων MG63 που είναι ανεπαρκή σε διγλυκάνη. Εβδομήντα δύο ώρες μετά την επιμόλυνση τα siBGN επιμολυσμένα, τα siScr - επιμολυσμένα, τα siBGN - επιμολυσμένα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε αντι- BMP2/4 IgG(1 μg/ml) και τα siScr - επιμολυσμένα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε αντι- BMP2/4 IgG(1 μg/ml) υπεβλήθησαν στη δοκιμασία επούλωσης πληγής και συγκρίθηκαν με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα καθώς και με τα επιμολυσμένα με siSCR

## 5.2 Η συνδεκάνη 4 (Syndecan 4) είναι απαραίτητη για την δράση του FGF-2 στη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων MG63

Λαμβάνοντας υπόψη την σημασία που έχει η συνδεκάνη 4 στην βιολογία διαφορετικών καρκινικών κυττάρων καθώς και την σημασία του συμπλόκου FGFR/συνδεκάνη 4 στην επίτευξη αυτού του ρόλου θελήσαμε να διαπιστώσουμε την σημασία της συνδεκάνη 4 στην μετανάστευση των κυττάρων οστεοσαρκώματος MG63. Ιδιαίτερα θελήσαμε να δούμε την επίδραση της αναστολής της έκφρασης της

συνδεκάνη 4 στην μετανάστευση των MG63 όταν σε αυτά χορηγείται FGF2 (10 ng/ml). Από το πείραμα αυτό προέκυψε ότι η αναστολή της έκφρασης της συνδεκάνης 4 με την χρήση siRNA δεν είχε κάποια επίδραση στην μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων MG63. Ωστόσο όταν σε MG63 κύτταρα τα οποία ήταν επιμολυσμένα με siSynd4 (κύτταρα ανεπαρκή σε συνδεκάνη 4) προστέθηκε FGF2 αυτά δεν παρουσίασαν την αναμενόμενη αύξηση στην ικανότητα τους να μεταναστεύουν (εικόνα 18)



Εικόνα 18 Ο ρόλος της Syndecan-4 στην δράση του FGF στην μετανάστευση των MG63κυττάρων. Σε MG63 κύτταρα μη επιμολυσμένα, επιμολυσμένα με siSCR, και επιμολυσμένα με siSynd4 χορηγήθηκε FGF-2 (10 ng/mL) για 48 ώρες. Ακολούθησε η δοκιμασία επούλωσης πληγής.

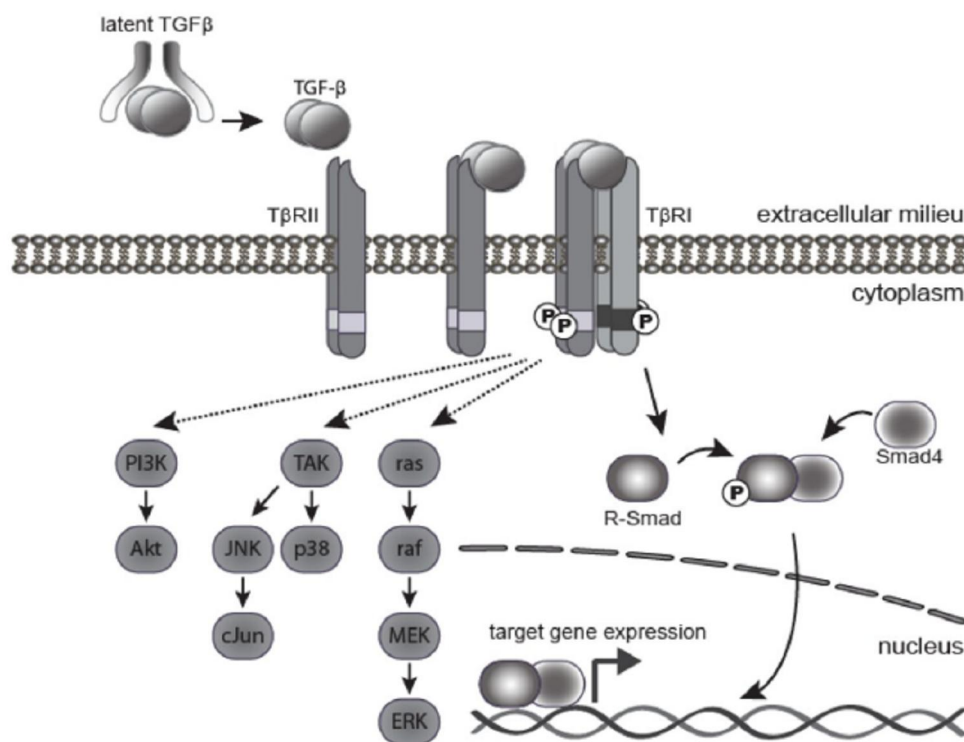
Από το παραπάνω πείραμα γίνεται σαφές πως η συνδεκάνη 4 αποτελεί ένα απαραίτητο μόριο στο μηχανισμό με τον οποίο ο FGF-2 επιτυγχάνει την αύξηση της κυτταρικής μετανάστευσης των MG63 κυττάρων.

### 5.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα μονοπάτια σηματοδότησης του αυξητικού παράγοντα του μετασχηματισμού βήτα (TGFβ) / μρφογενετικής οστικής πρωτεΐνης (BMP)

εμπλέκονται σε μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών διαδικασιών και είναι σημαντικά σε όλη την διάρκεια της ζωής των κυττάρων. Οι TGF-β/BMPs έχουν αναγνωριστεί ευρέως για το ρόλο τους στο σχηματισμό του οστού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των θηλαστικών και παράλληλα εμφανίζουν ευρύτατες ρυθμιστικές λειτουργίες στον οργανισμό (Katagiri et al 2002). Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση από TGF-β/BMPs πραγματοποιείται τόσο μέσω της κανονικής οδού μέσω Smad (TGF-β/BMP ligands, υποδοχείς και Smads) όσο και μέσω μη-κανονικών Smad-ανεξάρτητων μονοπατιών σηματοδότησης (π.χ. p38 mitogen-activated protein kinase pathway, MAPK). Οι διαταραχές της TGF-β/BMP σηματοδότησης έχουν ενοχοποιηθεί για πολλές νόσους των οστών που συμπεριλαμβάνουν την μετάσταση, τη βραχυδακτυλία τύπου A2, και την οστεοαρθρίτιδα (Siegel et al 2003, Papachroni et al 2009).

Η αυτοκρινής και παρακρινής διέγερση από TGFβ είναι σημαντική για τη διατήρηση και την διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, τα οποία είναι τα προγονικά κύτταρα των οστεοβλαστών (Derynck et al 2007). Τα οστά και ο χόνδρος περιέχουν μεγάλες ποσότητες του. Στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, οστεοβλαστικοί πληθυσμοί προερχόμενοι από εμβρυϊκό οστό είναι πιο ευαίσθητοι στη μιτογόνο επίδραση του TGFβ από παρόμοιους πληθυσμούς σε νεογέννητα (Centrella et al 1988). Επιπλέον, η σηματοδότηση μέσω TGFβ προωθεί τον πολλαπλασιασμό των οστεοπρογονικών κυττάρων, την πρόωρη διαφοροποίηση και τη δέσμευσή τους στην οστεοβλαστική προέλευση μέσω των MAPKs και Smad2 / 3 οδών, και τη συνεργασία μεταξύ των TGFβ και PTH, Wnt, BMP, καθώς και του FGF.



Εικόνα 19 Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων μονοπατιών δράσης του TGFβ

Αναγνωρίζοντας την σημασία τόσο του TGFβ όσο και των BMP2,4 στην βιολογία των οστών γενικότερα αλλά και του οστεοσαρκώματος ειδικότερα θελήσαμε να διαπιστώσουμε κατά πόσον οι παραπάνω παράγοντες είναι απαραίτητοι για την αύξηση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων MG63 όπως αυτή επιτυγχάνεται από τη δράση του FGF2. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν διαπιστώθηκε ότι σε κύτταρα που είναι ανεπαρκή σε διγλυκάνη ο TGFβ είναι απαραίτητος προκειμένου να επιτύχουν την αύξηση της μεταναστευτικής τους ικανότητας. Το γεγονός αυτό πιθανόν ερμηνεύεται από την αλληλεπίδραση που παρουσιάζει η διγλυκάνη με τα μόρια του TGFβ στον εξωκυττάριο και περικυττάριο χώρο. Είναι γνωστό ότι η διγλυκάνη προσδένει επάνω της μόρια αυξητικών παραγόντων μεταξύ των οποίων και του TGFβ και με αυτό τον τρόπο ελέγχει ως ένα βαθμό την παρουσίαση και σύνδεση αυτών των μορίων με τους κυτταρικούς

υποδοχείς στα κύτταρα στόχους. Έτσι, η απουσία διγλυκάνης στα κύτταρα οστεοσαρκώματος ενδεχομένως οδηγεί σε μεταβολές της ποσότητας του TGFβ που είναι διαθέσιμος έξω από το κύτταρο μεταβάλλοντας κατά αυτόν τον τρόπο την ικανότητα των κυττάρων αυτών να μεταναστεύουν.

Παρά την σημασία που έχουν οι παράγοντες BMP2,4 στην βιολογία του οστεοσαρκώματος καμία μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στην μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος MG63 (είτε των φυσιολογικών είτε των ανεπαρκών σε διγλυκάνη) όταν σε αυτά προστέθηκε ειδικό αντίσωμα έναντι του BMP2/4.

Τέλος αναγνωρίζοντας την σημασία της συνδεκάνης 4 στην εξέλιξη του διαφόρων όγκων και του διτού της ρόλου είτε ως μορίου που διεγείρει ή αναστέλει την εξέλιξη ενός όγκου θελήσαμε να διερευνήσουμε την σημασία της στην μεταναστευτική ικανότητα του οστεοσαρκώματος. Έχοντας υπόψη την στενή αλληλεπίδραση μεταξύ του υποδοχέα του FGF (FGFR) και της συνδεκάνη 4 δημιουργήσαμε κύτταρα οστεοσαρκώματος MG63 ελλιπή σε συνδεκάνη 4 και εξετάσαμε την ικανότητα τους να μεταναστεύουν παρουσία και απουσία FGF. Από πειραματικές μελέτες του εργαστηρίου μας και σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές (Chalkiadaki et al 2009) διαπιστώθηκε ότι η παρουσία της συνδεκάνης 4 είναι απαραίτητη προκειμένου ο FGF2 να επιτύχει την αύξηση της μετανάστευσης των κυττάρων MG63.

## 6. Συμπεράσματα

Η δράση της παραθορμόνης (PTH) και του ενεργού πεπτιδίου της (PTH 1-34) στη βιολογία των οστών και συγκεκριμένα στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης είναι από καιρό γνωστή. Η PTH παρουσιάζει ισχυρή αναβολική δράση στο σκελετό όταν χορηγείται εξωγενώς με διαλείπουσα χορήγηση, ενώ εμφανίζει καταβολική δράση μετά από συνεχή χορήγηση. Από τις πρώτες κιάλας μελέτες της PTH σε πειραματόζωα, διαπιστώθηκε ότι αυτά εμφάνισαν σε υψηλά ποσοστά οστεοσάρκωμα. Το εύρημα αυτό δεν επιβεβαιώθηκε στους ανθρώπους αλλά παρόλα αυτά υπάρχει η σύσταση για αποφυγή της χρήσης της PTH σε ανθρώπους που έχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης οποιοδήποτε όγκου. Μέχρι σήμερα δεν είχε μελετηθεί η πιθανή επίδραση της PTH σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος ως προς τον τρόπο που αυτή μεταβάλλει την ικανότητα των κυττάρων αυτών για μετανάστευση.

Από τα πειράματα που διενεργήθηκαν προέκυψε ένας πιθανός μηχανισμός διαμέσου του οποίου η PTH αυξάνει την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος MG63. Διαπιστώθηκε ότι η Παραθορμόνη (PTH) διεγείρει έντονα τη σύνθεση και έκκριση υαλουρονικού (HA) τόσο σε μη επιθετικές όσο και σε επιθετικές κυτταρικές σειρές οστεοβλαστικής αρχής. Το HA, ως μια γλυκοζαμινογλυκάνη συστατικό του εξωκυτταρικού χώρου (ECM), είναι ικανό να συμβάλει στη μετάδοση παραγόμενων από την ECM σημάτων, τα οποία ρυθμίζουν την κυτταρική λειτουργία. Σε αυτή τη μελέτη, διερευνήσαμε τις αλλαγές στο μεταβολισμό του HA, όπως αυτές επάγονται από τη δράση της PTH (1-34) και της PTH (7-84) σε μέτριες (MG63) και καλά διαφοροποιημένες (SaOS2) κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος σε συνάρτηση με τη δυνατότητά τους για μετανάστευση.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η διαλείπουσα χορήγηση PTH (1-34) οδηγεί στα παρακάτω:

1. σημαντική ( $P \leq 0,01$ ) αύξηση της μετανάστευσης των κυττάρων MG63,
2. αύξηση της έκφρασης της συνθάσης-2 του HA (HAS2) ( $P \leq 0,001$ ), και
3. ενίσχυση της εναπόθεσης του υψηλού μοριακού βάρους HA στον περικυττάριο χώρο

Τόσο η αύξηση της ενδογενούς παραγωγής HA ( $P \leq 0,01$ ) όσο και η εξωγενής χορήγηση υψηλού μοριακού βάρους HA ( $P \leq 0,05$ ) συσχετίζονται σημαντικά με την αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων MG63. Η επιμόλυνση με siHAS2 έδειξε ότι η PTH (1-34), κυρίως μέσω της επίδρασής της στην έκφραση της HAS2, οδήγησε σε ενισχυμένη παραγωγή του HA και ταυτόχρονα σε αυξημένη κυτταρική μετανάστευση των MG63. Είναι ενδιαφέρον ότι η συνεχής χορήγηση PTH (1-34) οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης της HAS2 ( $P \leq 0,001$ ) και της HAS1 ( $P \leq 0,001$ ) στα κύτταρα Saos 2 και ταυτόχρονα σε μείωση της έκφρασης της HYAL2 ( $P \leq 0,001$ ) οδηγώντας έτσι, σε μια μέτρια ( $P \leq 0,05$ ) αύξηση της μετανάστευσής τους. Ως εκ τούτου, η PTH (1-34) βρέθηκε ότι αναλόγως του τρόπου χορήγησής της φαίνεται να ρυθμίζει σαφώς τη μεταναστευτική ικανότητα των κυτταρικών σειρών οστεοσαρκώματος MG63 και Saos 2. Συμπερασματικά, από τα δεδομένα που προέκυψαν από τα πειράματα αυτά, προκύπτει ένας πιθανός ρυθμιστικός ρόλος της PTH στο μεταβολισμό του HA των κυττάρων του οστεοσαρκώματος, ανάλογα με τον τρόπο χορήγησής της. Η αλλαγή του μεταβολισμού του HA από την PTH οδηγεί με την σειρά της στη μεταβολή της ικανότητας μετανάστευσης των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

Είναι βιβλιογραφικά γνωστό ότι ένα σημαντικό μέρος της αναβολικής δράσης της PTH (1-34) ασκείται διαμέσου της επίδρασής της στην έκφραση του αυξητικού

παράγοντα των ινοβλαστών (FGF2). Επιπλέον, πρόσφατα έχει προταθεί η ύπαρξη και η δράση ενός άξονα FGF-πρωτεογλυκάνων που μπορεί να σχηματίσει έναν βρόγχο ανάδρασης (feedback loop) ο οποίος σχετίζεται με τον εξωκυττάριο χώρο και ελέγχει τον πολλαπλασιασμό και την εκτέλεση του προγράμματος οστεογένεσης κυττάρων οστεοβλαστικής αρχής. Κατόπιν τούτου και γνωρίζοντας ήδη από τα πειράματα μας τη σημασία της PTH στη ρύθμιση του μεταβολισμού του υαλουρονικού σε κύτταρα οστεοσαρκώματος, διερευνήσαμε τη πιθανή συμμετοχή του μονοπατιού σηματοδότησης του FGF2 στην PTH (1-34)-εξαρτώμενη κυτταρική μετανάστευση του οστεοσαρκώματος. Έτσι, πραγματοποιήθηκε η χορήγηση FGF2 σε κύτταρα οστεοσαρκώματος και διαπιστώθηκε μια σημαντική αύξηση ( $P \leq 0,01$ ) της μετανάστευσης των κυττάρων MG63, παρόμοια με εκείνη που προκαλείται από τη διαλείπουσα χορήγηση της PTH (1-34). Όταν πραγματοποιήθηκε ανάλυση της έκφρασης mRNA των κυττάρων στα οποία χορηγήθηκε με διαλείποντα τρόπο η PTH (1-34), παρουσιάστηκε μία έντονη αύξηση στα επίπεδα μεταγραφής του FGF2 ( $P = 0,0015$ ). Είναι ενδιαφέρον ότι η προσθήκη του FGF2 σε κύτταρα MG63 οδήγησε σε σημαντική καταστολή της έκφρασης μιας μικρής πλούσιας σε λευκίνη πρωτεογλυκάνης, της διγλυκάνης τόσο σε επίπεδο mRNA ( $P \leq 0,0001$ ) όσο και σε πρωτεϊνικό (60%) επίπεδο. Προκειμένου να εξεταστεί η σημασία της διγλυκάνης στη μετανάστευση των κυττάρων MG63, πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση των κυττάρων με SiRNA ειδικό για διγλυκάνη, με επακόλουθο σημαντική αύξηση ( $P \leq 0,01$ ) της μετανάστευσης των κυττάρων που είναι ελλιπή σε διγλυκάνη. Αντιθέτως, με το εύρημα αυτό, η εξωγενής χορήγηση ανθρώπινης ανασυνδυασμένης διγλυκάνης ανέστειλε έντονα την μετανάστευση αυτών των κυττάρων ( $P \leq 0,01$ ). Τέλος, μια άμεση συσχέτιση μεταξύ της δράσης της PTH (1-34) και της έκφρασης της διγλυκάνης διαπιστώθηκε με την σημαντική μείωση ( $P \leq 0,01$ ) των επιπέδων



μεταγραφής της διγλυκάνης στα κύτταρα που είχε προηγουμένως χορηγηθεί PTH (1-34). Συνοψίζοντας τα παραπάνω, η παρούσα μελέτη εισηγείται ένα δεύτερο μηχανισμό με τον οποίο η PTH (1-34) είναι δυνατόν να αυξήσει την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος. Πρόκειται για έναν συνεργιστικό μηχανισμό δράσης της PTH (1-34) και του FGF2, που οδηγεί σε συγκεκριμένες μεταβολές στην συγκέντρωση της διγλυκάνης στον εξωκυττάριο χώρο και κατά αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνει τον έλεγχο της κυτταρικής μετανάστευσης του οστεοσαρκώματος. Επιπλέον, η δημιουργία MG63 κυττάρων ελλιπή σε συνδεκίνη 4 οδηγεί σε αναστολή της δράσης του FGF2 ως παράγοντα που προάγει την κυτταρική μετανάστευση των κυττάρων αυτών και αναδύκνυει τη σημασία της συνδεκίνης 4 στον παραπάνω μηχανισμό.

Εν κατακλείδι, με την παρούσα μελέτη διαπιστώθηκαν 2 πιθανοί μηχανισμοί διαμέσου των οποίων η PTH (1-34) επιτυγχάνει τη δράση της στη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

**1<sup>ος</sup> Μηχανισμός:** Η PTH (1-34) ελέγχοντας τον μεταβολισμό του υαλουρονικού οξέος (HA) αυξάνει τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

**2<sup>ος</sup> Μηχανισμός:** Η PTH (1-34) ελέγχοντας την σύνθεση της διγλυκάνης με τη διαμεσολάβηση του FGF2 κατορθώνει να μεταβάλλει τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος. Σε αυτή τη δράση του FGF2 κρίσιμο ρόλο έχει η συνδεκίνη 4.

## 7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(Κατά χρονολογική σειρά)

1. F. R. Dutra, E. J. Largent, *Am J Pathol* **26**, 197 (Mar, 1950).
2. M. R. Urist, *Science* **150**, 893 (Nov 12, 1965).
3. R. A. Luben, J. F. Goggins, L. G. Raisz, *Endocrinology* **94**, 737 (Mar, 1974).
4. A. Mazabraud, *Bull Cancer* **62**, 49 (Jan-Mar, 1975).
5. D. Goltzman, A. Peytremann, E. N. Callahan, G. V. Segre, J. T. Potts, Jr., *J Clin Invest* **57**, 8 (Jan, 1976).
6. A. P. Polednak, *J Natl Cancer Inst* **60**, 77 (Jan, 1978).
7. J. Reeve *et al.*, *Br Med J* **280**, 1340 (Jun 7, 1980).
8. L. W. Fisher *et al.*, *J Biol Chem* **258**, 6588 (May 25, 1983).
9. R. E. Nemece, B. P. Toole, W. Knudson, *Biochem Biophys Res Commun* **149**, 249 (Nov 30, 1987).
10. M. Centrella, T. L. McCarthy, E. Canalis, *FASEB J* **2**, 3066 (Dec, 1988).
11. H. U. Choi *et al.*, *J Biol Chem* **264**, 2876 (Feb 15, 1989).
12. R. K. Globus, J. Plouet, D. Gospodarowicz, *Endocrinology* **124**, 1539 (Mar, 1989).
13. J. M. Hock, J. R. Hummert, R. Boyce, J. Fonseca, L. G. Raisz, *J Bone Miner Res* **4**, 449 (Jun, 1989).
14. D. Noff, S. Pitaru, N. Savion, *FEBS Lett* **250**, 619 (Jul 3, 1989).
15. S. B. Rodan, G. Wesolowski, K. Yoon, G. A. Rodan, *J Biol Chem* **264**, 19934 (Nov 25, 1989).
16. P. J. Roughley, R. J. White, *Biochem J* **262**, 823 (Sep 15, 1989).

17. V. Shen, G. Kohler, J. Huang, S. S. Huang, W. A. Peck, *Bone Miner* **7**, 205 (Nov, 1989).
18. R. Adany, R. Heimer, B. Caterson, J. M. Sorrell, R. V. Iozzo, *J Biol Chem* **265**, 11389 (Jul 5, 1990).
19. P. Bianco, L. W. Fisher, M. F. Young, J. D. Termine, P. G. Robey, *J Histochem Cytochem* **38**, 1549 (Nov, 1990).
20. D. Gospodarowicz, *Clin Orthop Relat Res*, 231 (Aug, 1990).
21. R. Hallgren, B. Gerdin, G. Tufveson, *J Exp Med* **171**, 2063 (Jun 1, 1990).
22. O. W. McBride, L. W. Fisher, M. F. Young, *Genomics* **6**, 219 (Feb, 1990).
23. J. X. Wu *et al.*, *Oncogene* **5**, 989 (Jul, 1990).
24. M. Bernfield *et al.*, *Annu Rev Cell Biol* **8**, 365 (1992).
25. M. Bernfield *et al.*, *Annu Rev Cell Biol* **8**, 365 (1992).
26. A. S. Rani, S. Kumar, *Carcinogenesis* **13**, 2021 (Nov, 1992).
27. G. Tufveson *et al.*, *Transpl Int* **5 Suppl 1**, S688 (1992).
28. H. Birkedal-Hansen *et al.*, *Crit Rev Oral Biol Med* **4**, 197 (1993).
29. B. Johnstone, M. Markopoulos, P. Neame, B. Caterson, *Biochem J* **292 ( Pt 3)**, 661 (Jun 15, 1993).
30. S. Pitaru, S. Kotev-Emeth, D. Noff, S. Kaffuler, N. Savion, *J Bone Miner Res* **8**, 919 (Aug, 1993).
31. P. J. Roughley *et al.*, *Biochem J* **295 ( Pt 2)**, 421 (Oct 15, 1993).
32. P. H. Watson, D. A. Hanley, *Clin Invest Med* **16**, 58 (Feb, 1993).
33. A. Hildebrand *et al.*, *Biochem J* **302 ( Pt 2)**, 527 (Sep 1, 1994).
34. R. J. Midura, S. P. Evanko, V. C. Hascall, *J Biol Chem* **269**, 13200 (May 6, 1994).
35. M. K. Sutherland *et al.*, *J Bone Miner Res* **9**, 453 (Apr, 1994).

36. R. V. Iozzo, *Lab Invest* **73**, 157 (Aug, 1995).
37. E. Schonherr *et al.*, *J Biol Chem* **270**, 2776 (Feb 10, 1995).
38. Z. Q. Wang, J. Liang, K. Schellander, E. F. Wagner, A. E. Grigoriadis, *Cancer Res* **55**, 6244 (Dec 15, 1995).
39. P. F. Choong *et al.*, *Int J Cancer* **69**, 268 (Aug 22, 1996).
40. P. Heldin, M. Delatorre, D. Ytterberg, J. Bergh, *Oncol Rep* **3**, 1011 (Nov, 1996).
41. N. Hunzelmann, S. Anders, S. Sollberg, E. Schonherr, T. Krieg, *Br J Dermatol* **135**, 394 (Sep, 1996).
42. V. B. Lokeshwar, B. L. Lokeshwar, H. T. Pham, N. L. Block, *Cancer Res* **56**, 651 (Feb 1, 1996).
43. J. M. Mathews, J. H. Raymer, G. R. Velez, C. E. Garner, J. R. Bucher, *Biomarkers* **1**, 196 (1996).
44. M. G. Kinsella, C. K. Tsoi, H. T. Jarvelainen, T. N. Wight, *J Biol Chem* **272**, 318 (Jan 3, 1997).
45. A. Franchi, A. Calzolari, G. Zampi, *Virchows Arch* **432**, 515 (Jun, 1998).
46. G. Gamberi *et al.*, *Oncology* **55**, 556 (Nov-Dec, 1998).
47. H. J. Kim, D. P. Rice, P. J. Kettunen, I. Thesleff, *Development* **125**, 1241 (Apr, 1998).
48. E. E. Mancilla, F. De Luca, J. A. Uyeda, F. S. Czerwiec, J. Baron, *Endocrinology* **139**, 2900 (Jun, 1998).
49. R. Massas, D. Benayahu, *J Cell Biochem* **69**, 81 (Apr 1, 1998).
50. R. Massas, D. Benayahu, *J Cell Biochem* **69**, 81 (Apr 1, 1998).
51. R. Massas, R. Korenstein, D. Benayahu, *J Cell Biochem* **69**, 282 (Jun 1, 1998).
52. S. M. Mendoza, T. Konishi, C. W. Miller, *Oncogene* **17**, 2457 (Nov 12, 1998).

53. G. Todeschini *et al.*, *Int J Infect Dis* **3**, 99 (Winter, 1998).
54. H. Ungefroren, B. Gellersen, N. B. Krull, H. Kalthoff, *J Biol Chem* **273**, 29230 (Oct 30, 1998).
55. T. Xu *et al.*, *Nat Genet* **20**, 78 (Sep, 1998).
56. T. Xu *et al.*, *Nat Genet* **20**, 78 (Sep, 1998).
57. C. Zeng, B. P. Toole, S. D. Kinney, J. W. Kuo, I. Stamenkovic, *Int J Cancer* **77**, 396 (Jul 29, 1998).
58. M. M. Hurley *et al.*, *J Bone Miner Res* **14**, 776 (May, 1999).
59. M. M. Hurley *et al.*, *J Bone Miner Res* **14**, 776 (May, 1999).
60. G. C. Jayson *et al.*, *Int J Cancer* **82**, 298 (Jul 19, 1999).
61. L. F. Lau, S. C. Lam, *Exp Cell Res* **248**, 44 (Apr 10, 1999).
62. A. Molteni, D. Modrowski, M. Hott, P. J. Marie, *Bone* **24**, 337 (Apr, 1999).
63. M. A. Anttila *et al.*, *Cancer Res* **60**, 150 (Jan 1, 2000).
64. P. Auvinen *et al.*, *Am J Pathol* **156**, 529 (Feb, 2000).
65. G. Bergers *et al.*, *Nat Cell Biol* **2**, 737 (Oct, 2000).
66. J. M. Karjalainen *et al.*, *Am J Pathol* **157**, 957 (Sep, 2000).
67. A. Montero *et al.*, *J Clin Invest* **105**, 1085 (Apr, 2000).
68. F. Navid, J. J. Letterio, C. L. Yeung, M. Pegtel, L. J. Helman, *Sarcoma* **4**, 93 (2000).
69. T. Nishida, T. Nakanishi, M. Asano, T. Shimo, M. Takigawa, *J Cell Physiol* **184**, 197 (Aug, 2000).
70. Y. Ogata *et al.*, *Matrix Biol* **19**, 395 (Sep, 2000).
71. I. C. Scott *et al.*, *J Biol Chem* **275**, 30504 (Sep 29, 2000).
72. Y. Wegrowski *et al.*, *Mol Cell Biochem* **205**, 125 (Feb, 2000).

73. Y. Wegrowski *et al.*, *Mol Cell Biochem* **205**, 125 (Feb, 2000).
74. F. Balkwill, A. Mantovani, *Lancet* **357**, 539 (Feb 17, 2001).
75. D. Benayahu, I. Shur, R. Marom, I. Meller, J. Issakov, *J Cell Biochem* **84**, 108 (2001).
76. J. R. Couchman, L. Chen, A. Woods, *Int Rev Cytol* **207**, 113 (2001).
77. L. Desnoyers, D. Arnott, D. Pennica, *J Biol Chem* **276**, 47599 (Dec 14, 2001).
78. P. Divieti *et al.*, *Endocrinology* **142**, 916 (Feb, 2001).
79. J. Filmus, S. B. Selleck, *J Clin Invest* **108**, 497 (Aug, 2001).
80. W. Huang, R. Chiquet-Ehrismann, J. V. Moyano, A. Garcia-Pardo, G. Orend, *Cancer Res* **61**, 8586 (Dec 1, 2001).
81. R. V. Iozzo, *J Clin Invest* **108**, 165 (Jul, 2001).
82. R. M. Neer *et al.*, *N Engl J Med* **344**, 1434 (May 10, 2001).
83. R. M. Neer *et al.*, *N Engl J Med* **344**, 1434 (May 10, 2001).
84. J. Oh *et al.*, *Cell* **107**, 789 (Dec 14, 2001).
85. N. Perrimon, M. Bernfield, *Semin Cell Dev Biol* **12**, 65 (Apr, 2001).
86. R. Pirinen *et al.*, *Int J Cancer* **95**, 12 (Jan 20, 2001).
87. C. J. Rosen, J. P. Bilezikian, *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 957 (Mar, 2001).
88. R. D. Sanderson, *Semin Cell Dev Biol* **12**, 89 (Apr, 2001).
89. R. D. Sanderson, *Semin Cell Dev Biol* **12**, 89 (Apr, 2001).
90. B. P. Toole, *Semin Cell Dev Biol* **12**, 79 (Apr, 2001).
91. L. Ameye *et al.*, *FASEB J* **16**, 673 (May, 2002).
92. L. Ameye, M. F. Young, *Glycobiology* **12**, 107R (Sep, 2002).
93. M. Bodo *et al.*, *Mol Med* **8**, 393 (Jul, 2002).
94. J. J. Body *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 4528 (Oct, 2002).

95. M. F. Burbridge *et al.*, *Angiogenesis* **5**, 215 (2002).
96. T. D. Camenisch, J. A. Schroeder, J. Bradley, S. E. Klewer, J. A. McDonald, *Nat Med* **8**, 850 (Aug, 2002).
97. X. D. Chen, S. Shi, T. Xu, P. G. Robey, M. F. Young, *J Bone Miner Res* **17**, 331 (Feb, 2002).
98. A. Corsi *et al.*, *J Bone Miner Res* **17**, 1180 (Jul, 2002).
99. A. Corsi *et al.*, *J Bone Miner Res* **17**, 1180 (Jul, 2002).
100. L. M. Coussens, Z. Werb, *Nature* **420**, 860 (Dec 19-26, 2002).
101. P. Divieti, M. R. John, H. Juppner, F. R. Bringhurst, *Endocrinology* **143**, 171 (Jan, 2002).
102. S. Ghatak, S. Misra, B. P. Toole, *J Biol Chem* **277**, 38013 (Oct 11, 2002).
103. N. Itano *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3609 (Mar 19, 2002).
104. A. Jacobson, M. Rahmanian, K. Rubin, P. Heldin, *Int J Cancer* **102**, 212 (Nov 20, 2002).
105. T. Katagiri, N. Takahashi, *Oral Dis* **8**, 147 (May, 2002).
106. C. Mundhenke, K. Meyer, S. Drew, A. Friedl, *Am J Pathol* **160**, 185 (Jan, 2002).
107. I. Okamoto *et al.*, *Am J Pathol* **160**, 441 (Feb, 2002).
108. H. Park, Y. Kim, Y. Lim, I. Han, E. S. Oh, *J Biol Chem* **277**, 29730 (Aug 16, 2002).
109. B. Reinboth, E. Hanssen, E. G. Cleary, M. A. Gibson, *J Biol Chem* **277**, 3950 (Feb 8, 2002).
110. T. Sobue *et al.*, *J Bone Miner Res* **17**, 502 (Mar, 2002).
111. A. H. Tashjian, Jr., B. A. Chabner, *J Bone Miner Res* **17**, 1151 (Jul, 2002).
112. E. Tufvesson, G. Westergren-Thorsson, *FEBS Lett* **530**, 124 (Oct 23, 2002).
113. J. L. Vahle *et al.*, *Toxicol Pathol* **30**, 312 (May-Jun, 2002).
114. H. Xu *et al.*, *J Biol Chem* **277**, 17308 (May 10, 2002).

115. M. F. Young, Y. Bi, L. Ameys, X. D. Chen, *Glycoconj J* **19**, 257 (May-Jun, 2002).
116. D. M. Beauvais, A. C. Rapraeger, *Exp Cell Res* **286**, 219 (Jun 10, 2003).
117. M. Betancourt *et al.*, *J Bone Miner Res* **18**, 163 (Jan, 2003).
118. L. Y. Bourguignon, P. A. Singleton, H. Zhu, F. Diedrich, *J Biol Chem* **278**, 29420 (Aug 8, 2003).
119. B. A. Brody *et al.*, *J Bone Miner Res* **18**, 1105 (Jun, 2003).
120. S. Chakraborti, M. Mandal, S. Das, A. Mandal, T. Chakraborti, *Mol Cell Biochem* **253**, 269 (Nov, 2003).
121. P. F. Choong, A. P. Nadesapillai, *Clin Orthop Relat Res*, S46 (Oct, 2003).
122. J. R. Couchman, *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 926 (Dec, 2003).
123. E. J. Franzmann *et al.*, *Int J Cancer* **106**, 438 (Sep 1, 2003).
124. R. Kalluri, *Nat Rev Cancer* **3**, 422 (Jun, 2003).
125. M. C. Langub *et al.*, *Endocrinology* **144**, 1135 (Apr, 2003).
126. A. Longhi *et al.*, *Tumori* **89**, 569 (Sep-Oct, 2003).
127. R. J. Midura, X. Su, J. A. Morcuende, M. Tammi, R. Tammi, *J Biol Chem* **278**, 51462 (Dec 19, 2003).
128. H. Ponta, L. Sherman, P. A. Herrlich, *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 33 (Jan, 2003).
129. P. M. Siegel, J. Massague, *Nat Rev Cancer* **3**, 807 (Nov, 2003).
130. K. N. Sugahara *et al.*, *J Biol Chem* **278**, 32259 (Aug 22, 2003).
131. R. J. Waddington, H. C. Roberts, R. V. Sugars, E. Schonherr, *Eur Cell Mater* **6**, 12 (Oct 6, 2003).
132. X. D. Chen, L. W. Fisher, P. G. Robey, M. F. Young, *FASEB J* **18**, 948 (Jun, 2004).
133. D. M. French *et al.*, *Am J Pathol* **165**, 855 (Sep, 2004).



134. C. Khanna *et al.*, *Nat Med* **10**, 182 (Feb, 2004).
135. M. G. Kinsella, S. L. Bressler, T. N. Wight, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **14**, 203 (2004).
136. A. Kosunen *et al.*, *Oral Oncol* **40**, 257 (Mar, 2004).
137. F. Lopez-Rios, P. B. Illei, V. Rusch, M. Ladanyi, *Lancet* **364**, 1157 (Sep 25-Oct 1, 2004).
138. R. D. Sanderson, Y. Yang, L. J. Suva, T. Kelly, *Matrix Biol* **23**, 341 (Oct, 2004).
139. B. P. Toole, *Nat Rev Cancer* **4**, 528 (Jul, 2004).
140. S. Wadhwa, M. C. Embree, Y. Bi, M. F. Young, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **14**, 301 (2004).
141. S. Wadhwa, M. C. Embree, Y. Bi, M. F. Young, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **14**, 301 (2004).
142. S. Adamia *et al.*, *Blood* **105**, 4836 (Jun 15, 2005).
143. Y. Bi *et al.*, *J Biol Chem* **280**, 30481 (Aug 26, 2005).
144. C. R. Dass *et al.*, *Clin Exp Metastasis* **22**, 643 (2005).
145. E. A. Engels, *Expert Rev Vaccines* **4**, 197 (Apr, 2005).
146. S. Groth, M. Schulze, H. Kalthoff, F. Fandrich, H. Ungefroren, *J Biol Chem* **280**, 33190 (Sep 30, 2005).
147. R. V. Iozzo, *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 646 (Aug, 2005).
148. V. B. Lokeshwar, W. H. Cerwinka, T. Isoyama, B. L. Lokeshwar, *Cancer Res* **65**, 7782 (Sep 1, 2005).
149. J. J. Manfredi *et al.*, *Cancer Res* **65**, 2602 (Apr 1, 2005).
150. V. Masson *et al.*, *FASEB J* **19**, 234 (Feb, 2005).
151. K. Miyazono, S. Maeda, T. Imamura, *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 251 (Jun, 2005).
152. M. Moreno *et al.*, *EMBO J* **24**, 1397 (Apr 6, 2005).

153. Y. Nishida, W. Knudson, C. B. Knudson, N. Ishiguro, *Exp Cell Res* **307**, 194 (Jul 1, 2005).
154. D. Parisuthiman, Y. Mochida, W. R. Duarte, M. Yamauchi, *J Bone Miner Res* **20**, 1878 (Oct, 2005).
155. A. C. Paulino, B. Z. Fowler, *Pediatr Hematol Oncol* **22**, 89 (Mar, 2005).
156. L. Schaefer *et al.*, *J Clin Invest* **115**, 2223 (Aug, 2005).
157. Y. Takahashi *et al.*, *J Biol Chem* **280**, 24195 (Jun 24, 2005).
158. E. Tkachenko, J. M. Rhodes, M. Simons, *Circ Res* **96**, 488 (Mar 18, 2005).
159. L. Udabage, G. R. Brownlee, S. K. Nilsson, T. J. Brown, *Exp Cell Res* **310**, 205 (Oct 15, 2005).
160. T. Douglas, S. Heinemann, S. Bierbaum, D. Scharnweber, H. Worch, *Biomacromolecules* **7**, 2388 (Aug, 2006).
161. C. Y. Fears, A. Woods, *Matrix Biol* **25**, 443 (Sep, 2006).
162. M. M. Hurley *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 989 (Mar 24, 2006).
163. M. M. Hurley *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 989 (Mar 24, 2006).
164. M. L. Mercado *et al.*, *FASEB J* **20**, 1724 (Aug, 2006).
165. Y. Mochida, D. Parisuthiman, M. Yamauchi, *Adv Exp Med Biol* **585**, 101 (2006).
166. D. Nikitovic *et al.*, *IUBMB Life* **58**, 47 (Jan, 2006).
167. M. S. Rafii *et al.*, *J Cell Physiol* **209**, 439 (Nov, 2006).
168. X. K. Xie, D. S. Yang, Z. M. Ye, H. M. Tao, *Cancer Invest* **24**, 1 (Feb, 2006).
169. M. F. Young *et al.*, *J Musculoskelet Neuronal Interact* **6**, 364 (Oct-Dec, 2006).
170. Y. Bi *et al.*, *Nat Med* **13**, 1219 (Oct, 2007).
171. R. Derynck, R. J. Akhurst, *Nat Cell Biol* **9**, 1000 (Sep, 2007).

172. P. Picci, *Orphanet J Rare Dis* **2**, 6 (2007).
173. V. Pillay, C. R. Dass, P. F. Choong, *Trends Biotechnol* **25**, 33 (Jan, 2007).
174. S. Wadhwa *et al.*, *Bone* **40**, 861 (Apr, 2007).
175. P. H. Weigel, P. L. DeAngelis, *J Biol Chem* **282**, 36777 (Dec 21, 2007).
176. C. Arvanitis, P. K. Bendapudi, J. R. Tseng, S. S. Gambhir, D. W. Felsher, *Cancer Biol Ther* **7**, 1947 (Dec, 2008).
177. J. Y. Hwang *et al.*, *Am J Pathol* **173**, 1919 (Dec, 2008).
178. D. Nikitovic *et al.*, *FEBS J* **275**, 350 (Jan, 2008).
179. D. Nikitovic, P. Katonis, A. Tsatsakis, N. K. Karamanos, G. N. Tzanakakis, *IUBMB Life* **60**, 818 (Dec, 2008).
180. B. Perbal *et al.*, *Clin Cancer Res* **14**, 701 (Feb 1, 2008).
181. R. D. Sanderson, Y. Yang, *Clin Exp Metastasis* **25**, 149 (2008).
182. L. Schaefer, R. V. Iozzo, *J Biol Chem* **283**, 21305 (Aug 1, 2008).
183. L. Schaefer, R. V. Iozzo, *J Biol Chem* **283**, 21305 (Aug 1, 2008).
184. I. Scionti *et al.*, *Ann Oncol* **19**, 1500 (Aug, 2008).
185. R. Stern, *Semin Cancer Biol* **18**, 275 (Aug, 2008).
186. A. Zafiropoulos *et al.*, *Mol Cancer Res* **6**, 785 (May, 2008).
187. A. Babelova *et al.*, *J Biol Chem* **284**, 24035 (Sep 4, 2009).
188. G. Chalkiadaki *et al.*, *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1323 (Jun, 2009).
189. G. Chalkiadaki *et al.*, *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1323 (Jun, 2009).
190. N. S. Datta, A. B. Abou-Samra, *Cell Signal* **21**, 1245 (Aug, 2009).
191. S. Gagiannis *et al.*, *Int J Cancer* **125**, 1551 (Oct 1, 2009).
192. C. A. Inkson *et al.*, *Cells Tissues Organs* **189**, 153 (2009).

193. C. A. Inkson *et al.*, *Cells Tissues Organs* **189**, 153 (2009).
194. R. V. Iozzo, J. J. Zoeller, A. Nystrom, *Mol Cells* **27**, 503 (May 31, 2009).
195. D. G. Jackson, *Immunol Rev* **230**, 216 (Jul, 2009).
196. K. Lambaerts, S. A. Wilcox-Adelman, P. Zimmermann, *Curr Opin Cell Biol* **21**, 662 (Oct, 2009).
197. F. Lapraz, L. Besnardeau, T. Lepage, *PLoS Biol* **7**, e1000248 (Nov, 2009).
198. V. D. Leaner *et al.*, *Am J Pathol* **174**, 265 (Jan, 2009).
199. M. Lontos *et al.*, *Am J Pathol* **175**, 376 (Jul, 2009).
200. S. Matou-Nasri, J. Gaffney, S. Kumar, M. Slevin, *Int J Oncol* **35**, 761 (Oct, 2009).
201. R. Merline, R. M. Schaefer, L. Schaefer, *J Cell Commun Signal* **3**, 323 (Dec, 2009).
202. M. P. O'Connell *et al.*, *J Biol Chem* **284**, 28704 (Oct 16, 2009).
203. K. K. Papachroni, D. N. Karatzas, K. A. Papavassiliou, E. K. Basdra, A. G. Papavassiliou, *Trends Mol Med* **15**, 208 (May, 2009).
204. B. Rikhof, S. de Jong, A. J. Suurmeijer, C. Meijer, W. T. van der Graaf, *J Pathol* **217**, 469 (Mar, 2009).
205. K. M. Rode, P. M. de Freitas, P. R. Lloret, L. G. Powell, M. L. Turbino, *Lasers Med Sci* **24**, 87 (Jan, 2009).
206. M. G. Sabbieti *et al.*, *J Cell Physiol* **219**, 143 (Apr, 2009).
207. M. G. Sabbieti *et al.*, *J Cell Physiol* **219**, 143 (Apr, 2009).
208. M. L. Tan, P. F. Choong, C. R. Dass, *Cancer Biol Ther* **8**, 106 (Jan, 2009).
209. N. M. Teplyuk *et al.*, *J Cell Biochem* **107**, 144 (May 1, 2009).
210. X. Wan *et al.*, *Oncogene* **28**, 3401 (Sep 24, 2009).
211. U. Yamaguchi *et al.*, *Cancer Sci* **100**, 2268 (Dec, 2009).

212. G. Zhang *et al.*, *J Biol Chem* **284**, 8888 (Mar 27, 2009).
213. U. Barash *et al.*, *FEBS J* **277**, 3890 (Oct, 2010).
214. J. Dong *et al.*, *Mol Cancer Ther* **9**, 2593 (Sep, 2010).
215. M. C. Embree *et al.*, *Am J Pathol* **176**, 812 (Feb, 2010).
216. R. V. Iozzo, L. Schaefer, *FEBS J* **277**, 3864 (Oct, 2010).
217. R. V. Iozzo, L. Schaefer, *FEBS J* **277**, 3864 (Oct, 2010).
218. S. Kalamajski, A. Oldberg, *Matrix Biol* **29**, 248 (May, 2010).
219. E. A. Kolb *et al.*, *Pediatr Blood Cancer* **55**, 67 (Jul 15, 2010).
220. S. Lossdorfer, F. Yildiz, W. Gotz, Y. Kheralla, A. Jager, *Clin Oral Investig* **14**, 89 (Feb, 2010).
221. T. Manon-Jensen, Y. Itoh, J. R. Couchman, *FEBS J* **277**, 3876 (Oct, 2010).
222. K. Moreth *et al.*, *J Clin Invest* **120**, 4251 (Dec, 2010).
223. L. Schaefer, R. M. Schaefer, *Cell Tissue Res* **339**, 237 (Jan, 2010).
224. L. Schaefer, R. M. Schaefer, *Cell Tissue Res* **339**, 237 (Jan, 2010).
225. M. L. Tan, P. F. Choong, C. R. Dass, *Cancer Cell Int* **10**, 9 (2010).
226. A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, G. N. Tzanakakis, N. K. Karamanos, *FEBS J* **277**, 3904 (Oct, 2010).
227. D. Vigetti *et al.*, *J Biol Chem* **285**, 24639 (Aug 6, 2010).
228. Y. H. Wang *et al.*, *Mol Cell Biochem* **341**, 225 (Aug, 2010).
229. Z. X. Wang *et al.*, *Bone* **47**, 445 (Aug, 2010).
230. C. Yang *et al.*, *Carcinogenesis* **31**, 552 (Apr, 2010).
231. J. Yang *et al.*, *Cancer Lett* **291**, 31 (May 1, 2010).
232. A. R. Amenta *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 762 (Jan 11, 2011).

233. A. D. Berendsen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17022 (Oct 11, 2011).
234. O. Fromigue *et al.*, *J Bone Miner Res* **26**, 1533 (Jul, 2011).
235. K. Kouvidi *et al.*, *J Biol Chem* **286**, 38509 (Nov 4, 2011).
236. P. A. Miguez, M. Terajima, H. Nagaoka, Y. Mochida, M. Yamauchi, *Biochem Biophys Res Commun* **405**, 262 (Feb 11, 2011).
237. L. Schaefer, *J Am Soc Nephrol* **22**, 1200 (Jul, 2011).
238. R. H. Tammi *et al.*, *FEBS J* **278**, 1419 (May, 2011).
239. J. Yang *et al.*, *Cancer* **117**, 4925 (Nov 1, 2011).
240. A. R. Amenta *et al.*, *J Neurosci* **32**, 2324 (Feb 15, 2012).
241. D. Brambilla *et al.*, *Int J Cancer* **130**, 2824 (Jun 15, 2012).
242. X. Chen *et al.*, *Mol Carcinog*, (Sep 4, 2012).
243. Y. Li *et al.*, *FEBS J* **279**, 2247 (Jun, 2012).
244. K. Moreth, R. V. Iozzo, L. Schaefer, *Cell Cycle* **11**, 2084 (Jun 1, 2012).
245. L. Schaefer, R. V. Iozzo, *Curr Opin Genet Dev* **22**, 56 (Feb, 2012).
246. T. Sueyoshi *et al.*, *Cancer Lett* **316**, 23 (Mar, 2012).
247. H. Urakawa *et al.*, *J Orthop Res* **30**, 662 (Apr, 2012).

## Research Communication

# Parathyroid Hormone (PTH) Peptides Through the Regulation of Hyaluronan Metabolism Affect Osteosarcoma Cell Migration

Aikaterini Berdiaki<sup>1\*</sup>, Georgios A. Datsis<sup>1\*</sup>, Dragana Nikitovic<sup>1</sup>, Aristidis Tsatsakis<sup>1</sup>, Pavlos Katonis<sup>2</sup>, Nikos K. Karamanos<sup>3</sup> and George N. Tzanakakis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Histology, Division of Morphology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece

<sup>2</sup>Department of Orthopedics, University Hospital of Heraklion, Heraklion, Greece

<sup>3</sup>Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Patras, Patras, Greece

---

### Summary

Parathyroid hormone (PTH) strongly stimulates hyaluronan (HA) synthesis and secretion of both normal and carcinogenic cells of the osteoblastic lineage and improves skeletal microarchitecture. HA, a glycosaminoglycan component of the extracellular matrix (ECM), is capable of transmitting ECM-derived signals to regulate cellular function. In this study, we investigated whether the changes of HA metabolism induced by PTH (1–34) and PTH (7–84) peptides in moderately MG-63 and well-differentiated Saos 2 osteosarcoma cell lines, are correlated to their migration capabilities. Our results demonstrate that intermittent PTH (1–34) treatment significantly ( $P \leq 0.01$ ) supported the migration of MG-63 cells, increased their HA-synthase-2 (HAS2) expression ( $P \leq 0.001$ ), and enhanced their high-molecular size HA deposition in the pericellular matrix. Both increased endogenous HA production ( $P \leq 0.01$ ) and treatment with exogenous high-molecular weight HA ( $P \leq 0.05$ ) correlated to a significant increase of MG-63 cell migration capacity. Transfection with siHAS2 showed that PTH (1–34), mainly through HAS2, enhanced HA and regulated MG-63 cell motility. Interestingly, continuous PTH (1–34) treatment stimulated both Saos 2 cell HAS2 ( $P \leq 0.001$ ) and HAS1 ( $P \leq 0.001$ ) isoform expression inhibited their HYAL2 expression ( $P \leq 0.001$ ) and modestly ( $P \leq 0.05$ ) enhanced their migration. Therefore, the PTH (1–34) administration mode appears to distinctly modulate the migratory responses of the MG-63 moderately and Saos 2 well-differentiated osteosarcoma cell lines. Conclusively, the obtained data suggest that there is a regulatory effect of PTH (1–34), in an administration mode-dependent manner, on HA metabolism that is essential for osteosarcoma cell migration. © 2010 IUBMB

IUBMB *Life*, 62(5): 377–386, 2010

**Keywords** hyaluronan (HA); parathyroid hormone (PTH); PTH peptides; osteosarcoma; cell migration; wound healing.

### INTRODUCTION

Parathyroid hormone (PTH) is an 84-amino acid polypeptide hormone produced by the parathyroid gland that regulates calcium homeostasis and bone remodeling. The anabolic effect of intermittent administration yielding a transient peak blood level and the catabolic effect of continuous administration of PTH on bone formation have been demonstrated in human and animal models (1–3). The effects of PTH in osteoblastic cells are mostly perpetrated through the activation of the specific G-protein-coupled receptor, PTH1R either through the formation of cyclic 30,50-adenosine monophosphate or alternatively through the activation of the mitogen-activated protein kinase (4, 5).

The aminoterminal peptide 1–34 (PTH 1–34) is a PTH analogue, which acts in an identical way as the full length protein (4). Large N-terminally truncated PTH fragments such as PTH (7–84) are also normally present in peripheral blood (6). However, PTH (7–84) is suggested to inhibit PTH signaling and to initiate adverse biological effects (6, 7).

Hyaluronan (HA) is a heteropolysaccharide with a molecular mass between  $10^5$  and  $10^7$  Da, localized primarily in the extracellular matrix (ECM) of cells (8). HAS1 and HA-synthase-2 (HAS2) HA synthase isoforms synthesize high-molecular weight HA, whereas HAS3 synthesizes shorter forms of HA (9). In somatic tissues HYAL1 and HYAL2 are the major hyaluronidases responsible for the degradation of HA (10, 11). Importantly, HA plays a role in a number of biological activities ranging from tissue hydration to cell migration in a manner dependent on its molecular mass (12). In addition, changes in HA metabolism have been proven to be of high importance in cancer cell

---

\*These authors contributed equally to this work.

Received 9 December 2009; accepted 9 February 2010

Address correspondence to: G. N. Tzanakakis, Department of Histology, Division of Morphology, School of Medicine, University of Crete, Voutes 71110 Heraklion, Greece. Tel/Fax: +30 2810394719. E-mail: tzanakak@med.uoc.gr

**Table 1**  
Sequence of primers for the genes of interest

Primer name	Sequence
HYAL1_F	5' CCG GTG CTG CCC TAT GTC 3'
HYAL1_R	5' AGG CTG TGC TCC AGC TCA TC 3'
HYAL2_F	5' GGC GCA GCT GGT GTC ATC 3'
HYAL2_R	5' CCG TGT CAG GTA ATC TTT GAG GTA CT3'
CD44_F	5' GGT CCT ATA AGG ACA CCC CAA AT 3'
CD44_R	5' AAT CAA AGC CAA GGC CAA GA 3'
HAS2_F	5' GTG TTA TAC ATG TCG AGT TTA CTT CC 3'
HAS2_R	5' GTC ATA TTG TTG TCC CTT CTT CCG C 3'
HAS1_F	5' GGT GGG GAC GTG GGA TC 3'
HAS1_R	5' ATG CAG GAT ACA CAG TGG AAG TAG 3'
HAS3_F	5' GGT ACC ATC AGA AGT TCC TAG GCA GC 3'
HAS3_R	5' GAG GAG AAT GTT CCA GAT GCG 3'
PTH1R_F	5' CCT GTC CGG ACT ACA TTT ATG 3'
PTH1R_R	5' GCC CAC GGT GTA AAT CAT GC 3'
GAPDH_F	5' GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA 3'
GAPDH_R	5' GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CAC T 3'

function (13). Factors affecting HA metabolism, consequently, regulate the migration capacity of carcinoma cell lines (14). PTH has been reported to strongly stimulate the HA production of both normal (15, 16) and carcinogenic cells of the osteoblastic lineage (17). It has been previously demonstrated that the antisense inhibition of HAS2, *via* reduction of HA accumulation and cell-associated matrix formation (18), inhibits MG-63 osteosarcoma cell proliferation, motility, and invasiveness. In view of the fact that PTH-related pathways have been previously suggested to affect osteoblastic cell migration (19), we hypothesized that in osteosarcoma cell lines PTH peptides could modulate the expression of HA metabolism-related genes and, consequently, the migration capacity of these cells.

Our results demonstrate for the first time that the PTH peptides in an administration mode-dependent manner specifically regulate HAS isoform and hyaluronidase gene expressions to stimulate osteosarcoma cell HA production. Increased HA synthesis was correlated to the enhancement of osteosarcoma cell ability to migrate as demonstrated by short interfering RNA (siRNA) transfection experiments.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Materials

Recombinant human PTH (1–34) peptide and hyaluronidase (*Streptomyces hyalurolyticus*) were obtained from Sigma, whereas recombinant human PTH (7–84) peptide was obtained from Bachem (UK). The commercial name of the high-molecular weight HA preparation used is Healon (10 mg/mL, also containing sodium chloride 8.5 mg, disodium hydrogen phosphate dihydrate 0.28 mg, sodium dihydrogen phosphate hydrate 0.04

mg, and water for injection USP; Pharmacia AB Sweden). HA binding protein (HABP) was purchased from Seikagaku (Japan). The respective, secondary and primary antibodies (polyclonal goat anti-actin, sc-1616; polyclonal goat anti-HAS2, sc-34068) were purchased from SantaCruz. Cell culture reagents were obtained from GIBCO-Invitrogen.

### Cell Culture

In this study, Saos 2 and MG-63 human osteosarcoma cell lines of low and high metastatic capacities were utilized. Saos 2 are well-differentiated osteoblast-like cells, whereas MG-63 cells are moderately differentiated fibroblastoid-type cells (20, 21). Saos 2 and MG-63 cells were grown in DMEM (Biochrom KG) supplemented with 10% fetal bovine serum. Before stimulation with PTH peptides, the cells were cultured in serum free medium for 24 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The treatments with PTH (1–34) and PTH (7–84) peptides were performed in serum free medium either intermittently (during the first 6 h in each 24-h period) for two cycles or continuously for 48 h.

### RNA Isolation and Real-Time PCR

The TRIzol method (GibcoBRL) and the DyNAmo cDNA synthesis Kit (Finnzymes, Finland) were utilized for mRNA extraction and cDNA synthesis, respectively. Primers were designed to be mRNA specific (Table 1). QuantiTech SYBR Green master mix (Qiagen) was used for the real-time PCR reaction (20 µL reaction volume) and performed by an M×300P cycler. The quantity of each target was normalized against the quantity of GAPDH.



### Western Blot

Cells were harvested using RIPA solution. The samples were electrophoresed on 8% polyacrylamide Tris/Glycine gels and transferred to nitrocellulose membranes [10 mM CAPS (3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid; linear formula:  $C_6H_{11}NH(CH_2)_3SO_3H$ ; C2632 by Sigma), pH 11, containing 10% methanol]. Membranes were blocked and incubated for 1 h at room temperature (RT) with primary antibody (1:200). The immune complexes were detected after incubation with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2,000) with the SuperSignalWest Pico Chemiluminescent substrate (Pierce).

### Wound Healing Assay

The utilized “wound healing assay,” an established method of assessing cancer cell motility was performed as previously described (14, 22). Briefly, MG-63 and Saos 2 cells were seeded in 24-well culture plates at a concentration of 60,000 and 80,000 cells per well, respectively. After serum starvation for 24 h, treatments were added (NPTH, 50 nM; hyaluronidase, 7 units/mL; HA, 50  $\mu$ g/mL) either intermittently (during the first 6 h in each 24-h period, where the medium was changed to 0% DMEM) for two cycles or continuously for 48 h when the cell layer was wounded. Detached cells were removed by washing with serum free media. The wound closure was monitored at 0 and 24 h. The experiment was also performed with cells transfected with siRNA. After transfection for 48 h, the “wound healing assay” was performed as described above. The wound closure was monitored using a digital image processor connected to a microscope at six different positions across the wound. Cell motility was quantified by ImageJ 1.4.3.67 Launcher Symmetry Software.

### Transfection with siRNA

siRNA specific for HAS-2 (variant 97, 98, and 99) and Stealth<sup>TM</sup> RNAi negative control (siScr) were purchased from Invitrogen. Optimization of the transfection protocol conditions was performed. Finally, siRNA-99 (100 nM; Invitrogen) and Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 (1  $\mu$ L; Invitrogen) were first diluted separately in 50  $\mu$ L Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium (Invitrogen). Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 was mixed with 50  $\mu$ L diluted siRNA for 20 min (RT) to allow siRNA-liposome complexes to form. Cells were counted, added on top of the lipofectamine and siRNA mix, and shaken gently. The transfection took place in a 6-h period when the medium was replaced with fresh containing antibiotics and the incubation period continued for 48 h. At these time point the cells were harvested and RNA was extracted or treatments were added. All transfection experiments were repeated at least three times and performed in triplicates.

### Immunofluorescence

Cells were plated on coverslips, placed in 24-well plates, and after a 24-h serum starvation, treatments were added. The cells were fixed with a 5% formaldehyde and 0.02 g/mL sucrose for 10 min at RT. Biotinylated HABP (1:10 dilution in PBS 1%

bovine serum) was added for 1 h at RT. Coverslips not incubated with HABP were utilized as negative controls. Finally, the coverslips were washed and incubated for 1 h, in the dark at RT, with FITC-Streptavidin (Zymed). Hoescht dye was used for the nuclear staining. Coverslips were then mounted onto slides using ProLong gold antifade reagent (Molecular Probes) and visualized using a LEICA DM2500 microscope fitted with a DFC490 digital camera.

### Statistical Analysis

The statistical significance was evaluated by student's *t* test using GraphPad Prism (version 4.0) software.

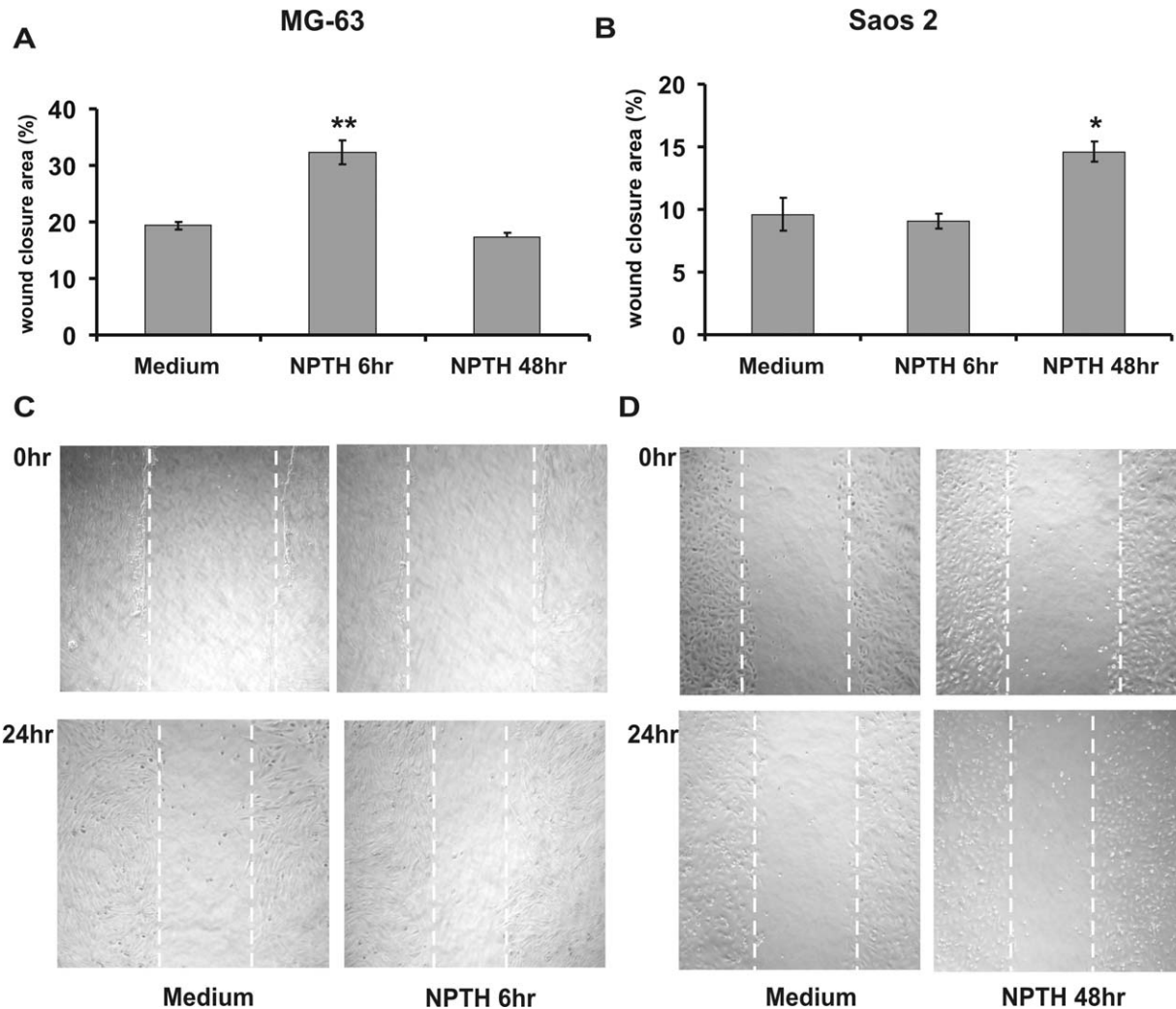
## RESULTS

### Effects of PTH Peptides on Osteosarcoma Cell Migration

MG-63 and Saos 2, human osteosarcoma cell lines of different differentiation status that express PTRH receptors (data not shown), were intermittently treated with PTH (1–34) and PTH 7–84 peptides that are normally found in peripheral blood (during the first 6 h in each 24-h period) for two cycles or continuously for 48 h, and their cell motility was determined utilizing a “wound healing” assay. Intermittent PTH (1–34) treatment of MG-63 cells significantly ( $P < 0.01$ ) supported the migration of these cells (Figs. 1A and 1C). In contrast, Saos 2 cells under the same treatment conditions did not exhibit changes in their ability to migrate (Figs. 1B and 1D) whereas continuous treatment with PTH (1–34) during 48 h (Figs. 1A and 1C), moderately upregulated Saos 2 cells' migration ( $P = 0.05$ ; Figs. 1B and 1D). PTH (7–84) did not affect osteosarcoma cell motility under any treatments that are utilized. Following the observed treatment data, further studies have been performed utilizing intermittent treatment for MG-63 cells and continuous treatment for Saos 2 cell lines.

### Effects of PTH Peptides on HAS Isoform Expression

Both cell lines with different basal HA production (23) were treated with the PTH (1–34) and PTH (7–84) peptides intermittently (during the first 6 h in each 24-h period) for two cycles or continuously for 48 h, and the expression of HAS1, 2, and 3 genes was evaluated at the beginning and at the end of each treatment type. Real-time PCR demonstrated that MG-63 cells express HAS2 and HAS3 products (Figs. 2A and 2B), whereas HAS2 and HAS1 transcripts were detected in various amounts in Saos 2 cells (Figs. 2C and 2D). Intermittent PTH (1–34) treatment of MG-63 cells resulted in a strong stimulation ( $P \leq 0.001$ ) of their HAS2 expression (Fig. 2A) whereas, the same treatment with PTH (7–84) modestly inhibited HAS isoform expression ( $P \leq 0.05$ ) (Fig. 2A). Interestingly, continuous treatment of MG-63 cells with both utilized peptides did not affect HAS isoform expressions. On the other hand, continuous treatment of Saos 2 cells with PTH (1–34) resulted in a significant stimulation of both their HAS1 ( $P \leq 0.001$ ) and HAS2 ( $P \leq 0.001$ ) expression (Figs. 2C and 2D). As HAS1 and HAS2 are known to produce



**Figure 1.** Effects of PTH peptides on osteosarcoma cell migration. MG-63 (A) and Saos 2 (B) human osteosarcoma cell lines were treated with PTH (1–34) (NPTH) (50 nM) intermittently (during the first 6 h in each 24-h period) for two cycles or continuously for 48 h at which point they were confluent. Cell layer was “scratched” with a 10  $\mu$ L sterile pipette tip and the “wound” surface area was measured at the 0 and 24 h points. Cells grown in 0% serum free culture medium were utilized as control. The results were expressed as % of closure of wound surface area at 0-h time point (at 0-h time point, the wound surface area was 100%). (Means  $\pm$  SEM plotted;  $n = 3$ ). \*Depicts statistical significance  $P \leq 0.05$  compared with 0% control cells (unpaired  $t$  test).

high-molecular size HA, our results collectively suggest that PTH (1–34) increases the high-molecular size HA content of osteosarcoma cells in a manner dependent on the treatment type.

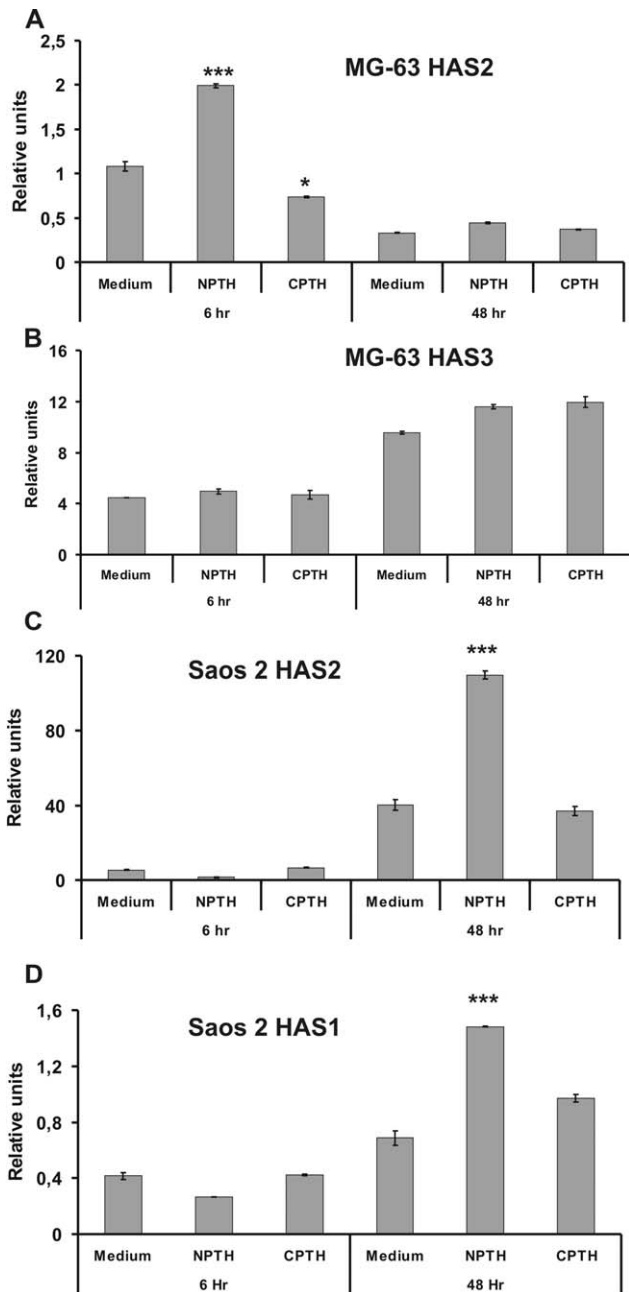
#### Effects of PTH Peptides on HYAL Isoforms and CD44 Expression

Real-time PCR demonstrated that HYAL2, but not HYAL1, isoform was expressed by both MG-63 and Saos 2 cells. After intermittent treatment, no effect of either PTH peptide was observed on HYAL2 expression (Figs. 3A and 3B). In contrast, both MG-63 and Saos 2 cells exhibited a statistically significant reduction in their HYAL2 mRNA expression ( $P \leq 0.01$  and  $P \leq 0.001$ ) after continuous treatment with PTH (7–84; Figs. 3A

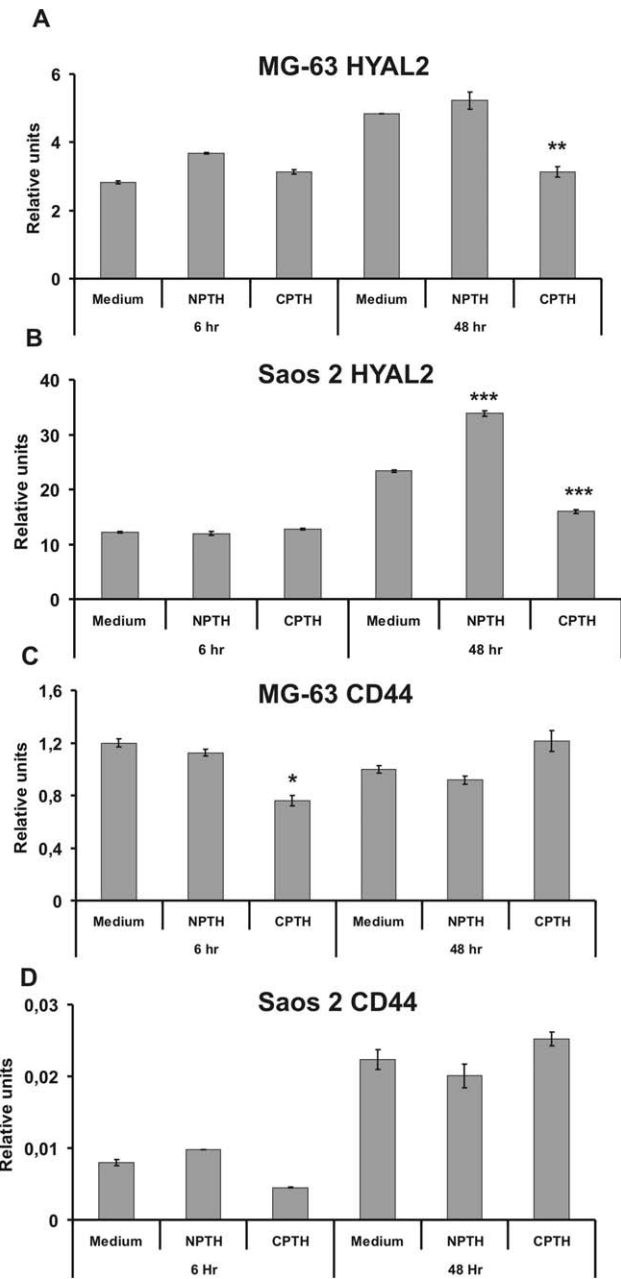
and 3B). On the other hand, a significant upregulation of HYAL2 expression ( $P < 0.001$ ) was observed in Saos 2 cells as it was continuously treated with PTH (1–34; Fig. 3B). The continuous treatment with both PTH (1–34) and PTH (7–84) peptides did not affect CD44 expression in MG63 and Saos 2 cells (Fig. 3D), whereas a moderate inhibition in the levels of the MG63 cells’ CD44 transcripts ( $P < 0.05$ ) after intermittent PTH (7–84) was demonstrated.

#### Visualization of HA Matrix of Osteosarcoma Cells

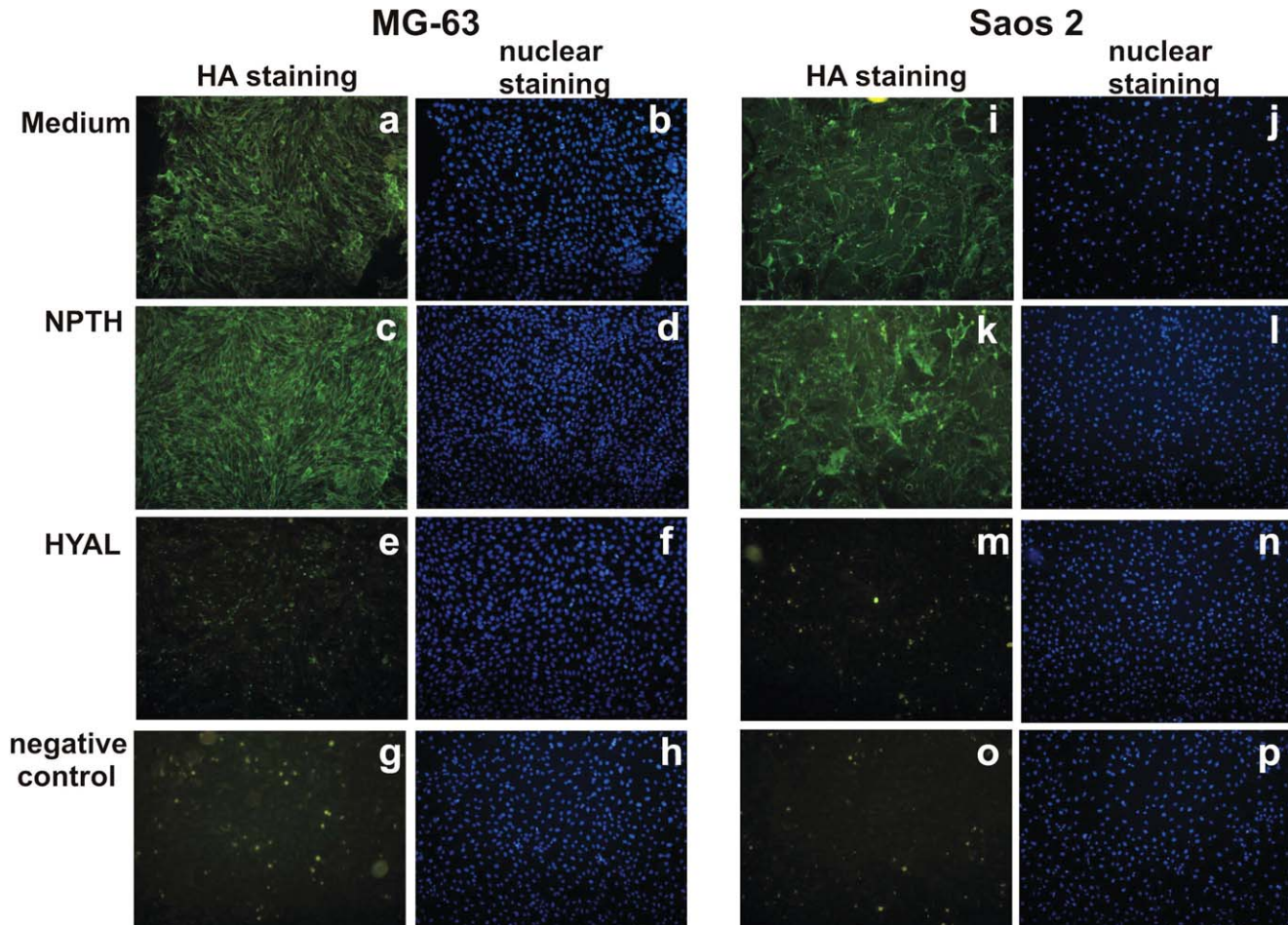
The ECM surrounding MG-63 has a marked higher staining intensity on intermittent addition of PTH (1–34), whereas only a



**Figure 2.** Effects of PTH peptides on HAS isoform expression. MG-63 and Saos 2 human osteosarcoma cells were treated with PTH (1–34) (NPTH) (10 nM) or PTH (7–34) (CPTH) (10 nM) intermittently (during the first 6 h in each 24-h period) for two cycles or continuously for 48 h, and their HAS isoform expression was determined by utilizing the real-time PCR. (A) MG-63 HAS2 isoform expression; (B) MG-63 HAS3 isoform expression; (C) Saos 2 HAS2 isoform expression; and (D) Saos 2 HAS1 isoform expression. The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means  $\pm$  SEM plotted; statistical significance: \* $P \leq 0.05$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$  compared to control.



**Figure 3.** Effects of PTH peptides on HYAL isoforms and CD44 expression. MG-63 and Saos 2 human osteosarcoma cell lines were treated with PTH (1–34) (NPTH) (10 nM) or PTH (7–34) (CPTH) (10 nM) intermittently (during the first 6 h in each 24-h period) for two cycles or continuously for 48 h, and their HYAL 2 and CD44 expression were determined by utilizing the real-time PCR. (A) MG-63 HYAL2 isoform expression; (B) Saos 2 HYAL2 isoform expression; (C) MG-63 CD44 expression; and (D) Saos 2 CD44 expression. The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means  $\pm$  SEM plotted; statistical significance: \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$  as compared to control.



**Figure 4.** Visualization of HA matrix of osteosarcoma cells. MG-63 (a–h) and Saos 2 (i–p) cells were stained for HA using biotinylated HABP (hyaluronan binding protein) as well as the respective nuclear staining (using Hoechst), following a 48 h incubation period with (MG-63 a and b; Saos 2 i and j) 0% serum free culture medium, (MG-63 c and d; Saos 2 k and l) NPTH (50 nM) intermittently (during the first 6 h in each 24-h period) for two cycles for MG-63 cells or continuously for 48 h for Saos 2 cells, (MG-63 e and f; Saos 2 m and n) hyaluronidase (*Streptomyces hyalurolyticus*) (7 units/mL)—used as a negative control—and (MG-63 g and h; Saos 2 o and p) the second negative control where biotinylated HABP incubation was omitted. Pictures were taken using  $\times 20$  magnification.

minor increase in Saos 2 cell staining intensity on continuous addition of PTH (1–34), was discerned (Figs. 4a, c, i, and k). These findings correlate well with the data showing distinct modulation of HAS1 and 2 and HYAL2 isoform expression by PTH (1–34) in these cell lines (Fig. 2). In control experiments, treatment with exogenous hyaluronidase decreases the staining of the HA matrix, which was especially evident in the pericellular matrix of these cells (Figs. 4E and 4M). Our results demonstrate that PTH (1–34) specifically in a treatment-type-dependent manner modulates the HA content of the osteosarcoma cell pericellular matrix.

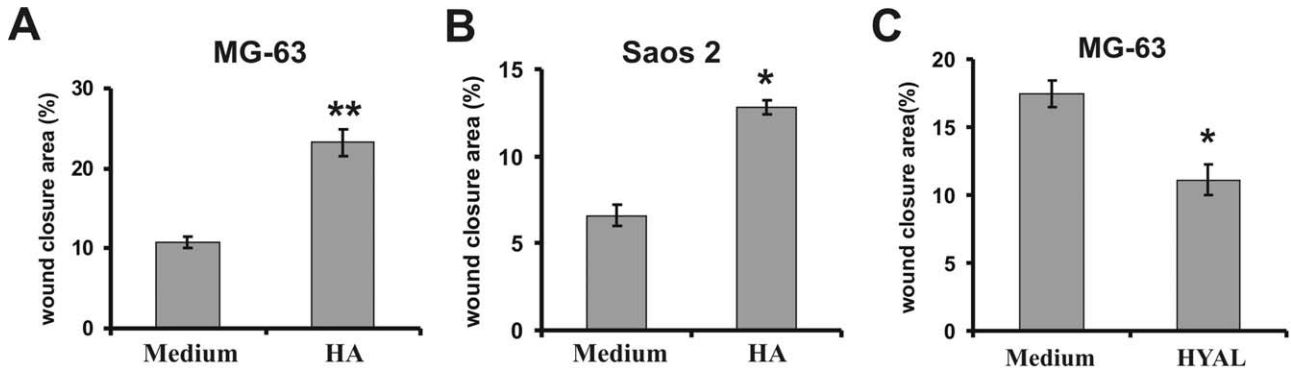
#### **Effect of Exogenous HA on Osteosarcoma Cell Migration**

As HAS1 and HAS2 isoforms synthesize high-molecular size HA, we examined the effect of exogenous high-molecular

weight HA (Healon; MW  $3\text{--}4 \times 10^6$  Da) and hyaluronidase treatment on osteosarcoma cell motility utilizing a “wound healing” assay. Exogenous HA significantly stimulated the migration of MG-63 cells ( $P < 0.0354$ ) and moderately enhanced Saos 2 cell migration ( $P < 0.05$ ; Figs. 5A and 5B). On the other hand, treatment with hyaluronidase significantly lowered the capability of MG-63 cells to migrate ( $P < 0.001$ ; Fig. 5C).

#### **Effect of HAS2 Inhibition by siRNA on Osteosarcoma Cell Migration**

To test our hypothesis, we performed downregulation of HAS2 expression utilizing the RNA interference (RNAi) method. Transfection of MG-63 and Saos 2 cells with siHAS2



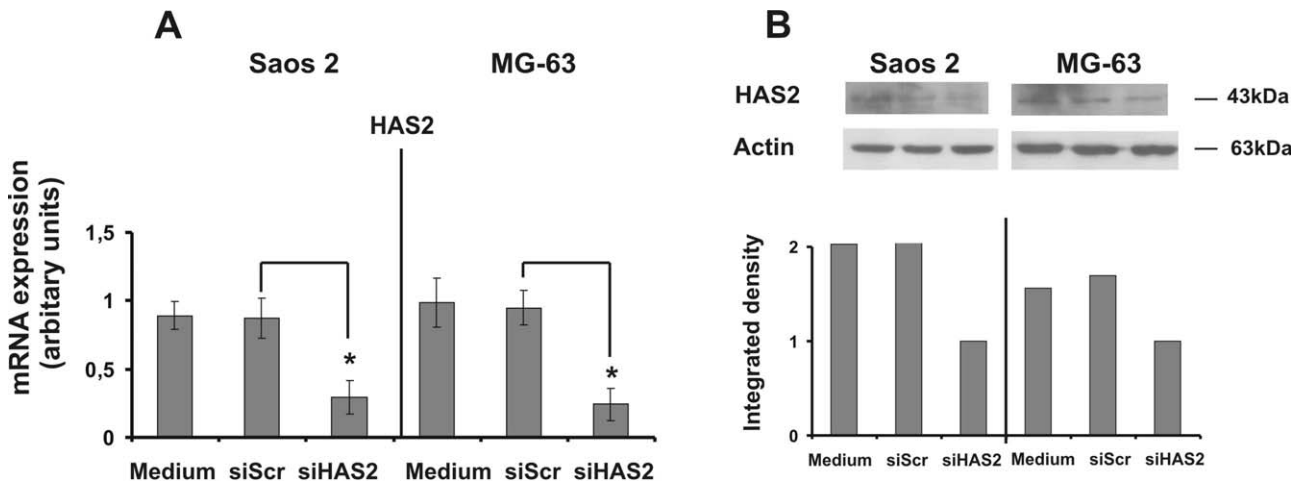
**Figure 5.** MG-63 cells were treated with (A) HA (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Healon), and (C) hyaluronidase (*Streptomyces hyalurolyticus*; 7 units/mL), whereas Saos 2 cells were treated with (B) HA (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Healon) up to the confluence (48 h). Cell layer was “scratched” with a 10  $\mu\text{L}$  sterile pipette tip and the “wound” surface area was measured at 0 and 24 h points. Cells grown in 0% serum free culture medium were utilized as control. The results were expressed as % of closure of wound surface area at 0-h time point (at 0-h time point, the wound surface area was 100%). (Means  $\pm$  SEM plotted;  $n = 3$ ). \*Depicts statistical significance:  $P < 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$  compared to 0% control cells (unpaired  $t$  test).

resulted in a significant decrease of their HAS2 mRNA expression (61 and 88%) and protein expression (66 and 74%), respectively (Figs. 6A and 6B).

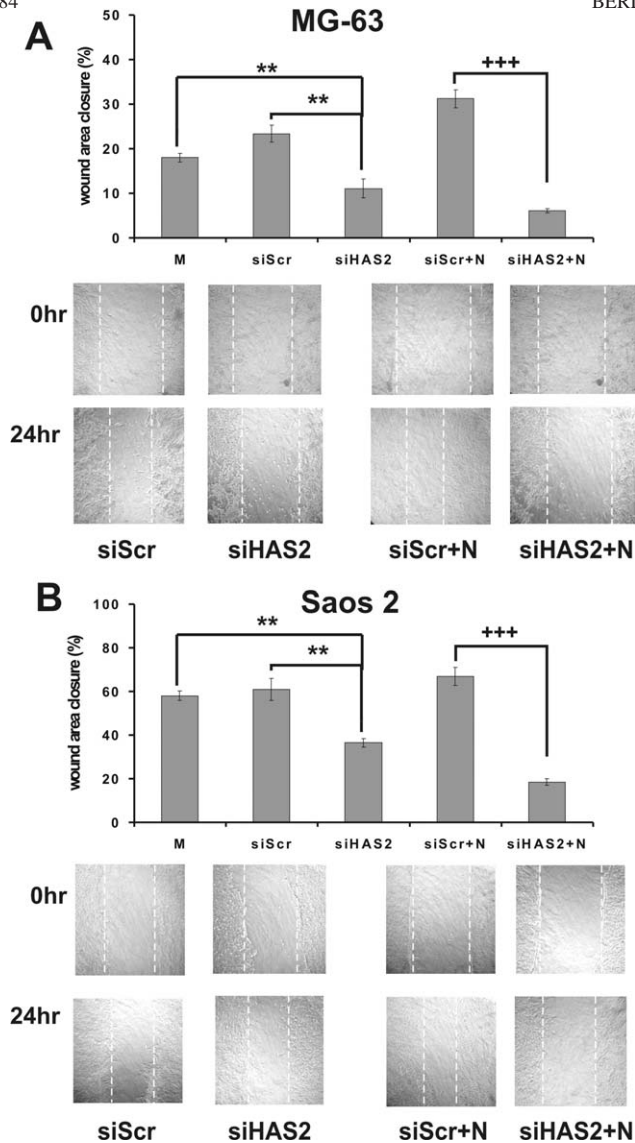
Thus, MG-63 HAS2-deficient cells (siHAS2) had significantly decreased the ability to migrate ( $P < 0.001$ ) as compared with both the control cells treated with scrambled siRNA (siScr) and untransfected cells (M) ( $P \geq 0.001$ ; Fig. 7A). Furthermore, when MG-63 siHAS2 transfected cells were intermittently treated with PTH (1–34), a strong reduction of their migration capacity was

observed as compared to transfected with nonspecific siScr cells treated with PTH (1–34) ( $P < 0.001$ ; Fig. 7A). Saos 2 cell motility was negatively affected with downregulation of their HAS2 expression (Fig. 7B) and continuous treatment with PTH (1–34) was not able to restore their basal level migration (Fig. 7B).

These results point to a key role of PTH (1–34) on osteosarcoma cell motility and suggest that PTH (1–34) by regulating HAS2 expression levels may modulate the migration capabilities of osteosarcoma cells.



**Figure 6.** Transfection of MG-63 and Saos 2 cells with HAS2 siRNA. MG-63, and Saos 2 cells were transfected with HAS2 short interfering RNA (siHAS2) that are utilizing scramble interfering RNA (siScr) as control. (A) Inhibition of HAS2 mRNA expression was verified by real-time PCR as compared with siScr control, 48 h after transfection. (Means  $\pm$  SEM plotted;  $n = 3$ ). \*Depicts statistical significance:  $P \leq 0.05$  compared with siScr control cells (unpaired  $t$  test). (B) Inhibition of HAS2 protein expression was verified by western blot analysis. Densitometric analysis of specific HAS2 protein bands as compared with actin showed agreement with real-time PCR.



**Figure 7.** Effect of HAS2 inhibition by siRNA on osteosarcoma cell migration. (A) The migration capacity of MG-63 siHAS2 transfected cells (siHAS2) was compared with untransfected cells (M) and transfected cells with nonspecific scrambled siRNA (siScr). Furthermore transfected cells were treated intermittently for two 24-h cycles with PTH (1–34) (siHAS2 + N) utilizing scrambled interfering RNA incubated with PTH as control (siScr + N). B: The migration capacity of Saos 2 siHAS2 transfected cells (siHAS2) was compared with untransfected cells (M) and transfected cells with nonspecific scrambled siRNA (siScr). In contrast to MG-63, Saos 2 siHAS2 transfected cells were treated continuously for 48 h with PTH (1–34) (siHAS2 + N) utilizing scrambled interfering RNA (siScr + N) as a control. The cell layer was “scratched” with a 10  $\mu$ L sterile pipette tip and the “wound” surface area was measured at the 0 and 24 h points. The results were expressed as % of closure of wound surface area at 0-h time point (at 0-h time point, the wound surface area was 100%). (Means  $\pm$  SEM plotted;  $n = 3$ ).  $**P \leq 0.01$  compared to control cells;  $***P \leq 0.01$  compared to control cells (unpaired  $t$  test).

## DISCUSSION

Contacts between the cells of the osteoblast lineage and surrounding ECM play a key role in the mechanisms that dictate cellular behavior (24). PTH, a powerful osteotropic agent, was established to have net anabolic effects on bone (2). In this study, we demonstrated for the first time that PTH (1–34)-induced changes in HA production modulate the migration capacity of osteosarcoma cells in a manner dependent on treatment and cell differentiation type.

Previously, PTH (1–84) has been reported to strongly stimulate HA production of both normal (15, 16) and carcinogenic cells (17) of the osteoblastic lineage. Likewise, it has been reported that PTH (1–34) stimulates HA synthesis in calvarial explants, periosteal rat osteoblasts, and osteoblast-like rat cell lines (16, 17) whereas, the effects of PTH (7–84) on osteoblastic cell HA metabolism have not been addressed so far. It is worthwhile to note that these previous reports had established a correlation between the effects of PTH (1–34) on osteoblastic lineage cell HA metabolism and differentiation status (16, 17). In the present study, the effects of PTH (1–34) on HA metabolism were strongly dependent on the administration mode and the differentiation of the osteosarcoma cells, in accordance with previous findings (16, 17). Thus, intermittent treatment with PTH (1–34) increased the synthesis of HA and its’ deposition in the pericellular matrix of MG-63 cells by stimulating their HAS2 expression. This increased content of endogenous HA correlated to a significant increase in MG-63 cell migration capacity. Treatment of these cells with exogenous high-molecular weight HA showed a similar increase in cell motility. Exogenous HA was recently reported to stimulate osteosarcoma cell migration in support of our data (18). In the present study and in agreement with previous (18), downregulation of HAS2 expression by siRNA inhibited MG-63 cell ability to migrate. The addition of PTH (1–34) to HAS2-deficient osteosarcoma cells did not stimulate their migration, suggesting that HAS2-synthesized HA participates in the PTH (1–34) effect. Interestingly, an *in vivo* study Lossdorfer et al. had demonstrated that the intermittent treatment with PTH (1–34) was correlated to an influx of osteoblast-like cells into the resorption lacunae (19). These recent data implied that PTH (1–34) through an unidentified mechanism(s) can influence osteoblastic lineage cell migration (19). Our results demonstrate that intermittent PTH (1–34) treatment stimulates osteosarcoma cell migration through a HA-dependent mechanism. Thus, these findings collectively propose that PTH (1–34) in addition to its well-established anabolic effect on bone may also regulate the capability of osteoblastic lineage cells to migrate. Furthermore, this regulatory effect of PTH (1–34) appears at least partly, to be correlated to HA metabolism. The effect was administration-type dependent as continuous administration of PTH (1–34) did not significantly affect neither HA metabolism nor MG-63 cell migration.

The well-differentiated nonmetastatic Saos 2 cells (20) showed a distinctly different response to intermittent and con-

tinuous treatment with PTH (1–34), which correlates well to earlier findings demonstrating that PTH effects depend on the *in vivo* location and differentiation status of the osteoblastic lineage cells (16, 25). Furthermore, PTH involvement in osteoblast differentiation is implicated (26). The intermittent administration mode did not affect Saos 2 cells, HAS isoforms, and HYAL expression and had no effect on their migration capacity, whereas the continuous treatment with PTH (1–34) significantly upregulated their HAS 1, 2 isoforms, and HYAL expression and was correlated to their modestly enhanced migration.

The last years have witnessed remarkable progress in understanding PTH physiology and in identifying various biological activities exhibited by different-sized PTH peptides. Thus, the accumulation of PTH (7–84) in renal failure may lead to PTH resistance by internalizing and downregulating PTH receptors without their activation, having an inhibiting net effect on PTH signaling (27). In this study PTH (7–84) treatment of both cell lines frequently exerts antagonistic effects on the regulation of genes related to HA metabolism as compared with PTH (1–34). These actions could be due to a non-PTH (1–34)-like effect on the PTH1R, since PTH (7–84) can bind to this receptor, inhibit the action of the N-terminally intact agonists, and induce internalization in some cells (27). Alternatively, signaling of the N-terminal truncated peptides through a novel putative PTH receptor with high affinity binding site for carboxyl terminal PTH peptides has been proposed (7).

In summary, our results demonstrate for the first time that PTH (1–34) and PTH (7–84) peptides discretely modulate the expression of genes involved in osteosarcoma HA metabolism and that this regulation was dependent on the administration mode and cell differentiation type. Importantly, the shown modulation of HA metabolism by PTH peptides was correlated to the migration capacity of osteosarcoma cells.

## REFERENCES

- Frolik, C. A., Black, E. C., Cain, R. L., Satterwhite, J. H., Brown-Augsburger, P. L., Sato, M., and Hock, J. M. (2003) Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1–34) are predicted by duration of hormone exposure. *Bone* **33**, 372–379.
- Datta, N. S., and Abou-Samra, A. B. (2009) PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal* **21**, 1245–1254.
- Lindsay, R., Zhou, H., Cosman, F., Nieves, J., Dempster, D. W., and Hodsman, A. B. (2007) Effects of a one-month treatment with PTH(1–34) on bone formation on cancellous, endocortical, and periosteal surfaces of the human ilium. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 495–502.
- Abou-Samra, B., Juppner, H., Force, T., Freeman, M. W., Kong, X. F., Schipani, E., Urena, P., Richards, J., Bonventre, J. V., and Potts, J. T. (1992) Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 2732–2736.
- Rey, A., Mannen, D., Rizzoli, R., Ferrari, S. L., and Caversasio, J. (2007) Evidences for a role of p38 MAP kinase in the stimulation of alkaline phosphatase and matrix mineralization induced by parathyroid hormone in osteoblastic cells. *Bone* **41**, 59–67.
- Friedman, P. A., and Goodman, W. G. (2006) PTH(1–84)/PTH(7–84): a balance of power. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **290**, F975–F984.
- Divieti, P., John, M. R., Juppner, H., and Bringhurst, F. R. (2002) Human PTH-(7–84) inhibits bone resorption *in vitro* via actions independent of the type 1 PTH/PTHrP receptor. *Endocrinology* **143**, 171–176.
- Goldberg, R. L., and Toole, B. P. (1984) Pericellular coat of chick embryo chondrocytes: structural role of hyaluronate. *J. Cell Biol.* **99**, 2114–2122.
- Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyachi, S., Spicer, A. P., McDonald, J. A., and Kimata, K. (1999) Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* **274**, 25085–25092.
- Csoka, B., Scherer, S. W., and Stern, R. (1999) Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics* **60**, 356–361.
- Girish, K. S., and Kemparaju, K. (2007) The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* **80**, 1921–1943.
- Stern, R., Asari, A. A., and Sugahara, K. N. (2006) Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 699–715.
- Berdiaki, A., Zafiroopoulos, A., Fthenou, E., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N. K., and Tzanakakis, G. N. (2008) Regulation of hyaluronan and versican deposition by growth factors in fibrosarcoma cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 194–202.
- Berdiaki, A., Nikitovic, D., Tsatsakis, A., Katonis, P., Karamanos, N. K., and Tzanakakis, G. N. (2009) bFGF induces changes in hyaluronan synthase and hyaluronidase isoform expression and modulates the migration capacity of fibrosarcoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 1258–1265.
- Luben, R. A., Goggins, J. F., and Raisz, L. G. (1974) Stimulation by parathyroid hormone of bone hyaluronate synthesis in organ culture. *Endocrinology* **94**, 737–745.
- Midura, R. J., Su, X., Morcuende, J. A., Tammi, M., and Tammi, R. (2003) Parathyroid hormone rapidly stimulates hyaluronan synthesis by periosteal osteoblasts in the tibial diaphysis of the growing rat. *J. Biol. Chem.* **278**, 51462–51468.
- Midura, R. J., Evanko, S. P., and Hascall, V. C. (1994) Parathyroid hormone stimulates hyaluronan synthesis in an osteoblast-like cell line. *J. Biol. Chem.* **269**, 13200–13206.
- Nishida, Y., Knudson, W., Knudson, C. B., and Ishiguro, N. (2005) Antisense inhibition of hyaluronan synthase-2 in human osteosarcoma cells inhibits hyaluronan retention and tumorigenicity. *Exp. Cell Res.* **307**, 194–203.
- Lossdorfer, S., Yildiz, F., Gotz, W., Kheralla, Y., and Jager, A. (2010) Anabolic effect of intermittent PTH(1–34) on the local microenvironment during the late phase of periodontal repair in a rat model of tooth root resorption. *Clin. Oral Investig.* **14**, 89–98.
- Benayahu, D., Shur, I., Meller, I., and Issakow, J. (1998) Cellular and molecular properties associated with osteosarcoma cells. *J. Cell Biochem.* **84**, 108–114.
- Jukkola, A., Risteli, L., Melkko, J., and Risteli, J. (1993) Procollagen synthesis and extracellular matrix deposition in MG-63 osteosarcoma cells. *J. Bone Miner. Res.* **8**, 651–657.
- Chalkiadaki, G., Nikitovic, D., Berdiaki, A., Sifaki, M., Krasagakis, K., Katonis, P., Karamanos, N. K., and Tzanakakis, G. N. (2009) Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1323–1331.
- Nikitovic, D., Tsatsakis, A. M., Karamanos, N. K., and Tzanakakis, G. N. (2003) The effects of genistein on the synthesis and distribution of glycosaminoglycans/proteoglycans by two osteosarcoma cell lines depends on tyrosine kinase and the estrogen receptor density. *Anti-cancer Res.* **23**, 459–464.

24. Nikitovic, D., Zafropoulos, A., Katonis, P., Tsatsakis, A., Theocharis, A. D., Karamanos, N. K., and Tzanakakis, G. N. (2006) Transforming growth factor-beta as a key molecule triggering the expression of versican isoforms v0 and v1, hyaluronan synthase-2 and synthesis of hyaluronan in malignant osteosarcoma cells. *IUBMB Life* **58**, 47–53.
25. Ogata, Y., Nakao, S., Kim, R. H., Li, J. J., Furuyama, S., Sugiya, H., and Sodek, J. (2000) Parathyroid hormone regulation of bone sialoprotein (BSP) gene transcription is mediated through a pituitary-specific transcription factor-1 (Pit-1) motif in the rat BSP promoter. *Matrix Biol.* **19**, 395–407.
26. de Freitas, P. H., Li, M., Ninomiya, T., Nakamura, M., Ubaidus, S., Oda, K., Udagawa, N., Maeda, T., Takagi, R., and Amizuka, N. (2009) Intermittent parathyroid hormone administration stimulates preosteoblastic proliferation without leading to enhanced bone formation in osteoclast-less *c-fos*( $-/-$ ) mice. *J. Bone Miner. Res.* **24**, 1586–1597.
27. Langub, M. C., Monier-Faugere, M. C., Wang, G., Williams, J. P., Koszewski, N. J., and Malluche, H. H. (2003) Administration of PTH-(7–84) antagonizes the effects of PTH-(1–84) on bone in rats with moderate renal failure. *Endocrinology* **144**, 1135–1138.



# Parathyroid hormone affects the fibroblast growth factor–proteoglycan signaling axis to regulate osteosarcoma cell migration

Georgios A. Datsis<sup>1</sup>, Aikaterini Berdiaki<sup>1</sup>, Dragana Nikitovic<sup>1</sup>, Maria Mytilineou<sup>1</sup>, Pavlos Katonis<sup>2</sup>, Nikos K. Karamanos<sup>3</sup> and George N. Tzanakakis<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Histology–Embryology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

<sup>2</sup> Department of Orthopedics, University Hospital of Heraklion, Heraklion, Greece

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Laboratory of Biochemistry, University of Patras, Greece

## Keywords

biglycan; fibroblast growth factor-2 (FGF-2); osteosarcoma cell migration; parathyroid hormone (1–34) [PTH(1–34)]; SLRP

## Correspondence

G. N. Tzanakakis, Department of Histology–Embryology, Medical School, University of Crete, 71110 Heraklion, Greece  
Fax +30 2810 394786  
Tel: +30 2810 394719  
E-mail: tzanakak@med.uoc.gr

(Received 4 May 2011, revised 14 July 2011, accepted 8 August 2011)

doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08300.x

Parathyroid hormone (PTH)(1–34), which has been established to have a dual effect on bone metabolism, was recently found to regulate osteosarcoma cell migration. A significant part of the bone anabolic action of PTH(1–34) is attributed to fibroblast growth factor (FGF)-2 stimulation. Furthermore, it was recently suggested that the FGF–proteoglycan axis may form an extracellular matrix-related regulatory feedback loop that controls osteoblastic lineage cell proliferation and execution of the osteogenic program. In this study, we investigated the possible participation of FGF-2 signaling in PTH(1–34)-dependent osteosarcoma cell migration. FGF-2 treatment of osteosarcoma cells resulted in a significant increase ( $P \leq 0.01$ ) in MG63 cell migration, similar to that caused by PTH(1–34). mRNA expression analysis of cells treated with PTH(1–34) showed a strong increase in FGF-2 transcript levels ( $P = 0.0015$ ). Interestingly, the addition of FGF-2 to MG63 cells led to significant downregulation of small leucine-rich proteoglycan biglycan expression at both the mRNA ( $P \leq 0.0001$ ) and protein (60%) levels. In order to examine the significance of biglycan on MG63 cell migration, transfection with short interfering RNA specific for biglycan was performed, resulting in a significant increase ( $P \leq 0.01$ ) in the migration capacity of biglycan-deficient MG63 cells. In contrast, exogenous human recombinant biglycan strongly inhibited the migration of these cells ( $P \leq 0.01$ ). Finally, a direct correlation between PTH(1–34) action and biglycan expression was established by the finding of a significant decrease ( $P \leq 0.01$ ) in biglycan transcript levels in PTH(1–34)-treated cells. To summarize, the present study demonstrates a novel cooperative mechanism of PTH(1–34) and FGF-2 action that results in specific alteration of the biglycan extracellular matrix content to regulate osteosarcoma cell migration.

## Introduction

Human parathyroid hormone (PTH) is secreted as an 84-residue peptide, PTH(1–84), by the parathyroid glands in response to a hypocalcemic stimulus.

PTH(1–34) exerts both anabolic and catabolic action on bone formation, depending on the method of administration. The anabolic effects require transient

## Abbreviations

ECM, extracellular matrix; FGF, fibroblast growth factor; FGFR, fibroblast growth factor receptor; NS, not significant; PTH, parathyroid hormone; siBGN, short interfering RNA specific for the biglycan gene; siScr, short interfering scrambled RNA; siRNA, short interfering RNA; SLRP, small leucine-rich proteoglycans.

exposure to PTH(1–34), whereas catabolic actions are observed upon continuous exposure to PTH(1–34). Bone mass increase is observed in both animals and humans upon PTH(1–34) administration by daily subcutaneous injection [1–3]. The anabolic effect of PTH(1–34) is partly dependent on its ability to modulate fibroblast growth factor (FGF)-2 expression, in turn regulating FGF-2-signaling pathways [4,5]. Specifically, endogenous FGF-2 is important in PTH effects on osteoblast proliferation, differentiation, and apoptosis [6].

FGF-2 has previously been established as a potent modulator of bone cell function [7,8]. In bone tissue, FGF-2 transcripts have been detected in mesenchymal cells and osteoblasts. These cells secrete FGF-2 to the extracellular matrix (ECM), where it acts as a local regulator of bone remodeling [8,9]. *In vitro* studies have demonstrated that continuous treatment with FGF-2 stimulates bone cell replication [9] and reduces the levels of differentiation-related markers, including alkaline phosphatase [10], and PTH(1–34)-responsive adenylate cyclase activity [11]. In long bone marrow stromal cells, FGF-2 promotes cell growth, which results in osteoblast differentiation and matrix mineralization [12,13]. Furthermore, the essential role of FGF-2 signaling in bone growth has been demonstrated in FGF knockout (FGF-2<sup>-/-</sup>) mice, which show significantly decreased bone mass and bone formation [14]. The effect of FGF-2 on bone cell migration has not been examined previously.

FGF-2 acts via its respective high-affinity tyrosine kinase receptors [FGF receptors (FGFRs)] [15,16] to regulate crucial biological processes during embryonic development and homeostasis of body tissues. It is worth noting that impaired FGF-2 signaling is deleterious for skeletal morphogenesis [17]. Furthermore, numerous studies have shown that mutations in FGFRs are correlated with various pathological conditions in humans, including osteosarcoma [18]. Although *in vivo* and *in vitro* studies have established an essential role for FGF-2 and PTH(1–34) in bone formation, the synergistic mechanism of FGF-2 and PTH(1–34) action on bone metabolism and pathological conditions has not been fully elucidated.

We have previously demonstrated that PTH(1–34) regulates osteosarcoma cell migration, at least partly through the modulation of hyaluronan metabolism. In this study, we focused on the possible participation of FGF-2-signaling in PTH(1–34)-dependent osteosarcoma cell migration. Our data demonstrate that PTH(1–34) upregulates MG63 cell migration through the enhancement of FGF-2 stimulation, which is correlated with alterations in ECM content.

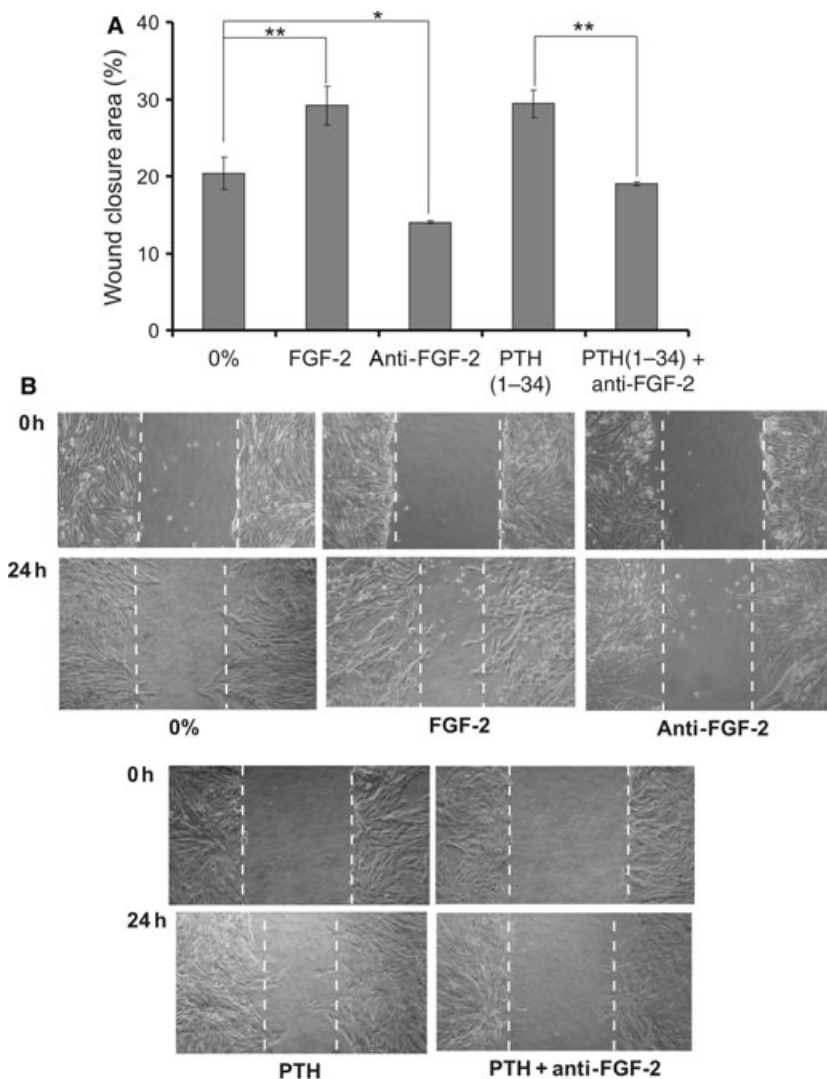
## Results

### Effect of FGF-2 on osteosarcoma cell migration – participation of PTH(1–34)

FGF-2 has previously been shown to affect osteoblast progenitor proliferation and apoptosis rates in a manner that is synergistic with PTH(1–34) action [4]. Our recent study demonstrated that PTH(1–34) modulates osteosarcoma cell migration [19]. In view of the fact that PTH(1–34) and FGF-2 signaling collaborate to regulate bone cell growth, we hypothesized that FGF-2 might also participate in PTH(1–34)-dependent osteosarcoma cell migration. Highly aggressive MG63 human osteosarcoma cells were used as a model system, and a ‘wound healing’ assay was utilized to evaluate the possible effect of FGF-2 on the ability of osteosarcoma cells to migrate. Cells treated with FGF-2 exhibited strong upregulation of migration, as compared with control cells ( $P \leq 0.01$ ) (Fig. 1). Neutralization of endogenous FGF-2 with the addition of an antibody specific for FGF-2 resulted in significant downregulation of MG63 cell migration ( $P \leq 0.05$ ). The effect of exogenous FGF-2 treatment on osteosarcoma cell migration was eliminated by the administration of a specific antibody against FGF-2 [ $P$  not significant (NS)] (Fig. 1A), thus confirming the stimulatory effect of FGF-2 signaling on these cells’ motility. In control experiments, intermittent administration of PTH(1–34) (for 6 h in each 24-h period) for two cycles significantly enhanced the motility of MG63 cells ( $P \leq 0.01$ ), as previously shown [19]. Importantly, the combination of PTH(1–34) and antibody against FGF-2 significantly reduced PTH(1–34)-dependent MG63 cell migration [ $P \leq 0.01$  between PTH(1–34) and PTH(1–34)/anti-FGF-2 IgG treatments], demonstrating that FGF-2 participates in PTH(1–34)-dependent osteosarcoma cell migration (Fig. 1).

### Effect of PTH(1–34) on FGF-2 expression

PTH(1–34) has previously been demonstrated to rapidly increase the levels of FGF-2 transcripts in cultured murine osteoblastic cells [4]. Therefore, we investigated the effects of intermittent PTH(1–34) treatment on FGF-2 mRNA expression in human osteosarcoma cells. Real-time PCR analysis demonstrated that MG63 cells express FGF-2 at the mRNA level. Furthermore, a 6-h treatment with PTH(1–34) significantly elevated ( $P = 0.0015$ ) FGF-2 expression in MG63 cells (Fig. 2). These results demonstrate a direct interaction between the PTH(1–34) and FGF-2 signaling pathways in human osteosarcoma cells. In control



**Fig. 1.** Effect of FGF-2 on osteosarcoma cell migration – participation of PTH(1–34). MG63 cells were treated with FGF-2 ( $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and anti-FGF-2 IgG ( $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) up to confluence (48 h), or treated with PTH(1–34) (50 nM) and PTH(1–34) (50 nM)/anti-FGF-2 IgG ( $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) intermittently (for the first 6 h in each 24-h period) for two cycles up to confluence (48 h). The cell layer was scratched with a  $10\text{-}\mu\text{L}$  sterile pipette tip, and the wound surface area was measured at 0 h and 24 h. Cells grown in 0% serum-free culture medium were utilized as a control. (A) The results are expressed as percentage of closure of the wound surface area at 0 h (at 0 h, the wound surface area was 100%). Means  $\pm$  standard errors of the mean;  $n = 3$ . \* $P \leq 0.05$  and \*\* $P \leq 0.01$  as compared with 0% control cells (unpaired *t*-test). (B) Representative photographs of wound closure of control and treated cells at 0 h and 24 h are presented.

experiments, MG63 cells were found to express FGFR1, FGFR2, FGFR3, and FGFR4 (Table 1).

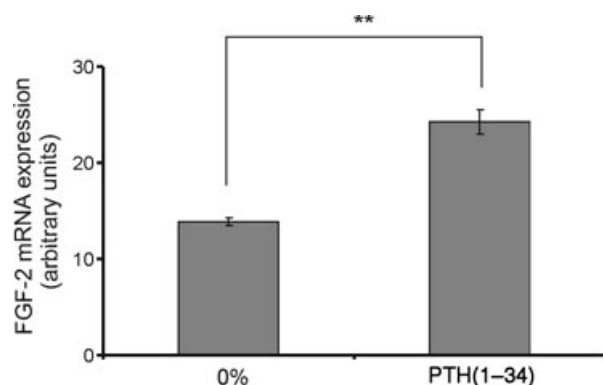
### Effect of FGF-2 on biglycan expression

The correlation of FGF-2 signaling with alterations of the ECM components has been established in osteoblastic lineage cells [20,21]. Thus, we performed screening for mRNA expression in MG63 cells treated with FGF-2 for different ECM molecules. Interestingly, real-time PCR revealed a significant reduction in biglycan transcript levels ( $P \leq 0.0001$ ), biglycan being one of the major ECM components in cells of the osteoblastic lineage (Fig. 3A). The downregulation of mRNA expression was followed by a marked decrease (60%) in secreted glycosylated biglycan protein expression and in intracellular biglycan protein

core expression (50%) as compared with the respective controls, secreted and intracellular biglycan protein (Fig. 3B). The existence of two biglycan pools correlates well with previous studies showing that, upon glycosylation, biglycan is speedily secreted to the ECM; in bone tissue, it is one of the main ECM components [22].

### Biglycan mRNA levels were efficiently downregulated following transfection with short interfering RNA (siRNA)

As biglycan has previously been shown to modulate different biological functions of osteoblastic cells [23,24], we hypothesized that FGF-2 affects the migration of MG63 cells in a biglycan-dependent manner. In order to test our hypothesis, we applied siRNA



**Fig. 2.** Effect of PTH(1–34) on FGF-2 expression. MG63 human osteosarcoma cells were treated with PTH(1–34) (50 nM) for 6 h, and their FGF-2 mRNA expression was determined by real-time PCR. The results represent the average of three separate experiments performed in triplicate. Means  $\pm$  standard errors of the mean;  $n = 9$ .  $**P \leq 0.01$  as compared with 0% control cells (unpaired *t*-test).

**Table 1.** Profile of FGFR expression.

FGFR1	+++
FGFR2	+
FGFR3	++
FGFR4	+

technology. MG63 cells were transfected with siRNA specific for the biglycan gene (siBGN). Real-time PCR analysis demonstrated a decrease in biglycan mRNA levels (69%) at 72 h ( $P \leq 0.001$ ) (Fig. 4A) as compared with control, short interfering scrambled RNA (siScr)-transfected cells. The decrease in biglycan transcript levels was followed by significant downregulation (55%) of biglycan protein secretion at 72 h, as shown by western blot analysis (Fig. 4B).

### Biglycan participation is essential for FGF-2-induced MG63 cell migration

The inhibition of biglycan synthesis following treatment of MG63 cells with siBGN resulted in significantly increased migration relative to cells treated with siScr ( $P \leq 0.01$ ) (Fig. 5), as determined by utilization of the wound healing assay. In contrast, no difference in migration ability was observed between siScr-treated and wild-type osteosarcoma cells (Fig. 5). These results suggest that secreted endogenous biglycan has a suppressive effect on the migratory abilities of MG63 osteosarcoma cells. To exclude the possible contribution of altered growth to the biglycan-dependent

migration, MG63 cells were transfected with siBGN and siScr, and their growth rate was evaluated after 48 h with a proliferation assay. Biglycan-deficient MG63 cells did not show altered growth rates as compared with control siScr cells ( $P = \text{NS}$ ), as shown in Fig. S1.

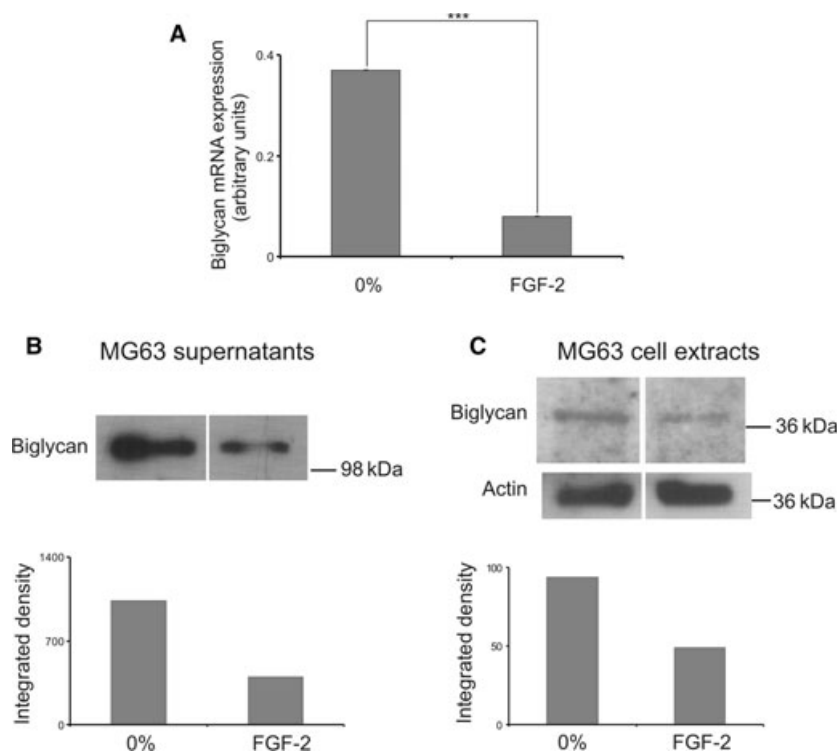
In order to correlate the effect of FGF-2 on osteosarcoma migration with its downregulation of biglycan expression, we assessed the migratory abilities of biglycan-deficient cells whose FGF-2 signaling had been blocked by a specific FGF-2-neutralizing antibody. The addition of antibody against FGF-2 to biglycan-deficient cells (siBGN/anti-FGF-2 IgG) caused an increase in osteosarcoma cell migration ( $P \leq 0.001$ ), similar to that caused by the suppression of biglycan expression ( $P = \text{NS}$  between siBGN-treated and siBGN/anti-FGF-2 IgG-treated cells) (Fig. 5). On the other hand, biglycan-deficient MG63 cells treated with anti-FGF-2 IgG showed a strong increase in migration as compared with siScr cells treated with FGF-2 ( $P \leq 0.001$ ). These data demonstrate that FGF-2 enhances MG63 cell migration through modulation of biglycan expression.

### Exogenous biglycan inhibits osteosarcoma cell migration

To examine the effect of increased biglycan concentration on MG63 cell migration, recombinant human biglycan was utilized. MG63 cells were treated for 48 h with recombinant human biglycan (5 and 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively), and their ability to migrate was evaluated. Treatment with exogenous biglycan strongly inhibited the migratory ability of these cells ( $P \leq 0.01$ ) in a concentration-dependent manner, as shown in Fig. 6. These experiments verify the regulatory role of biglycan in osteosarcoma cell motility.

### Effect of PTH(1–34) on biglycan expression

To examine the putative participation of biglycan in PTH(1–34)-dependent osteosarcoma cell migration, we examined biglycan expression in PTH(1–34)-treated cells. Real-time PCR analysis revealed that the mRNA expression levels of biglycan were significantly lower in PTH(1–34)-treated cells than in control cells ( $P \leq 0.05$ ) (Fig. 7). Treatment with anti-FGF-2 IgG in the presence of PTH(1–34) almost completely abolished the effect of the peptide on biglycan expression ( $P = \text{NS}$ ) (Fig. 7). These data show that PTH(1–34) and FGF-2 signaling collaborate in a manner that is dependent on biglycan expression to modulate osteosarcoma cell migration.



**Fig. 3.** Effect of FGF-2 on biglycan expression. (A) MG63 cells were treated with FGF-2 ( $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) for 48 h, and their biglycan mRNA expression was determined by real-time PCR. The results represent the average of three separate experiments performed in triplicate. Means  $\pm$  standard errors of the mean;  $n = 9$ . \*\*\* $P \leq 0.0001$  as compared with 0% control cells (unpaired  $t$ -test). (B) FGF-2-treated and control cell culture media (0%) were collected and concentrated, and protein was blotted against biglycan, with a specific antibody. The results represent the average of three separate experiments. Representative blots are presented. Specific biglycan protein bands were densitometrically analyzed and plotted. (C) FGF-2-treated and control-treated (0%) cell extracts were blotted against biglycan, with a specific antibody. Specific biglycan protein bands were densitometrically analyzed and adjusted against actin. The results represent the average of three separate experiments. Means  $\pm$  standard errors of the mean;  $n = 3$ .

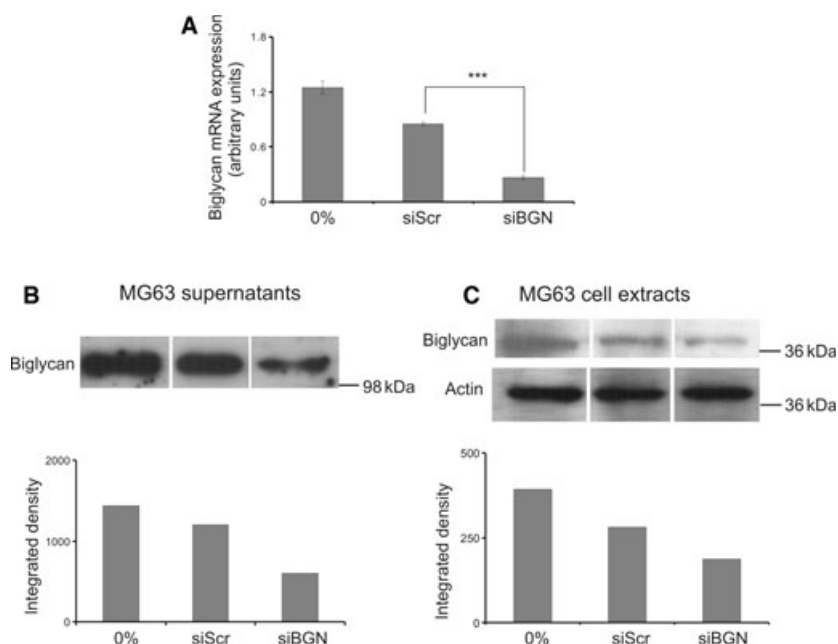
## Discussion

PTH(1–34) was recently demonstrated to modulate the expression of genes involved in osteosarcoma hyaluronan metabolism in a manner correlated with osteosarcoma cell migration capacity. In the present study, we show the existence of a parallel PTH(1–34)/FGF-2-dependent mechanism that enhances osteosarcoma cell migration.

Previous *in vivo* and *in vitro* studies have shown that FGF-2 regulates osteoblast proliferation, differentiation, and apoptosis, thus stimulating bone formation [1,5]. On the other hand, the effect of FGF-2 on the migration abilities of osteoblastic cells has not, to our knowledge, been established. MG63 cells have been shown to secrete FGF-2 and express the respective FGFRs, thus exhibiting an autocrine mode of action [21]. The neutralization of endogenous FGF-2 significantly inhibited MG63 osteosarcoma cell migration, whereas exogenous FGF-2 strongly enhanced these

cells' motility, thus confirming the existence of an autocrine FGF-2-dependent loop in the regulation of MG63 cell migration. Furthermore, in this study, intermittent treatment with PTH(1–34) caused strong upregulation of FGF-2 transcripts. These results: (a) show novel regulation of osteosarcoma cell migration by FGF-2 action; and (b) suggest the existence of a cooperative mechanism between PTH(1–34) and FGF-2 signaling to regulate osteosarcoma cell migration.

The anabolic effect of PTH(1–34) on bone formation is partly dependent on fluctuations in FGF-2 expression, which modulate the expression and nuclear accumulation of transcription factors, including, Runx-2 and CREBs, that are crucial in the process of osteoblast proliferation and maturation [6]. Importantly, upon stimulation with FGF-2, Runx2 regulates the expression of genes related to proteoglycan-mediated signaling, including those encoding FGFRs (e.g. FGFR2 and FGFR3) and proteoglycans (e.g. syndecans, glypicans, and versican) and enzymes implicated in proteoglycan



**Fig. 4.** Biglycan mRNA levels were efficiently downregulated following transfection with siRNA. (A) MG63 cells were transfected with siBGN, with siScr as control. Inhibition of biglycan mRNA expression was verified by real-time PCR as compared with siScr control, and expressed as arbitrary units at 72 h. The results represent the average of three separate experiments performed in triplicate, and are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean.  $***P \leq 0.001$  as compared with control. (B) Culture medium of siBGN-transfected and siScr-transfected cells was probed with the specific biglycan antibody. Representative blots are presented. Specific biglycan protein bands were densitometrically analyzed and plotted. (C) Cell extracts of siBGN-transfected and siScr-transfected cells were probed with the specific biglycan antibody. Specific biglycan protein bands were densitometrically analyzed and adjusted against actin. The results represent the average of three separate experiments.

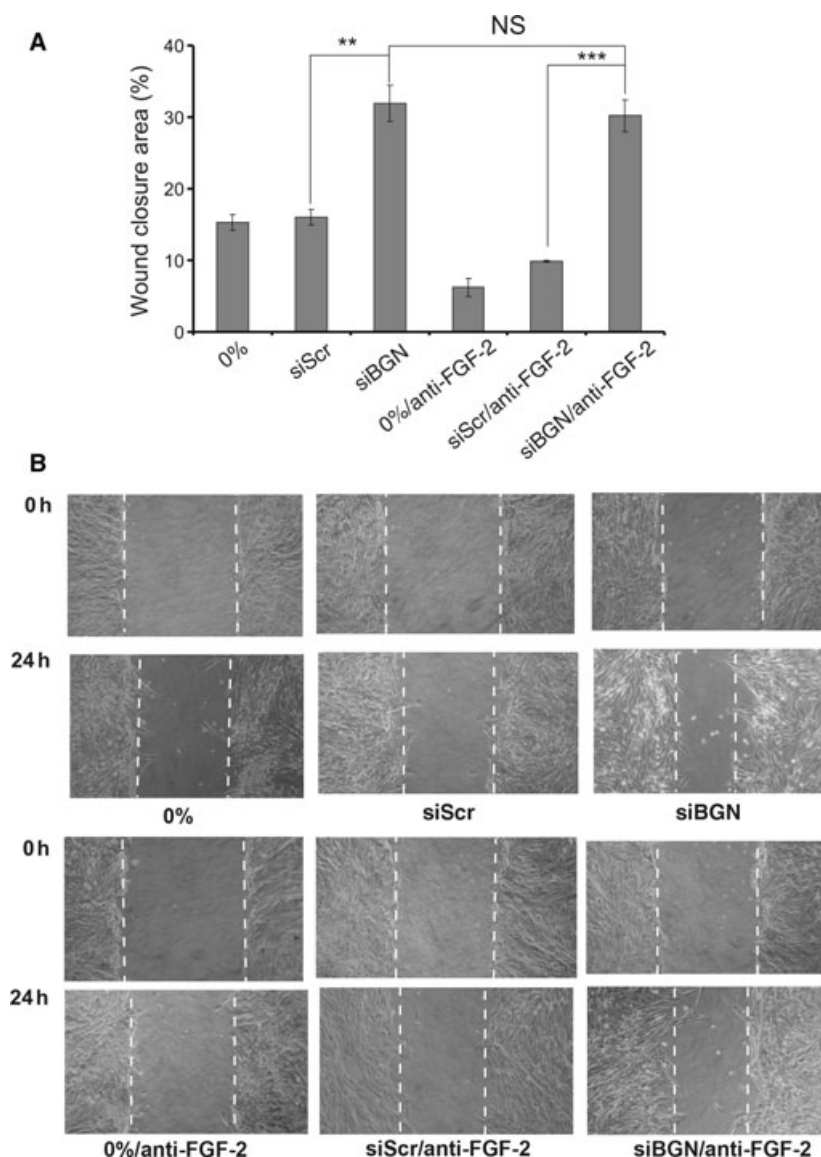
synthesis [20]. Furthermore, it was recently suggested that Runx2 and the FGF-2–proteoglycan axis may form an ECM-related regulatory feedback loop that controls osteoblastic lineage cell proliferation and execution of the osteogenic program [20].

We therefore hypothesized that FGF-2 modulates osteosarcoma migration in part via regulating the expression of ECM-associated proteoglycans. Screening of ECM proteoglycan expression in FGF-2-treated MG63 cells demonstrated, interestingly, strong downregulation of biglycan transcript and protein expression. Previously, however, FGF-2 was found not to affect MG63 cell biglycan transcript levels. These contradictory data could possibly be attributed to the higher concentration of FGF-2 previously applied or to the presence of serum in the culture media [21]. Biglycan, a member of the small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family and a biologically active component of the ECM [25], is a major proteoglycan found in bone [22].

The crucial role of biglycan in bone formation was previously demonstrated by the generation of biglycan knockout (*bgn*<sup>-/-</sup>) mice, which fail to achieve peak bone mass, owing to a decrease in osteoblast numbers

and lower osteoblast anabolic activity [26]. Furthermore, the phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergistic with deficiency of the other main bone SLRP, decorin, and mimic Ehlers–Danlos-like changes in bone and other connective tissues [27]. To test the assumption that an FGF-2-dependent decrease in biglycan expression enhances MG63 cell migration we generated biglycan-deficient cells. The downregulation of biglycan expression was found to increase osteosarcoma cell migration, revealing a previously unknown role of biglycan. Furthermore, siBGN-transfected MG63 cells retained an enhanced ability to migrate, as compared with siScr-transfected cells, upon neutralization of endogenous FGF-2 by a specific antibody against FGF-2. PTH(1–34)-treated osteosarcoma cells showed decreased biglycan transcript and protein expression, confirming PTH(1–34)–FGF-2–biglycan lineage signaling. Therefore, one can conclude that PTH(1–34)-modulated and FGF-2-dependent downregulation of biglycan expression is sufficient to enhance osteosarcoma cell migration.

Biglycan interacts with a wide range of growth factors and cytokines, including transforming growth

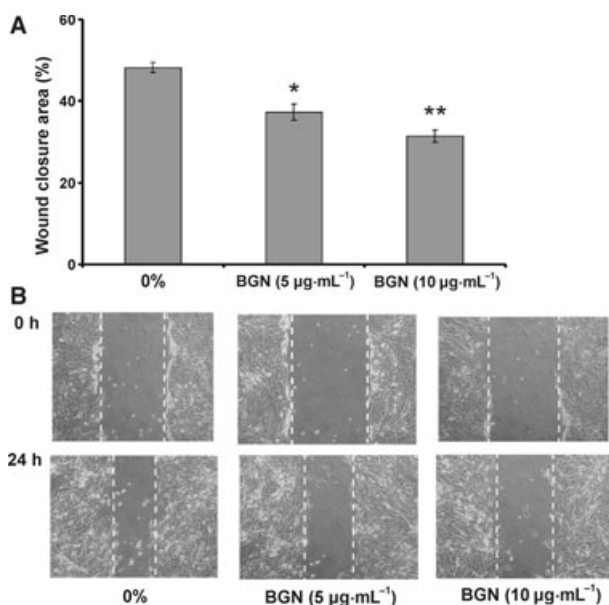


**Fig. 5.** Biglycan participation is essential for FGF-2-induced MG63 cell migration. Seventy-two hours after transfection, siBGN-transfected cells, siScr-transfected cells, siBGN-transfected cells treated with anti-FGF-2 IgG, siScr-transfected cells treated with anti-FGF-2 IgG and control cell layers were scratched with a 10- $\mu$ L sterile pipette tip, and the wound surface area was measured at 0 h and 24 h. Cells grown in 0% serum-free culture medium were utilized as a control. (A) The results were expressed as percentage of closure of the wound surface area at 0 h (at 0 h, the wound surface area was 100%). Means  $\pm$  standard errors of the mean;  $n = 3$ .  $**P \leq 0.01$  between siBGN-treated and siScr-treated cells;  $***P \leq 0.001$  between siBGN/anti-FGF-2 IgG-treated and siScr/anti-FGF-2 IgG-treated cells; NS, difference not significant between siBGN-treated and siBGN/anti-FGF-2 IgG-treated cells (unpaired  $t$ -test). (B) Representative photographs of wound closure of control and treated cells at 0 h and 24 h are presented.

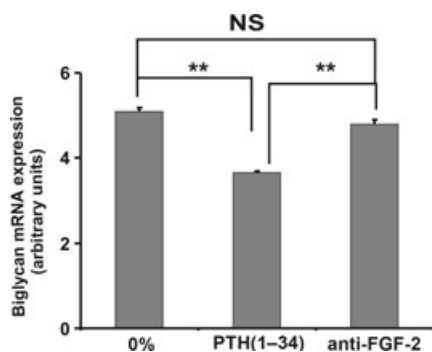
factor- $\beta$ , transforming growth factor- $\alpha$  [26], tumor necrosis factor- $\alpha$  [28], epidermal growth factor [29], bone morphogenetic protein-4 [30], and bone morphogenetic protein-2 [31], as well as their respective cell surface receptors, to modulate key cellular activities [28,29]. This SLRP, in contrast to the majority of other SLRPs, is mostly distributed to the pericellular matrix, where it acts as a specific modulator of growth

factor bioavailability, and thus affects growth factor biological activity [29]. Through these interactions, biglycan is proposed to influence, both directly and indirectly, cellular proliferation, migration, and cellular phenotype [30].

At this point, it is still unclear how biglycan inhibits osteosarcoma cell migration. Changes in the expression of biglycan may affect ECM assembly, cellular adhe-



**Fig. 6.** Effect of biglycan on osteosarcoma cell migration. MG63 cells were treated continuously for 48 h with biglycan (BGN; 5 and 10 µg·mL<sup>-1</sup>) up to confluence. The cell layer was scratched with a 10-µL sterile pipette tip, and the wound surface area was measured at 0 h and 24 h. Cells grown in 0% serum-free culture medium were utilized as a control. (A) The results are expressed as percentage of closure of the wound surface area at 0 h (at 0 h, the wound surface area was 100%). Means ± standard errors of the mean;  $n = 3$ . \* $P \leq 0.05$  and \*\* $P \leq 0.01$  as compared with 0% control cells (unpaired  $t$ -test). (B) Representative photographs of wound closure of control and treated cells at 0 h and 24 h are presented.



**Fig. 7.** Effect of PTH(1–34) on biglycan expression. MG63 cells were treated with PTH(1–34) (50 nM) for 6 h or PTH(1–34) for 6 h and anti-FGF-2 IgG for 24 h, and their biglycan mRNA expression at 24 h was determined by real-time PCR. The results represent the average of three separate experiments performed in triplicate. Means ± standard errors of the mean;  $n = 9$ . NS = not significant and \*\* $P \leq 0.01$  as compared with 0% control cells (unpaired  $t$ -test).

sion, or the growth factor utilization that is critical for cell migration [31]. One can speculate that the PTH(1–34)–FGF-2 axis, by causing strong downregulation

of biglycan expression, dramatically changes the ratio among the SLRP members, resulting in altered bioavailability of growth factors involved in osteosarcoma cell migration. The key role of SLRPs in regulating growth factor activities in the osteosarcoma model has previously been demonstrated for other SLRP members, including lumican [32] and decorin [33].

To summarize, the present study demonstrates a novel mechanism of PTH(1–34) and FGF-2 action that results in specific alterations of ECM content to regulate osteosarcoma cell migration.

## Experimental procedures

### Materials

Recombinant human PTH(1–34) and FGF-2 were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). The primary antibodies used, anti-biglycan IgG (mouse monoclonal MAB2667) and anti-actin IgG (goat polyclonal sc-1616), were purchased from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). Recombinant human biglycan (2667-CM) was obtained from R&D (Minneapolis, MN, USA). Cell culture reagents were obtained from Biosera (Ringer, UK), unless stated otherwise.

### Cell culture

In this study, the MG63 human osteosarcoma cell line of moderately differentiated fibroblastoid type and high metastatic capacity was utilized. Cells were grown in DMEM (Biochrom KG, Berlin, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biosera). Before FGF-2, anti-FGF-2 IgG, biglycan and PTH(1–34) addition, cells were cultured in serum-free medium for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Administration of PTH(1–34) was intermittent, being performed in serum-free medium for 6 h in each 24-h period, for two cycles.

### RNA isolation and real-time PCR

In order to isolate total ribonucleic acid we used the TRIzol reagent (Gibco, Carlsbad, CA, USA) method, according to the manufacturer's instructions. One microgram of total RNA was added for cDNA synthesis with the TAKARA (Otsu, Shiga, Japan) RT cDNA synthesis kit. For semiquantification of the genes of interest, we used the DyNAmo SYBR Green 2-step qRT-PCR Kit (Finnzymes, Keilaranta, Finland) in a total volume of 20 µL, performing real-time PCR reactions in an Mx300P cyler. The primers used are shown in Table 2. Standard curves were obtained in each optimized assay, producing a linear plot of threshold cycle ( $C_t$ ) against log (dilution). The amount of each target was quantified on the basis of the concentration of the standard curve, and presented as arbitrary units. The quantity of each



**Table 2.** Sequence of primers for the genes of interest.

Primer name	Sequence (5' to 3')
GAPDH_F	GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA
GAPDH_R	GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CAC T
FGF2_F	GAA GAG CGA CCC TCA CAT CAA G
FGF2_R	CTG CCC AGT TCG TTT CAG TG
FGFR1_F	ACA ACC TGC CTT ATG TCC AGA TC
FGFR1_R	TGC GTC CTC AAA GGA GAC ATT
FGFR2_F	GGT CAC CAT GGC AAC CTT GT
FGFR2_R	TCT GGT TGA GAG ATT TGG TAT TTG G
FGFR3_F	GGG CAA TTC TAT TGG GTT TTC TC
FGFR3_R	GAA GCC CAC CCC GTA GCT
FGFR4_F	TCA TCA ACG GCA GCA GCT T
FGFR4_R	CAG GAC CTC CAC CTC TGA GCT A
Biglycan_F	TCT GAA GTC TGT GCC CAA
Biglycan_R	TCT GAG ATG CGC AGG TA

target was normalized against the quantity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

### Western blot

Total protein secreted into the serum-free culture medium was concentrated with Vivaspin 20-mL centrifugal concentrator tubes to a volume of 500  $\mu$ L, and harvested cells were lysed with RIPA solution. Equal amounts of protein, either cell extracts or secreted, were subjected to SDS/PAGE with 8% polyacrylamide gels under reducing conditions. Separated protein bands were transferred to nitrocellulose membranes in 10 mM Caps (pH 11) containing 10% methanol. Membranes were blocked overnight at 4 °C with NaCl/P<sub>i</sub> containing 0.1% Tween-20 (NaCl/P<sub>i</sub>-T) and 5% (w/v) low-fat milk powder. The membranes were incubated for 2 h at room temperature with primary antibody (1 : 250) in NaCl/P<sub>i</sub>-T and 1% (w/v) low-fat milk powder. The immune complexes were detected after incubation with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody diluted (1 : 2500) in NaCl/P<sub>i</sub>-T and 2% low-fat milk, with the SuperSignalWest Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, Logan, UT, USA), according to the manufacturer's instructions.

### Transfection with siRNA

For transfection experiments, the cells were plated in serum-free and antibiotic-free medium in 24-well plates for 24 h. siRNA specific for biglycan (siBGN) and an RNAi negative control (siScr) were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). To provide optimal transfection, siRNA and Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were diluted in Opti-MEM<sup>a</sup> I Reduced Serum Medium (Invitrogen). After 5 min of incubation, diluted Lipofectamin 2000 (1  $\mu$ L per 50  $\mu$ L of medium) was mixed with diluted siRNA (100 pmol per 50  $\mu$ L of medium) in

35-mm dishes for 20 min at room temperature to allow siRNA–liposome complexes to form, and added to cell layers. Transfection was allowed to take place for 6 h, after which the medium was replaced with fresh medium containing antibiotics and the incubation was continued for 48 h. Cells were then harvested and RNA was extracted. When necessary, treatments were performed for 24 h after the initial 48-h transfection period. All transfection experiments were repeated at least three times and performed in triplicate.

### Wound healing assay

The established method of assessing cell motility, called the wound healing assay, was performed as previously described [34]. Briefly, MG63 cells were seeded in 24-well culture plates at a concentration of  $6 \times 10^5$  cells per well. The optimal concentration for plating was selected so that the cells would be confluent after 72 h of culture at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After serum starvation for 24 h, the respective treatments were applied [PTH(1–34), 50 nM; FGF-2, 10 ng·mL<sup>-1</sup>; anti-FGF-2 IgG, 1  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>; biglycan, 5 and 10  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>], either intermittently (for 6 h in each 24-h period) for two cycles or continuously for 48 h, whereupon the cell layer was wounded by scratching with a sterile 10- $\mu$ L pipette tip. Detached cells were removed by washing the cell layer twice with serum-free medium. The wound closure was monitored at 0 and 24 h. The experiment was also performed with cells transfected with siBGN or siScr. Forty-eight hours after transfection, the wound healing assay was performed as described above. The wound closure was monitored with a digital image processor connected to a microscope, at six different positions across the wound. Cell motility was quantified by imageJ analysis (IMAGEJ 1.4.3.67 LAUNCHER SYMMETRY software, Watkinsville, CA, USA).

### Proliferation assay

Cell growth rate was assessed as previously described [35]. Growing cells from nonconfluent cultures were harvested and seeded in 96-well plates (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) at a density of  $6 \times 10^3$  cells per well in 200  $\mu$ L of DMEM (10% fetal bovine serum). The cells were allowed to rest overnight. Transfection with siBGN and siScr was performed in serum-free medium without antibiotics for 6 h. This was then replaced with fresh medium with antibiotics. After 48 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, the cells were lysed, and their number was calculated with the Cyquant fluorometric assay (Molecular Probes, Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Fluorescence was measured in a fluorometer (Biotek, Winooski, VT, USA) with the proposed excitation and emission filters. A separate standard curve was used to convert fluorescence units to cell numbers. All measurements were performed in triplicate.

## Statistical analysis

The statistical significance was evaluated by Student's *t*-test, or ANOVA analysis, with GRAPHPAD PRISM (version 4.0, La Jolla, CA, USA).

## References

- Hock JM, Hummert JR, Boyce R, Fonseca J & Raisz LG (1989) Resorption is not essential for the stimulation of bone growth by hPTH-(1–34) in rats in vivo. *J Bone Miner Res* **4**, 449–458.
- Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, Zhou H, Nieves J, Woelfert L, Shane E, Plavetic K, Muller R, Bilezikian J *et al.* (2001) Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J Bone Miner Res* **16**, 1846–1853.
- Lane NE, Thompson JM, Strewler GJ & Kinney JH (1995) Intermittent treatment with human parathyroid hormone (hPTH[1–34]) increased trabecular bone volume but not connectivity in osteopenic rats. *J Bone Miner Res* **10**, 1470–1477.
- Hurley MM, Tetradis S, Huang YF, Hock J, Kream BE, Raisz LG & Sabbieti MG (1999) Parathyroid hormone regulates the expression of fibroblast growth factor-2 mRNA and fibroblast growth factor receptor mRNA in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* **14**, 776–783.
- Hurley MM, Okada Y, Xiao L, Tanaka Y, Ito M, Okimoto N, Nakamura T, Rosen CJ, Doetschman T & Coffin JD (2006) Impaired bone anabolic response to parathyroid hormone in *Fgf2*<sup>–/–</sup> and *Fgf2*<sup>+ /–</sup> mice. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 989–994.
- Sabbieti MG, Agas D, Xiao L, Marchetti L, Coffin JD, Doetschman T & Hurley MM (2009) Endogenous FGF-2 is critically important in PTH anabolic effects on bone. *J Cell Physiol* **119**, 143–151.
- Gospodarowicz D (1990) Fibroblast growth factor. Chemical structure and biologic function. *Clin Orthop Relat Res* **257**, 231–248.
- Sobue T, Gravely T, Hand A, Min YK, Pilbeam C, Raisz LG, Zhang X, Larocca D, Florkiewicz R & Hurley MM (2002) Regulation of fibroblast growth factor 2 and fibroblast growth factor receptors by transforming growth factor beta in human osteoblastic MG-63 cells. *J Bone Miner Res* **17**, 502–512.
- Globus RK, Plouet J & Gospodarowicz D (1989) Cultured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix. *Endocrinology* **124**, 1539–1547.
- Shen V, Kohler G, Huang J, Huang SS & Peck WA (1989) An acidic fibroblast growth factor stimulates DNA synthesis, inhibits collagen and alkaline phosphatase synthesis and induces resorption in bone. *Bone Miner* **7**, 205–219.
- Rodan SB, Wesolowski G, Yoon K & Rodan GA (1989) Opposing effects of fibroblast growth factor and pertussis toxin on alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, and type I collagen mRNA levels in ROS 17/2.8 cells. *J Biol Chem* **264**, 19934–19941.
- Pitaru S, Kotev-Emeth S, Noff D, Kaffuler S & Savion N (1993) Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal bone marrow cells: enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture. *J Bone Miner Res* **8**, 919–929.
- Noff D, Pitaru S & Savion N (1989) Basic fibroblast growth factor enhances the capacity of bone marrow cells to form bone-like nodules in vitro. *FEBS Lett* **250**, 619–621.
- Montero A, Okada Y, Tomita M, Ito M, Tsurukami H, Nakamura T, Doetschman T, Coffin JD & Hurley MM (2000) Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest* **105**, 1085–1093.
- Kim HJ, Rice DP, Kettunen PJ & Thesleff I (1998) FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. *Development* **125**, 1241–1251.
- Molteni A, Modrowski D, Hott M & Marie PJ (1999) Differential expression of fibroblast growth factor receptor-1, -2, and -3 and syndecan-1, -2, and -4 in neonatal rat mandibular condyle and calvaria during osteogenic differentiation in vitro. *Bone* **24**, 337–347.
- Mancilla EE, De Luca F, Uyeda JA, Czerwiec FS & Baron J (1998) Effects of fibroblast growth factor-2 on longitudinal bone growth. *Endocrinology* **139**, 2900–2904.
- Jang JH (2002) Identification and characterization of soluble isoform of fibroblast growth factor receptor 3 in human SaOS-2 osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 378–382.
- Berdiaki A, Datsis GA, Nikitovic D, Tsatsakis A, Katonis P, Karamanos NK & Tzanakakis GN (2010) Parathyroid hormone (PTH) peptides through the regulation of hyaluronan metabolism affect osteosarcoma cell migration. *IUBMB Life* **62**, 377–386.
- Tepluyuk NM, Haupt LM, Ling L, Dombrowski C, Mun FK, Nathan SS, Lian JB, Stein JL, Stein GS, Cool SM *et al.* (2009) The osteogenic transcription factor Runx2 regulates components of the fibroblast growth factor/proteoglycan signaling axis in osteoblasts. *J Cell Biochem* **107**, 144–154.
- Bodo M, Lilli C, Bellucci C, Carinci P, Calvitti M, Pezzetti F, Stabellini G, Bellocchio S, Balducci C, Carinci F *et al.* (2002) Basic fibroblast growth factor autocrine loop controls human osteosarcoma phenotyping and differentiation. *Mol Med* **8**, 393–404.
- Waddington RJ, Roberts HC, Sugars RV & Schonherr E (2003) Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *Eur Cell Mater* **6**, 12–21.

- 23 Bi Y, Nielsen KL, Kilts TM, Yoon A, Karsdal MA, Wimer HF, Greenfield EM, Heegaard AM & Young MF (2006) Biglycan deficiency increases osteoclast differentiation and activity due to defective osteoblasts. *Bone* **38**, 778–786.
- 24 Inkson CA, Ono M, Bi Y, Kuznetsov SA, Fisher LW & Young MF (2009) The potential functional interaction of biglycan and WISP-1 in controlling differentiation and proliferation of osteogenic cells. *Cells Tissues Organs* **189**, 153–157.
- 25 Wadhwa S, Embree MC, Bi Y & Young MF (2004) Regulation, regulatory activities, and function of biglycan. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **14**, 301–315.
- 26 Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, Bonadio J, Boskey A, Heegaard AM, Sommer B *et al.* (1998) Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet* **20**, 78–82.
- 27 Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, Sommer B, Iozzo RV, Eichstetter I, Robey PG *et al.* (2002) Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers–Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res* **17**, 1180–1189.
- 28 Wegrowski Y, Gillery P, Kotlarz G, Perreau C, Georges N & Maquart FX (2000) Modulation of sulfated glycosaminoglycan and small proteoglycan synthesis by the extracellular matrix. *Mol Cell Biochem* **205**, 125–131.
- 29 Schaefer L & Iozzo RV (2008) Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem* **283**, 21305–21309.
- 30 Kinsella MG, Bressler SL & Wight TN (2004) The regulated synthesis of versican, decorin, and biglycan: extracellular matrix proteoglycans that influence cellular phenotype. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **14**, 203–234.
- 31 Kinsella MG, Tsoi CK, Jarvelainen HT & Wight TN (1997) Selective expression and processing of biglycan during migration of bovine aortic endothelial cells. The role of endogenous basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* **272**, 318–325.
- 32 Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK & Tzanakakis GN (2008) Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *IUBMB Life* **60**, 818–823.
- 33 Zafropoulos A, Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK & Tzanakakis GN (2008) Decorin-induced growth inhibition is overcome through protracted expression and activation of epidermal growth factor receptors in osteosarcoma cells. *Mol Cancer Res* **6**, 785–794.
- 34 Chalkiadaki G, Nikitovic D, Berdiaki A, Sifaki M, Krasagakis K, Katonis P, Karamanos NK & Tzanakakis GN (2009) Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1323–1331.
- 35 Nikitovic D, Berdiaki A, Zafropoulos A, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK & Tzanakakis GN (2008) Lumican expression is positively correlated with the differentiation and negatively with the growth of human osteosarcoma cells. *FEBS J* **275**, 350–361.

## Supporting information

The following supplementary material is available:

**Fig. S1.** Effect of biglycan siRNA on MG63 cell proliferation.

This supplementary material can be found in the online version of this article.

Please note: As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

G.A DATSIS Curriculum Vitae

# **CURRICULUM VITAE**

**Georgios-Alexandros Datsis, MD**  
**Orthopaedic Surgeon**

**JANUARY 2014**

G.A DATSIS Curriculum Vitae

## A. PERSONAL DATA

**Surname** : DATSIS

**First name** : GEORGIOS ALEXANDROS

**Date of birth** : 25 JANUARY 1981

**Place of birth** : Cholargos, Attiki

**Nationality** : Greek

**Languages** : English, French,Greek(native)

**Marital status** : Single

**Permanent address** : 23, St Annes road, Shrewsbury,  
Shropshire, SY36AU, UK  
Mobile: 07749954519  
E-mail: giorgosdatsis@gmail.com

**GMC Fully registered medical practitioner with specialist registration with a licence to practise (17/09/2012)** : 7283214

G.A DATSIS Curriculum Vitae

## **B. DIPLOMAS AND TITLES**

- 1. November 2013 (14-11-2013)** :CCT(Greece)
- 2. June 2013 (12-06-2013)** :EBOT exam (written part)
- 3. July 2004 (20-7-2004)** : Ptychio Iatrikes (Medical Degree)  
Degree 8.54/10 (Honor)  
University of Crete, Heraklio, Greece

## **SOCIETIES**

**Since 2012** : Member of Hellenic Association of Orthopaedic  
Surgery and Traumatology

## **C. EDUCATION AND TRAINING**

### **1. BASIC EDUCATION AND TRAINING**

**1998-2004** : Medical School, University of Crete, Greece

### **2. HONORS AND AWARDS**

**2002-2003** Institution of State Scholarships:  
Scholarship & Award  
(Highest Grade-Point Average)

**1998-2001** Parisianos Scholarship(Highest Grade-  
Point Average)

**2000-2001** Institution of State Scholarships:  
Scholarship & Award  
(Highest Grade-Point Average)

**1999-2000** Institution of State Scholarships:  
Scholarship & Award

G.A DATSIS Curriculum Vitae (Highest Grade-Point Average)

**1998-1999** Institution of State Scholarships:  
Scholarship & Award  
(Highest Grade-Point Average)

**1997-1998** Institution of State Scholarships:  
Scholarship & Award  
(Highest Grade-Point Average)

### 3. POSTGRADUATE STUDIES

2007-present : PhD in progress Medical School, University of  
Crete, Greece, Thesis title (translated): In Vitro  
study of the role of growth factors in  
proliferation, migration, invasion of  
osteosarcoma cells.

### 4. APPOINTMENTS

#### 4.1 LAST APPOINTMENT :

22/03/2010-24/12/2013 : Registrar in Orthopaedic Surgery  
Department of Orthopaedics and Traumatology  
University Hospital of Heraklion, Crete  
Prof Kontakis G. MD, PhD

#### 4.2 PREVIOUS APPOINTMENTS

23/10/2007-01/08/2009 : Registrar in Orthopaedic Surgery  
Department of Orthopaedics and Traumatology  
Rethymnon General Hospital  
D.Michaelidis MD, PhD BOAoverseas fellow

06/11/2006-06/08/2007 : Military Service  
Staff Physician

## G.A DATSIS Curriculum Vitae

- 27/12/2005-26/09/2006 : SHO in General Surgery  
Surgical Department  
Rethymnon General Hospital  
Dr, Daskalakis K MD
- 11/01/2005-09/12/2005 : House Officer  
Moires Health Center  
Venizeleio General Hospital of Herakleion

### 4.3 RESEARCH APPOINTMENTS

- 2007-present : Engaged in research projects using  
osteosarcoma cell lines in the Laboratory of  
Histology-Embryology, Department of  
Morphology at the Medical School, University  
of Crete

### **Most Recent Appointment Description**

22/03/2010-24/12/2013

University General Hospital of Heraklion, is a large (600 bed) regional teaching hospital with an A&E Department and is a Tertiary Referral Center for the region of Crete. Its a "LEVEL I" Trauma Center and part of my duties as a resident, was to work shifts at the A & E Departement, and to be actively involved in the management of severe Orthopedic and Spine trauma cases. The department of Orthopedics and Traumatology is particularly focused in trauma surgery, knee and hip reconstruction surgery and has a special interest in spine surgery. Within the department, there is a special unit for the surgical management of spine trauma and for a wide spectrum of spinal diseases, and, therefore, I have been exposed to preoperative, operative and postoperative management of these patients.



## G.A DATSIS Curriculum Vitae

### Duties:

First on call for the A&E Unit  
1:5 overnight resident duty.  
two 6-hour theatre sessions and two elective/fracture clinics weekly  
Trauma coordinator for the daily trauma list  
Supervised: I performed the elective list of my consultants (THA, TKA, Knee Arthroscopy)  
Unsupervised: Confident in performing every day Trauma list  
Teaching Medical Students & Junior Registrars both for hands on clinical experience & lecturing  
Attending Trauma Clinic, Upper & Lower Arm Clinic, Paediatric Orthopaedic and Spine Surgery Clinic

## **Previous appointments description**

23/10/2007-01/08/2009

Specialist Registrar in Orthopaedic and Trauma Surgery- Orthopaedic Department, Rethymnon General Hospital. Director Dr. D. Michailidis

- Preoperative and postoperative care of patients
- Participation and performing a wide range of emergency and elective trauma and orthopaedic surgical procedures
- Participation in fracture clinic and outpatient clinic departments
- 6 24-hour in-hospital shifts per month (in addition to the regular shifts) to cover the wards and assist emergency department doctors upon request

06/11/2006-06/08/2007

Doctor in the Greek Armed Forces (obligatory military service)

- Engaged in offering primary healthcare services
- Military training

## G.A DATSIS Curriculum Vitae

27/12/2005-26/09/2006

SHO in General surgery Department, Rethymnon General Hospital. Director Dr. Daskalakis K

- Preoperative and postoperative care of patients
- Participation in outpatient clinic department
- Participation in emergency and elective surgical procedures
- 8 24-hour in-hospital shifts per month (in addition to the regular shifts) to cover the wards and assist emergency department doctors upon request

11/01/2005-09/12/2005

Health Center doctor, Moires Health Center, Heraklion. Director: Dr. A. Tsikala

- Engaged in offering primary healthcare services to people in rural parts of the country
- Providing treatments in simple cases and referring to specialists as needed. I was also
- Providing first aid in patients presenting to the Health Center after hours
- 8 16-hour shifts per month in the Health Center.

## TEACHING EXPERIENCE

1. I have trained House Officers in the A&E Department of General Hospital of Rethymno and medical students in University Hospital of Heraklion concerning various medical topics.
2. During my training in Orthopaedics and Trauma I have given lectures to my colleagues about several topics.
3. I have given Histology lab lectures to 4th semester medical students in the University of Crete during 2013.
4. I have trained undergraduate students of Medicine and Biology about research techniques and experimental procedures in the Histology Laboratory of the Department of Morphology, University of Crete during my PhD
5. I have recently attended ALS Instructor Course

G.A DATSIS Curriculum Vitae

#### 4.4 PUBLICATIONS-PRESENTATIONS

Katonis P, **Datsis G**, Karantanas A,  
Kampouroglou A, Lianoudakis S, Licoudis S,  
Papoutsopoulou E, Alpantaki K.  
Spinal Osteosarcoma  
Clin Med Insights Oncol. 2013 Aug 18;7:199-  
208. Review.

**Datsis GA**, Berdiaki A, Nikitovic D, Mytilineou  
M, Katonis P, Karamanos NK, Tzanakakis GN  
“Parathyroid hormone affects the fibroblast  
growth factor-proteoglycan signaling axis to  
regulate osteosarcoma cell migration”  
FEBS J. 2011 Oct;278(19):3782-92

**Datsis GA**, Berdiaki A, Nikitovic D, Mytilineou  
M, Katonis P, Karamanos NK, Tzanakakis GN  
"Parathyroid Hormone regulation of MG63  
osteosarcoma cell migration through FGF  
signaling and extracellular matrix metabolism ”  
67th Hellenic Orthopaedic Congress Athens  
Greece, October 12-16 2011

Alpantaki K, **Datsis G**, Zoras O, Kampouroglou  
A, Drositis I, Halkiadakis G, Katonis P  
“The value of cryosurgery in treating a case of  
thoracic chondrosarcoma”  
Case Report Med. 2011;2011:243243. Epub  
2011 May 10

Berdiaki A, **G.A Datsis**, Nikitovic D, Tsatsakis  
, Katonis P, Karamanos NK, Tzanakakis GN  
“Parathyroid hormone (PTH) peptides through  
the hyaluronan metabolism affect osteosarcoma  
cell migration”

IUBMB Life 2010 May;62(5):377-86

G.A DATSIS Curriculum Vitae

**G.A Datsis**, M Mytilinaiou, Berdiaki A, Nikitovic D, Katonis P, Tzanakakis G "FGF2 signaling pathway participates in PTHinduced osteosarcoma cell migration" 36th FEBS Congress, Biochemistry for Tomorrow's Medicine, Lingotto Conference Center, Torino, Italy, June 25-30, 2011

**G.A Datsis**, Daskalogiannakis E, Michaelidis.D "The role of external fixation in metacarpal fractures treatment" 14<sup>th</sup> Cretan Medical Congress, Georgioupoli Chania, Greece, 29 October-1 November 2008

**G.A.D.Datsis** Member of Organizing Committee (12<sup>th</sup> Cretan Orthopaedic Congress, Fodele, Crete, Greece, 22-25 May 2008)

***AUDIT***

**G.A.D.Datsis**, A.Papoutsidakis, P.Katonis, A.Hadjpavlou "Functional results of surgically treated malleolar fractures in our clinic .Retrospective study" 9th Regional Orthopedic Seminar of Crete, organized by the Orthopedic Clinic of Venizeleio General Hospital under the auspices of Greek College of Orthopedic Surgeons, Ag. Pelagia, Crete, Greece, 17-19 June 2005

***AUDIT***

**G.A.D.Datsis**, A.Papoutsidakis, P.Katonis, A.Hadjpavlou "Functional results of acetabular fractures in our clinic.Retrospective study" 9th Regional Orthopedic Seminar of Crete, organized by the Orthopedic Clinic of Venizeleio General Hospital under the auspices of Greek College of Orthopedic Surgeons, Ag. Pelagia, Crete, Greece, 17-19 June 2005

## G.A DATSIS Curriculum Vitae

Round Table in Orthopaedics “Thoracolumbar Fractures” **G.A.Datsis**, E.Koudounarakis, A.Charampidis, S.Koubidi, B.Charalampakis  
Supervisor:P.Katonis Assistant Professor  
Orthopaedic Department, University Of Crete,  
Faculty of Medicine  
(10<sup>th</sup> Hellenic Congress of Medical Students,  
14-16 May 2004)

**G.A.Datsis**, S.Nikorelou, B.Achtsidis,  
E.Manikas, A.Xekardaki “Pregnancy and  
Connective tissue diseases:Interactions,  
Management, treatment. Latest data”  
(10<sup>th</sup> Hellenic Congress of Medical Students,  
14-16 May 2004)

B.Achtsidis, **G.A.Datsis**, E.Manikas,  
B.Diakonis, A. Sykaras, X.Katselis, S.Nikorelou  
A.Xekardaki “Analysis of molecular mechanism  
of keratitis from Pseudomonas and treatment  
prospectives using molecular biology”  
(10<sup>th</sup> Hellenic Congress of Medical Students,  
14-16 May 2004)

E.Manikas, A.Xekardaki, K.Pitarokili,  
**G.A.Datsis**, B.Diakonis, K.Stergiopoulos  
“Bioengineering of the upper part of the femur”  
(10<sup>th</sup> Hellenic Congress of Medical Students,  
14-16 May 2004)

**G.Datsis**, I.Kelesidis, T.Kelesidis, A.Sykaras,  
K.Traxanas “Clinical implications of lipoprotein  
subclasses and their measurement by NMR”  
(8<sup>th</sup> Hellenic Congress of Medical Students,  
19-21 April 2002)

A.Sykaras, B.Achtsidis, **G.Datsis**, I.Kelesidis,  
T.Kelesidis, K.Traxanas “Another p53 exists?  
Interdependent and distinct roles of p53-p63-p73  
in carcinogenesis and differentiation”

G.A DATSIS Curriculum Vitae

(8<sup>th</sup> Hellenic Congress of Medical Students,  
19-21 April 2002)

A.Sykaras, B.Achtsidis, **G.Datsis**, I.Kelesidis,  
T.Kelesidis, K.Traxanas “Speeding up  
Or slowing down cell cycle?Interactions  
between p53 and oncogenes and how their  
mutations can lead to carcinogenesis”  
(8<sup>th</sup> Hellenic Congress of Medical Students,  
19-21 April 2002)

I.Kelesidis, T.Kelesidis, K.Traxanas, A.Sykaras  
**G.Datsis** “Nutrition for COPD”  
(8<sup>th</sup> Hellenic Congress of Medical Students,  
19-21 April 2002)

I.Kelesidis, T.Kelesidis, K.Traxanas, A.Sykaras  
**G.Datsis** “Effects of air conditioning systems  
on respiratory system”  
(8<sup>th</sup> Hellenic Congress of Medical Students,  
19-21 April 2002)

K.Traxanas, I.Kelesidis, T.Kelesidis, A.Sykaras  
**G.Datsis** “Diseases caused by disorders in  
structure and metabolism of HDL”  
(8<sup>th</sup> Hellenic Congress of Medical Students,  
19-21 April 2002)

G.A DATSIS Curriculum Vitae

## 5. PARTICIPATION IN TRAINING COURSES AND SEMINARS

2013 ALS instructor course, European Resuscitation Council

2013 ALS provider course, European Resuscitation Council

2011 AOTrauma course, Advances in Operative Fracture Management, 10-12 November Patras, Greece

2011 AOTrauma course, Foot and Ankle, 7-9 April, Athens, Greece

2011 AOTrauma course, Principles in Operative Fracture Management, 10-12 March Ioannina, Greece

2009 25<sup>th</sup> Microsurgery Seminar, 1-4 July 2009, Ioannina, Greece

2005 ATLS course, American College Of Surgeons

## 6. PERSONAL INTERESTS

Hobbies include, technical analysis, internet, reading, hiking

