

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ**

**Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η
Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η**

**Επίδραση των Αυξητικών Παραγόντων στη Σύνθεση των
Πρωτεογλυκανών-Γλυκοζαμινογλυκανών σε Κυτταρικές Σειρές
Καρκίνου του Παχέος Εντέρου**

**ΧΑΤΖΗΝΙΚΟΛΑΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

Στους γονείς μου,

Στο Γιώργο

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση μίας διδακτορικής διατριβής αποτελεί πρόκληση. Φτάνοντας στο τέλος ενός τέτοιου μεγάλου στόχου συνειδητοποιείς ότι χωρίς την παρουσία, την υποστήριξη και την ανεκτικότητα κάποιων ανθρώπων δε θα ήταν δυνατή η υλοποίηση αυτής. Σε όλους αυτούς τους ανθρώπους χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχήν τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γιώργο Τζανακάκη για την ευκαιρία εκπόνησης της παρούσας διατριβής, καθώς και για την επιστημονική του καθοδήγηση, την εποικοδομητική του κριτική και την ηθική του συμπαράσταση. Ευχαριστώ επίσης, τα έτερα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής τον Καθηγητή κ. Νίκο Καραμάνο για τη συνεργασία και την πολύπλευρη βοήθειά του, και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Ζαφειρόπουλο για το πολύτιμο συμβουλευτικό του έργο, την αμέριστη επιστημονική και ηθική του υποστήριξη. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γιώργο Χαλκιαδάκη, τους Αναπληρωτές Καθηγητές κ. Στάθη Σταθόπουλο, Δημήτρη Μαυρουδή και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γιώργο Σουρβίνο για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Δεν θα μπορούσα βεβαίως να μην ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα μέλη του εργαστηρίου Ιστολογίας για το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας, το φιλικό περιβάλλον, την επιστημονική, τεχνική και ηθική συμπαράσταση καθ'όλη τη διάρκεια της επιστημονικής αυτής προσπάθειας. Ευχαριστώ θερμά την Δρ. Dragana Nikitonic για τις πολύτιμες συμβουλές και την έμπρακτη βοήθειά της. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Δρ. Κατερίνα Μπερδιάκη για όλη τη βοήθεια, τη συμπαράσταση και τις γνώσεις που μου προσέφερε, καθώς επίσης στην Δρ. Ελένη Φθενού και στην Γιούλη Χαλκιαδάκη που συμπορευτήκαμε στη δύσκολη αλλά ταυτόχρονα όμορφη αυτή προσπάθεια τα τελευταία τρία χρόνια. Ευχαριστώ ακόμα τη Δρ. Μαρία Ασούτη, τη Δρ. Μαρία Σηφάκη, τη Χαρά Συρογιάννη, τη Κατερίνα Κουβίδη και τη Μαρία Κεραμάρου για την υποστήριξη και τη φιλική τους διάθεση.

Ένα ευχαριστώ στον άνθρωπο που έφυγε αναπάντεχα και πρόωρα από κοντά μας, τον Γιάννη Στειακάκη, με την παρότρυνση του οποίου ξεκίνησε αυτή η ερευνητική προσπάθεια.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου, Ρούλα και Μιχάλη, που με έμαθαν να αγωνίζομαι και να κυνηγώ τα όνειρά μου με αξιοπρέπεια, καθώς επίσης για την ηθική και οικονομική υποστήριξή τους και την παντοτινή αγάπη τους. Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης χρωστάω στη γιαγιά μου Γεωργία, που είναι πάντα στη σκέψη μου, και στον παππού μου Λεωνίδα για την αγάπη τους και την κάθε είδους υποστήριξή τους στο μεγάλωμά μου. Ευχαριστώ και τη γιαγιά και τον παππού μου, Βασιλεία και Γιάννη, καθώς και την προγιαγιά μου, Μαρία, για την αγάπη τους. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την οικογένεια Ατζεμιάν, την κα. Αργυρώ και τη Νοέλα για την υποστήριξη και την αγάπη τους, καθώς και τον Στέφανο που δεν ξεχνάμε ποτέ.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο σύντροφό μου Γιώργο για την αγάπη του, τις πάντα πολύτιμες συμβουλές του και την υποστήριξή του όλα αυτά τα χρόνια.

Σημειώνεται ότι η εργασία αυτή αποτελεί μέρος του ερευνητικού προγράμματος 03ΕΔ375, το οποίο υλοποιήθηκε στα πλαίσια του «Προγράμματος Ενίσχυσης Ερευνητικού Δυναμικού» (ΠΕΝΕΔ) και συγχρηματοδοτήθηκε κατά 75% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση - Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ), κατά 25% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο – Υπουργείο Ανάπτυξης - Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και από τον Ιδιωτικό τομέα στο πλαίσιο του μέτρου 8.3 του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα – Γ' Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης.

Περίληψη

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την τρίτη κατά σειρά αιτία θανάτου παγκοσμίως που προέρχεται από κακοήθεις νεοπλασίες και αφορά εξίσου άνδρες και γυναίκες. Η παθογένειά της εξακολουθεί να είναι άγνωστη, ωστόσο έχειδειχθεί ότι στην ανάπτυξη της νόσου, που είναι μία πολυδιάστατη διαδικασία και ξεκινά από το σχηματισμό των πολυπόδων έως την εμφάνιση διηθητικού καρκίνου, συμβάλλουν γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη των όγκων έχουν οι σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων, της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (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 εξωκυττάριας 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 εξωκυττάριας 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 υπάρχουσα γνώση σχετικά με τα μοριακά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου και ιδιαίτερα του στρώματός τους, καθώς και η συσχέτισή τους με την εξέλιξη της νόσου, είναι περιορισμένη. Η μελέτη της δομής και του ρόλου των GAGs/PGs που παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου αλλά και από τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντός τους παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον καθώς συμμετέχουν στην ανάπτυξη των κακοήθων νεοπλασιών. Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων των καρκινικών κυττάρων και του εξωκυττάριας χώρου έχει ως σκοπό την αναζήτηση πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών παρεμβάσεων σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου.

Στα πλαίσια της παρούσας έρευνας μελετήθηκε η σύνθεση και η κατανομή των GAGs στο υλικό καλλιέργειας και στην κυτταρική μεμβράνη των HT29 και SW1116 ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αμφότερες οι κυτταρικές σειρές, οι οποίες εκφράζουν τον οιστρογονικό υποδοχέα ERβ, παράγουν υαλουρονικό οξύ (HA), εξωκυττάρια και μεμβρανικές γαλακτοζαμινογλυκάνες (GalAGs) καθώς και θειϊκή ηπαράνη (HS). Τα HT29 κύτταρα συνθέτουν HA, GalAGs και HS σε σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες σε σύγκριση με τα SW1116 κύτταρα.

Μελετήθηκε επίσης η επίδραση της γενιστεΐνης (genistein) στη σύνθεση των παραπάνω εκκρινόμενων και μεμβρανικών GAGs, καθώς και στον πολλαπλασιασμό των HT29 και SW1116 κυττάρων. Ο μηχανισμός δράσης της γενιστεΐνης επί του κυτταρικού μεταβολισμού, μέσω της αναστολής της πρωτεΐνης κινάση της τυροσίνης (PTK) και/ή της αλληλεπίδρασής της με τους οιστρογονικούς υποδοχείς (ERs), είναι γνωστός. Η δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική επίδραση της γενιστεΐνης τόσο στη σύνθεση των εκκρινόμενων και των μεμβρανικών GAGs/PGs των SW1116 κυττάρων, όσο και στο ρυθμό ανάπτυξής τους, εισηγούνται τη συμμετοχή ενός PTK μηχανισμού. Από την άλλη μεριά, η σύνθεση των GAGs/PGs από τα HT29 κύτταρα παρουσία της γενιστεΐνης επηρεάζει τον τύπο και την κατανομή τους, υποδηλώνοντας την ενεργή συμμετοχή των ERs, γεγονός που ενισχύθηκε και από την αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μετά τη χορήγηση χαμηλών συγκεντρώσεων γενιστεΐνης.

Έχει δειχθεί ότι ποιοτικές ή ποσοτικές αλλαγές στην παραγωγή των GAGs/PGs και συνεπώς αλλαγές της σύστασης της ECM μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη ορισμένων καρκινικών όγκων. Επόμενος στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης των ενδογενών και των εξωγενώς προστιθέμενων GAGs στον πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου του ανθρώπου. Χρησιμοποιήθηκαν εξωγενώς προστιθέμενες αλυσίδες θειϊκής χονδροϊτίνης (CSA), θειϊκής δερματάνης (DS), ηπαρίνης (heparin), υαλουρονικό οξύ, αναστολέας της σύνθεσης των ενδογενών GAGs/PGs και ειδικές γλυκοσιδάσες για την απομάκρυνση των μεμβρανικών GAGs. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου

αυξάνεται από την εξωγενή προσθήκη ηπαρίνης, ενώ δεν επηρεάζεται από την παραγωγή των ενδογενών GAGs/PGs, γεγονός που σχετίζεται με το μοτίβο της θείωσής τους.

Πολυάριθμοι μηχανισμοί για τη δράση της ηπαρίνης έχουν προταθεί, όπως η ρύθμιση ποικίλων αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους, η ρύθμιση της δραστηριότητας των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPKs) καθώς και η διαφοροποίηση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, οι HSPGs/ηπαρίνη έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν την ικανότητα πρόσδεσης του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF-2) στους υποδοχείς του, FGFR1-4, λειτουργώντας ως συνυποδοχείς. Ο ενεργός ρόλος του FGF-2 μονοπατιού σηματοδότησης στα αρχικά στάδια της ογκογένεσης του παχέος εντέρου είναι γνωστός. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι οι αλυσίδες HS αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω ενός μηχανισμού που σχετίζεται με την αυξημένη έκφραση των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF). Σκοπός της παρούσας φάσης της μελέτης ήταν να εξεταστεί η πιθανή συμμετοχή των FGF-2 και EGF σηματοδοτικών μονοπατιών στον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Η χορήγηση στα κύτταρα ειδικού αντισώματος που εμποδίζει τη δράση του FGF-2, καθώς και η χρήση ειδικού αναστολέα της δράσης του υποδοχέα του EGF, έδειξε ότι η διεγερτική επίδραση της ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου δεν πραγματοποιείται μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών των FGF-2 και EGFR.

Στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψιν τον ήδη γνωστό ρόλο της σηματοδότησης των MAPKs στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, εξετάσαμε τη συμμετοχή των MAP κινασών στη μιτογονική δράση της ηπαρίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διεγερτική επίδραση της ηπαρίνης στον ρυθμό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου σχετίζεται με την ενεργοποίηση της p38 κινάσης. Η χορήγηση ειδικού αναστολέα της p38 κινάσης ανέστειλε σημαντικά τον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 κυττάρων, σε αντίθεση με τους αναστολείς των JNK και

MEK1/2 κινασών που δεν είχαν καμία επίδραση. Επίσης, η ηπαρίνη μέσω ενός p38-εξαρτώμενου μηχανισμού τροποποίησε την έκφραση των γονιδίων και των πρωτεϊνών p21WAF/cip1, p53 και κυκλίνης D1 που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η ηπαρίνη αυξάνει το ποσοστό των κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και προάγει την εξέλιξή του μέσω ενός p38-εξαρτώμενου μηχανισμού, ενώ δεν επηρεάζει το ρυθμό της απόπτωσης των κυττάρων. Η μελέτη αυτή εισάγει έναν καινούριο ρόλο της ηπαρίνης στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της p38 MAP κινάσης.

Abstract

Colon cancer is one of the leading causes of cancer-associated death among men and women worldwide. It has been shown that genomic instability, as well as environmental factors can be correlated to the risk of colon cancer however, the pathogenesis of the malignancy still remains unknown. Many colorectal cancers are thought to arise from adenomatous polyps in the colon.

The complex interactions among the cancer cells, their extracellular matrix (ECM) and the surrounding normal cells are thought to play a pivotal role in tumor development and progression. The composition of the ECM affects various cellular functions, such as proliferation, adhesion, migration and differentiation. Proteoglycans (PGs), major constituents of the ECM, through their core proteins or via their glycosaminoglycan (GAG) chains are able to interact with collagens, growth factors, growth factor receptors and adhesion molecules and through these interactions may participate in the regulation of many cellular events.

The molecular characteristics of colon cancer cells and their stroma, as well as their association with the development and the progression of the malignancy have not been adequately studied. The structural analysis and the role of GAGs/PGs that are produced by colon cancer cells and the surrounding cells may contribute to the better understanding of these glycocomplexes, which participate in the regulation of numerous cellular events, as well as in the cell malignant transformation. The understanding of the interactions among cancer cells and their microenvironment may contribute to colon cancer treatment.

In this study, the synthesis and the distribution of GAGs among the cell membrane and the culture medium by two human colon cancer cells, HT29 and SW1116 were examined. The results demonstrated that both estrogen receptor-positive (ER+) cancer cell lines produced hyaluronan (HA), both extracellular and membrane-associated galactosaminoglycans (GalAGs) and heparan sulfate (HS), with the HT29 cells producing all GAG fractions at significantly higher rates.

Abstract

The effects of genistein on the synthesis of these secreted or cell-associated macromolecules, as well as on the growth of HT29 and SW1116 cell lines were also studied. It is well known that the soy isoflavone genistein can affect cell metabolism by specifically inhibiting protein tyrosine kinase (PTK) and/or interacting with the estrogen receptors (ERs). The observed dose-dependent inhibitory effect of genistein on the synthesis of both secreted and cell-associated GAG/PG by the SW1116 cells, as well as on their growth, was suggestive of a PTK mechanism. On the other hand, the synthesis of GAGs/PGs by HT29 cells in the presence of genistein was dependent on their type and localization which implies the active participation of the ERs, which was further supported by the observed growth stimulation at low concentrations of genistein.

Quantitative and qualitative changes in GAGs/PGs production, and consequently in the ECM composition, have been suggested to have a role in the development of some types of cancer. Therefore, the effects of endogenous and exogenously added GAGs on the proliferation of HT29, SW1116 and HCT116 human colon cancer cell lines were examined. For this purpose exogenously added GAGs (chondroitin sulfate-CS, dermatan sulfate-DS, hyaluronan-HA and heparin), an inhibitor of endogenous GAG sulfation and specific glycosidases to cleave cell-associated glycosaminoglycans were utilized. The obtained results showed that colon cancer cell growth was exclusively stimulated by exogenously added heparin and insensitive to endogenous GAGs/PGs production, in a sulfation pattern-related manner. Numerous mechanisms of heparins' action have been postulated including the regulation of growth factors / growth factor receptors, mitogen activated protein kinases (MAPKs) activities or the modulation of cell cycle progression. Specifically, HSPGs/heparin have been demonstrated to increase the affinity of FGF-2 to its respective, FGFR1-4, receptors. The active role of FGF-pathways has been suggested in the early stages of colorectal tumorigenesis. Moreover, it has been shown that HS chains stimulate the proliferation of colon cancer cells via a mechanism involving increased expression of tyrosine kinase receptors of EGF. Aim of this study was to examine the possible involvement of the FGF-2 and EGF signaling on the heparin-induced effect on HT29, SW1116 and HCT116 colon cancer cell lines. Treatment of

the tested cell lines with the FGF-2 neutralizing antibody or an EGFR tyrosine kinase inhibitor showed that the stimulatory effect of heparin on the cells' growth was not FGF-2 or EGFR dependent.

In view of the fact that MAPKs signaling involvement on colon cancer cell growth is well established, three major MAPK pathways, JNK, ERK1/2 and p38, were examined for their participation on the mitogenic effect of heparin. The results showed that heparin-induced stimulation of colon cancer cell growth was correlated to increased phosphorylation of p38 MAP kinase. Treatment with a highly specific p38 kinase inhibitor significantly inhibited colon cancer cell heparin-induced growth, while administration of JNK or MEK1/2 kinase inhibitors had no significant effect. Furthermore, heparin through a p38-dependent mechanism modulated the expression of p21WAF1/cip1, p53 and cyclin D1 cell cycle regulators in a manner supportive of colon cancer cell proliferation. Heparin treatment also promoted cell cycle progression in cells with increased S-phase entry via a p38-dependent mechanism. On the other hand, treatment with heparin did not appear to affect HT29, SW1116 and HCT116 cell apoptosis rates. This study introduces a new role of heparin in the regulation of colon cancer cell proliferation through p38 MAP kinase signaling.

| | |
|--------------------------|------------|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | I |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | III |
| ABSTRACT | VII |
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ | X |

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ **1**

| | |
|---|----|
| 1.1 ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ | 1 |
| 1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ | 1 |
| 1.2.1 Γενικά | 1 |
| 1.2.2 Αίτια και παράγοντες κινδύνου..... | 2 |
| 1.2.3 Κλινικά συμπτώματα-Διάγνωση | 4 |
| 1.2.4 Θεραπεία-Πρόληψη..... | 5 |
| 1.3 ΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΟΓΛΥΚΑΝΕΣ (GAGS) / ΠΡΩΤΕΟΓΛΥΚΑΝΕΣ (PGS)..... | 5 |
| 1.3.1 Γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) | 6 |
| 1.3.1α Υαλουρονικό οξύ (HA)..... | 7 |
| 1.3.1β Θεϊκή χονδροϊτίνη (CS) | 8 |
| 1.3.1γ Θεϊκή δερματάνη (DS)..... | 9 |
| 1.3.1δ Θεϊκή κερατάνη (KS) | 10 |
| 1.3.1ε Θεϊκή ηπαράνη (HS) και ηπαρίνη (heparin) | 12 |
| 1.3.2 Βιοσύνθεση των γλυκοζαμινογλυκανών | 16 |
| 1.3.3 Πρωτεογλυκάνες (PGs)..... | 19 |
| 1.3.3α Εξωκυττάρια πρωτεογλυκάνες | 20 |
| 1.3.3α(i) Υαλεκτάνες | 20 |
| 1.3.3α(ii) Μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRPs)..... | 22 |
| 1.3.3α(iii) Πρωτεογλυκάνες της βασικής μεμβράνης | 25 |
| 1.3.3β Πρωτεογλυκάνες ενδοκυττάριας και της κυτταρικής επιφάνειας | 26 |
| 1.3.4 Βιοσύνθεση των πρωτεογλυκανών | 29 |
| 1.4 ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ | 29 |

ΣΚΟΠΟΣ..... **36**

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... **37**

| | |
|---|----|
| 2.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ..... | 37 |
| 2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ | 37 |
| 2.3 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ-ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (RT-PCR).... | 38 |
| 2.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)..... | 38 |
| 2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME PCR)..... | 39 |
| 2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (SDS-PAGE) | 39 |
| 2.7 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΗΛΙΔΑΣ (DOT BLOT) | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 2.8 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT) | 40 |
| 2.9 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΟΓΛΥΚΑΝΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ HS ΔΙΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ | 41 |
| 2.10 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ | 42 |
| 2.11 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ | 43 |
| 2.12 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ | 43 |
| 2.13 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ..... | 44 |
| 2.14 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ | 44 |
| 2.15 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ..... | 45 |
| 2.16 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ | 46 |
| 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 47 |
| 3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΟΓΛΥΚΑΝΩΝ/ ΠΡΩΤΕΟΓΛΥΚΑΝΩΝ (GAGs/PGs) ΑΠΟ ΔΥΟ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ | 47 |
| 3.1.1 Γενικά | 47 |
| 3.1.2 Στόχος..... | 49 |
| 3.1.3 Αποτελέσματα..... | 49 |
| 3.1.3α Μελέτη της σύνθεσης και της κατανομής των GAGs σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου του ανθρώπου | 49 |
| 3.1.3β Δράση της γενιστεΐνης στη σύνθεση των GAGs/PGs..... | 50 |
| 3.1.3γ Μελέτη της έκφρασης των οιστρογονικών υποδοχέων (ERα και β) στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου του ανθρώπου | 52 |
| 3.1.3δ Δράση της γενιστεΐνης στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου..... | 52 |
| 3.1.4 Συζήτηση..... | 54 |
| 3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΟΓΛΥΚΑΝΩΝ/ΠΡΩΤΕΟΓΛΥΚΑΝΩΝ (GAGs/PGs) ΣΤΟ ΡΥΘΜΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ | 56 |
| 3.2.1 Γενικά | 56 |
| 3.2.2 Στόχος..... | 58 |
| 3.2.3 Αποτελέσματα..... | 58 |
| 3.2.3α Ρόλος των μεμβρανικών και των ενδογενών GAGs/PGs στην ανάπτυξη των ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου..... | 58 |
| 3.2.3β Δράση των εξωγενών GAGs στον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου..... | 61 |
| 3.2.3γ Προσδιορισμός της θείωσης των HS (GlcAGs) δισακχαριτικών μονάδων των καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου..... | 61 |
| 3.2.3δ Προφίλ έκφρασης του FGF-2 και των υποδοχέων του – Παρέμβαση στη δράση του αυξητικού παράγοντα..... | 63 |
| 3.2.4 Συζήτηση..... | 66 |

| | |
|---|------------|
| 3.3 Η ΗΠΑΡΙΝΗ ΡΥΘΜΙΖΕΙ ΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΜΕΣΩ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ p38 | 71 |
| 3.3.1 Γενικά | 71 |
| 3.3.2 Στοχός..... | 73 |
| 3.3.3 Αποτελέσματα..... | 73 |
| 3.3.3α Επίδραση ειδικών αναστολέων των MAPKs στον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου..... | 73 |
| 3.3.3β Η ηπαρίνη επηρεάζει τη φωσφορυλίωση της p38 κινάσης | 75 |
| 3.3.3γ Η ηπαρίνη ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μέσω ενός p38-εξαρτώμενου μηχανισμού..... | 75 |
| 3.3.3δ Επίδραση της ηπαρίνης στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου..... | 80 |
| 3.3.3ε Επίδραση της σηματοδότησης μέσω του EGFR στον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου..... | 82 |
| 3.3.4 Συζήτηση..... | 84 |
| 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 89 |
| 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 98 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ | 129 |
| ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ | 130 |
| ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ | 133 |

1 Εισαγωγή

1.1 Παχύ έντερο

Το παχύ έντερο, μήκους περίπου 150 cm, αποτελεί τη συνέχεια του πεπτικού σωλήνα μετά το τέλος του λεπτού εντέρου και ανατομικώς διαιρείται σε τυφλό, κόλον (ανιόν, εγκάρσιο, κατιόν και σιγμοειδές) και ορθό. Οι βασικές λειτουργίες του είναι η απορρόφηση νερού και ηλεκτρολυτών από το χυλό στον αυλό του εντέρου, καθώς και η αποθήκευση του κοπρανώδους υλικού μέχρι να γίνει εξώθησή του μέσω του πρωκτικού σωλήνα προς το εξωτερικό περιβάλλον. Το τοίχωμα του παχέος εντέρου, όπως και του υπόλοιπου γαστρεντερικού σωλήνα, αποτελείται από μέσα προς τα έξω από τέσσερις στιβάδες, το βλεννογόνο (επιθήλιο, χόριο, βλεννογόνια μυική στιβάδα), τον υποβλεννογόνο, τον μυικό και τον ορογόνο χιτώνα. Το απλό κυλινδρικό ή καλυκοειδές επιθήλιο του βλεννογόνου του παχέος εντέρου στηρίζεται από το χόριο, ένα στρώμα χαλαρού συνδετικού ιστού πλούσιο σε αιμοφόρα αγγεία, λεμφικά κύτταρα, μαστοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, μακροφάγα, κολλαγόνο, δικτυωτές ίνες και ινοβλάστες μέσα σε εξωκυττάρια θεμέλια ουσία πλούσια σε γλυκοζαμινογλυκάνες (Παπαδημητρίου, 2001; Fenoglio-Preiser *et al.*, 1989).

1.2 Καρκίνος του παχέος εντέρου

1.2.1 Γενικά

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί τη συχνότερη μορφή καρκίνου των σπλάχνων με ευρεία διακύμανση της συχνότητάς του ανά τον κόσμο. Συνιστά την τρίτη αιτία θανάτου από κακοήγη νεοπλασμάτα στους άνδρες, ενώ στο γυναικείο πληθυσμό αναφέρεται ως η δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου από κακοήγη όγκο (Serrano *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006). Η πιθανότητα εμφάνισής του καθίσταται συχνότερη μετά την ηλικία των 50 ετών. Μόνο 6% έως 8% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου αναπτύσσονται πριν από την ηλικία των 40 ετών, ενώ η εμφάνισή του σε μικρότερη ηλικία οφείλεται ενδεχόμενα σε κληρονομική προδιάθεση. Τα τρία τέταρτα των περιπτώσεων του καρκίνου του παχέος εντέρου

εντοπίζονται στο ορθό και το σιγμοειδές, ενώ το 25% στο τυφλό και το ανιόν κόλον (Παπαδημητρίου, 2001; Δελίδη, 2001).

Το μεγαλύτερο μέρος των όγκων του παχέος εντέρου θεωρείται ότι προέρχεται από την κακοήθη εξαλλαγή των αδενωματωδών πολυπόδων ή αδενωμάτων, που συνιστούν καλοήθη νεοπλάσματα του βλεννογόνου του παχέος εντέρου και εμφανίζονται ως μία υπέρμετρη ανάπτυξη (υπερπλασία) των επιθηλιακών κυττάρων κατά μήκος του ιστού. Παράλληλα παρατηρούνται δυσπλασίες όπως η διαταραχή της ποιότητας της παραγόμενης βλέννας και της πολικότητας των κυττάρων. Με την πάροδο του χρόνου τα αδενώματα αυξάνουν σε μέγεθος, ενώ συγχρόνως υφίστανται προοδευτικές αλλαγές στη μορφολογία τους και εμφανίζουν μεγαλύτερο βαθμού δυσπλαστικές αλλοιώσεις μέχρι τελικώς να εξαλλαχθούν σε καρκίνο (Tanaka, 2009; Davidson, 2005). Από την παθολογοανατομική ποικιλία των καρκίνων του παχέος εντέρου, το αδενοκαρκίνωμα εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα.

1.2.2 Αίτια και παράγοντες κινδύνου

Η αιτιολογία του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι έως σήμερα άγνωστη. Μελέτες έχουν όμως συσχετίσει την ανάπτυξή του με γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Ένα ποσοστό περίπου 5-10% του συνόλου των καρκίνων του παχέος εντέρου οφείλονται σε κληρονομική προδιάθεση και συγκεκριμένα στη συσσώρευση πολλαπλών γενετικών μεταλλάξεων. Ένα από τα πλέον καλά μελετημένα σύνδρομα είναι το σύνδρομο της οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης (familial adenomatous polyposis-FAP) που οφείλεται σε μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου APC, όπως και τα συγγενή προς το FAP σύνδρομα Gardner, Turcot και attenuated adenomatous polyposis coli στα οποία συνυπάρχουν και νεοπλάσματα άλλων οργάνων. Το σύνδρομο Peutz-Jeghers, με μετάλλαξη σε ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που κωδικοποιεί μια κινάση της σερίνης/θρεονίνης, χαρακτηρίζεται από την αυξημένη επίπτωση καρκίνου του παχέος εντέρου, καθώς

επίσης το σύνδρομο της οικογενούς νεανικής πολυποδίασης (familial juvenile polyposis syndrome) και το σύνδρομο Cowden. Επίσης, υπάρχουν περιπτώσεις κληρονομικού καρκίνου του παχέος εντέρου που δεν συνδέονται με πολυποδίαση και συνιστούν τον κληρονομικό, μη συνδυαζόμενο με πολυποδίαση καρκίνο (hereditary nonpolyposis colorectal cancer-HNPCC) ή σύνδρομο του Lynch, όπου υπεύθυνες είναι οι κληρονομικές μεταλλάξεις των επιδιορθωτικών του DNA γονιδίων, και συγκεκριμένα των γονιδίων hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 και GTBP/hMSH6 (Cetta & Dhammo, 2007; Rustgi, 2007; Jo & Chung, 2005; Jaiswal *et al.*, 2005). Διαταραχές των γονιδίων p53 και ras έχουν παρατηρηθεί στα όψιμα στάδια της διαδικασίας της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου, συμβάλλοντας στην κακοήθη εξαλλαγή του αδενωματώδους πολύποδα σε καρκίνο (Joyce & Pintzas, 2007; Lynch & Hoops, 2002). Οι χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του εντερικού σωλήνα, όπως η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος του Crohn, αποτελούν ίσως τις μοναδικές περιπτώσεις προδιάθεσης για εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου χωρίς την ύπαρξη πολυπόδων (Gersemann *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2006; Ullman, 2004).

Οι περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου στην πλειονότητά τους χαρακτηρίζονται ως σποραδικές, όπου φαίνεται να συμβάλλουν οι τυχαίες σωματικές μεταλλάξεις, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και τα υπολειπόμενα γονιδιακά χαρακτηριστικά. Οι διατροφικές συνήθειες αποτελούν ένα σημαντικό περιβαλλοντικό παράγοντα στην παθογένεια της συγκεκριμένης νόσου. Πειραματικές, επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες δείχνουν ότι η αυξημένη κατανάλωση κόκκινου κρέατος και λίπους, η μειωμένη κατανάλωση φυτικών ινών και η ανεπαρκής πρόσληψη φυλλικού οξέος αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου (Forte *et al.*, 2008; Johnson & Lund, 2007; Ahmed, 2003). Άλλοι παράγοντες που ευνοούν τη εμφάνιση της νόσου είναι η παχυσαρκία, καθώς και η απουσία σωματικής άσκησης (Pan & DesMeules, 2009; Giovannucci, 2003). Επίσης, οι καπνιστές φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της συγκεκριμένης κακοήθειας (Nishikawa *et al.*, 2004; Massarrat, 2008). Αντιφατικά αποτελέσματα υπάρχουν για τη δράση των ορμονών (Schindler, 2007; Dietel *et al.*, 2005), ενώ πρόσφατες μελέτες αναφέρουν την πιθανή προστατευτική δράση της ασπιρίνης και

άλλων μη στεροϊδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Iwama, 2009; Lai *et al.*, 2008; Chan, *et al.*, 2007).

1.2.3 Κλινικά συμπτώματα-Διάγνωση

Στα αρχικά στάδια ο καρκίνος του παχέος εντέρου συνήθως δεν προκαλεί θορυβώδη συμπτώματα και ανευρίσκεται τυχαία σε ενδοσκοπικό έλεγχο. Τα συμπτώματα ποικίλουν ανάλογα με τη θέση του καρκινώματος. Το συχνότερο σύμπτωμα είναι η παρουσία αίματος στα κόπρανα λόγω αιμορραγίας του όγκου. Η λανθάνουσα αιμορραγία μπορεί να έχει τη μορφή μέλαινας ή αποβολής ζωηρόχρωμου αίματος ανάλογα με την εντόπιση του όγκου, και οδηγεί σε υπόχρωμη σιδηροπενική αναιμία συνοδευόμενη από αδυναμία, εύκολη κόπωση, δύσπνοια και ζάλη. Η αλλαγή των εντερικών συνηθειών με τη μορφή δυσκοιλιότητας ή σπανιότερα διάρροιας, η μεταβολή της διαμέτρου των κοπράνων, ο τεινεσμός και το κολικοειδές άλγος αποτελούν επίσης συμπτώματα που σχετίζονται με τον καρκίνο του παχέος εντέρου και οφείλονται συνήθως σε απόφραξη του εντέρου. Σε μεταγενέστερα στάδια της νόσου παρατηρούνται συνήθως και τα γενικά συμπτώματα πολλών κακοηθών νεοπλασιών, όπως ο πυρετός, η ανορεξία και η απώλεια βάρους. Η παραπάνω συμπτωματολογία μπορεί να είναι ενδεικτική του καρκίνου του παχέος εντέρου αλλά και μίας σειράς άλλων παθήσεων, όπως της εκκολπωματίτιδας, της ισχαιμικής κολίτιδας, της αγγειοδυσπλασίας, της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου και των καλοήθων πολυπόδων.

Η διαγνωστική μελέτη του παχέος εντέρου περιλαμβάνει δακτυλική εξέταση του ορθού και στη συνέχεια σιγμοειδοσκόπηση σε συνδιασμό με βαριούχο υποκλυσμό διπλής σκιαγραφήσεως που αποκαλύπτουν περίπου το ένα τρίτο των όγκων. Στις περιπτώσεις που βρεθεί ύποπτη αλλοίωση ή που δεν υπάρχουν ευρήματα αλλά η κλινική υποψία είναι ισχυρή, η εξέταση εκλογής είναι η κολονοσκόπηση. Η εξέταση αυτή είναι ακριβής, ευαίσθητη και δύναται να ληφθούν βιοψίες από τις βλάβες και να αφαιρεθούν υπάρχοντες πολύποδες. Επίσης, το ενδοορθικό υπερηχογράφημα ή η πυελική MRI σταδιοποιούν τους ορθικούς καρκίνους με ακρίβεια. Η αξονική κολονογραφία (virtual colonoscopy) είναι μία μη επεμβατική

τεχνική για τη διάγνωση όγκων και μεγάλων πολυπόδων. Η μέτρηση του CEA στο αίμα ή σε άλλα σωματικά υγρά μπορεί να συμβάλλει στην πρόιμη αναγνώριση μεταστάσεων ή τοπικής υποτροπής του νεοπλάσματος. Μετά την επιβεβαίωση της ύπαρξης όγκου στο παχύ έντερο αναζητείται η έκταση της νόσου με ακτινολογικό έλεγχο (ακτινογραφίες, αξονική ή μαγνητική τομογραφία) (Davidson 2005; Παπαδημητρίου, 2001; Fujimori *et al.*, 2009; Maras-Simunic *et al.*, 2009).

1.2.4 Θεραπεία-Πρόληψη

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου διαφοροποιείται ανάλογα με το στάδιο της νόσου. Η χειρουργική αφαίρεση του όγκου μαζί με επαρκή εκτομή των ορίων του και των περικολικών λεμφαδένων αποτελεί την κύρια μέθοδο αντιμετώπισης της νόσου, ενώ πολύ συχνά εφαρμόζεται συμπληρωματική θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα, ακτινοβολία και χημειοθεραπεία (Wilkinson & Scott-Conner, 2008; Wolpin & Mayer, 2008).

Η πρόιμη διάγνωση της νόσου και η πρόληψή της με την αφαίρεση των προκαρκινικών βλαβών-πολύποδες του εντέρου μέσω του προληπτικού ελέγχου σχετίζεται με ευνοϊκότερη πρόγνωση (Hegde *et al.*, 2008). Η πενταετής επιβίωση των ασθενών με διαγνωσμένο καρκίνο παχέος εντέρου είναι περίπου 50%. Σημαντική συμβολή σε αυτό έχουν οι βελτιωμένες χειρουργικές τεχνικές και τα σύγχρονα χημειοθεραπευτικά σχήματα σε συνδιασμό πάντοτε με τις αυξημένες δυνατότητες ανεύρεσης καρκίνου του παχέος εντέρου σε αρχικά στάδια.

1.3 Γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) / Πρωτεογλυκάνες (PGs)

Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) αποτελεί ένα πολύπλοκο δίκτυο μακρομορίων που καθορίζει την αρχιτεκτονική των ιστών του κάθε οργάνου και παρέχει στα κύτταρα πληροφορίες σε βιολογικό και μηχανικό επίπεδο. Η σύσταση της ECM περιλαμβάνει δομικές πρωτεΐνες, όπως κολλαγόνο και ελαστίνη, δομικά και λειτουργικά σύμπλοκα μακρομόρια, όπως οι πρωτεογλυκάνες (PGs), καθώς και

δομικές γλυκοπρωτεΐνες, όπως η λαμινίνη και η ινονεκτίνη. Το δίκτυο των μακρομορίων πέρα από το δομικό του ρόλο, ο οποίος κυρίως εστιάζεται στη δημιουργία υποστρώματος για την ανάπτυξη των κυττάρων, παίζει σημαντικό βιολογικό ρόλο. Τα μακρομόρια αυτά μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και της ECM επηρεάζοντας άμεσα ή έμμεσα κυτταρικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική προσκόλληση, η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Οι σημαντικές αυτές κυτταρικές λειτουργίες είναι συνάρτηση της σύστασης και της δομικής οργάνωσης των μακρομορίων της ECM. Κατά συνέπεια, η ECM θεωρείται ως ένα βιολογικά ενεργό δίκτυο που συμμετέχει και ρυθμίζει φυσιολογικά κυτταρικά γεγονότα, αλλά και την ανάπτυξη-εξέλιξη παθολογικών βιοχημικών-μοριακών μεταβολών (Aumailley *et al.*, 1998).

1.3.1 Γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs)

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) είναι γραμμικά, θειωμένα και αρνητικά φορτισμένα πολυμερή αποτελούμενα από επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες που περιέχουν ένα ουρονικό οξύ (D-γλυκουρονικό ή L-ιδουρονικό οξύ ή D-γαλακτόζη στην περίπτωση της θειικής κερατάνης) και μια εξοζαμίνη/αμινοσάκχαρο (D-γαλακτοζαμίνη ή D-γλυκοζαμίνη) (Gandhi & Mancera, 2008; Salmivirta *et al.*, 1996; Turnbull *et al.*, 2001). Οι εξοζαμίνες συνδέονται γλυκοζιτικά με το D-γλυκουρονικό, L-ιδουρονικό οξύ ή με D-γαλακτόζη και στη δισακχαριτική τους μονάδα εντοπίζονται N-ακέτυλο, O- ή N-θεικές ομάδες. Ο αριθμός των δισακχαριτικών μονάδων που αποτελούν μια γλυκοζαμινική αλυσίδα κυμαίνεται συνήθως στους 50 δισακχαρίτες και στη περίπτωση του υαλουρονικού οξέος φτάνει ως μερικές χιλιάδες. Οι GAGs διαφέρουν ως προς τον τύπο της εξοζαμίνης, της εξόζης ή του ουρονικού οξέος, καθώς και στη γεωμετρία του γλυκοζιτικού δεσμού μεταξύ των μονάδων αυτών.

Οι GAGs είναι θειωμένα και συνεπώς υψηλά αρνητικά φορτισμένα μόρια που εντοπίζονται στη φύση, έχοντας ανά δισακχαριτική μονάδα ένα αρνητικό φορτίο από το οξικό ανιόν (COO^-) και έως τέσσερα από τη θειική ρίζα (SO_4^-). Οι GAGs κυρίως εντοπίζονται ελεύθερες στην ECM ή στην επιφάνεια των κυττάρων ομοιοπολικά

συνδεδεμένες με τον πρωτεϊνικό κορμό των PGs. Το μέγεθος και η ποιότητα των γλυκοζαμινογλυκανικών (GAG) αλυσίδων είναι που προσδίδουν στις PGs τις χαρακτηριστικές τους λειτουργίες. Οι GAGs συμμετέχουν, μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με πληθώρα πρωτεϊνών, σε φυσιολογικές και παθολογικές κυτταρικές λειτουργίες-γεγονότα, όπως η διαφοροποίηση, η αγγειογένεση, ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η προσκόλληση. Οι GAGs διακρίνονται σε δύο κύριους τύπους, τις μη θειωμένες όπου κατατάσσεται το υαλουρονικό οξύ (HA) και τις θειωμένες GAGs που περιλαμβάνουν τις θεική χονδροϊτίνη (CS), θεική δερματάνη (DS), θεική κερατάνη (KS), θεική ηπαράνη (HS) και ηπαρίνη (Heparin).

1.3.1α Υαλουρονικό οξύ (HA)

Το υαλουρονικό οξύ (HA) είναι ένας γραμμικός, αρνητικά φορτισμένος, μεγαλομοριακός, φυσικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες β-D-γλυκουρονικού οξέος και N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης (D-GlcA-β1,3-D-GlcNAc-β1,4), οι οποίες συνδέονται αποκλειστικά με β-γλυκοζιτικούς δεσμούς (Εικόνα 1.1) (Girish & Kemparaju, 2007; Kogan *et al.*, 2007; Stern *et al.*, 2006; Tammi *et al.*, 2008). Ο αριθμός των δισακχαριτών ποικίλει, ανάλογα με τον ιστό προέλευσης και τις συνθήκες, από 2000 έως 25000 μονάδες, που αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος μεταξύ 2×10^5 και 10×10^7 Da και σε μήκος έως και 25 μm (Toole, 2002; Tammi *et al.*, 2008). Το HA εντοπίζεται σε όλους σχεδόν τους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, καθώς και σε άλλα σπονδυλωτά, ενώ είναι πίο άφθονο στην ECM του συνδετικού ιστού των μαλακών μορίων (Girish & Kemparaju, 2007; Kogan *et al.*, 2007). Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους τύπους των GAGs, το HA δεν φέρει θεικές ομάδες και δεν συνδέεται ομοιοπολικά με πρωτεϊνικό κορμό, όμως μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις πρωτεογλυκάνες και με άλλες πρωτεΐνες για την οργάνωση του περικυττάριου και εξωκυττάριου χώρου (Laurent & Fraser, 1992; Tammi *et al.*, 2008).

Το HA, παρά την απλή του δομή και ενώ αρχικά θεωρείτο ως αδρανές μοριακό στοιχείο του συνδετικού ιστού, επηρεάζει φυσιολογικές και μη κυτταρικές λειτουργίες και συμμετέχει στην ομοίωση των ιστών (Toole *et al.*, 2002; Kogan *et*

al., 2007). Ρυθμίζει την ενυδάτωση και τις φυσικές ιδιότητες των ιστών χάρις στην ικανότητά του να προσδένει μεγάλα ποσά νερού έως και περίπου 1000 φορές το βάρος του. Επίσης, ασκεί επίδραση στις βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες του εξωκυττάριου και περικυττάριου χώρου αλληλεπιδρώντας με εξωκυττάρια μόρια, όπως η αγγρικάνη και η βερσικάνη (Heldin, 2003). Το HA ενεργοποιεί ενδοκυτταρικά μονοπάτια και επηρεάζει την κυτταρική συμπεριφορά μέσω της δέσμησης και της αλληλεπίδρασής του με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, όπως τους CD44, RHAMM, LYVE-1, HARE, LEC και TLR-4 (Girish & Kemparaju, 2007).

Μετά από πρόσφατες μελέτες αναγνωρίζεται ο σημαντικός ρόλος του HA στην εμβρυογένεση, στην κυτταρική προσκόλληση, διαφοροποίηση, μετανάστευση και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο βιολογικός ρόλος των ποικίλων πολυμερών του HA καθορίζεται από το μέγεθος του μορίου. Ποσοτικές αλλαγές του HA έχουν παρατηρηθεί σε πολλές παθολογικές καταστάσεις/ασθένειες, όπως στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, σε χρόνιες φλεγμονές και στον καρκίνο (Heldin, 2003; Kogan *et al.*, 2007; Tammi *et al.*, 2008). Μελέτες αναφέρουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη επιθηλιακών καρκινωμάτων του παχέος εντέρου σε μικροπεριβάλλον του στρώματος πλούσιο σε HA. Οι αλληλεπιδράσεις του περικυττάριου HA και των CD44 υποδοχέων των επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων ενεργοποιούν κυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης σημαντικά για την εξέλιξη του όγκου (Toole, 2002; Kim *et al.*, 2004; Misra *et al.*, 2008).

1.3.1β Θεική χονδροϊτίνη (CS)

Το μοτίβο της επαναλαμβανόμενης δισακχαριτικής μονάδας της θεικής χονδροϊτίνης (CS) που αποτελείται από β-D-γλυκουρονικό οξύ και D-N-ακετυλογαλακτοζαμίνη (D-GlcA-β1,3-D-GalNAc-β1,4), μπορεί να τροποποιηθεί από τις θεικές ομάδες, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στις θέσεις C-4 και/ή C-6 της γαλακτοζαμίνης και/ή στις θέσεις C-2 ή C-3 του γλυκουρονικού οξέος (Εικόνα 1.1). Η CS προσδένεται στις υπομονάδες της σερίνης των πρωτεϊνικών κορμών μέσω ενός γλυκοζιτικού δεσμού τεσσάρων σακχάρων που αποτελείται από ξυλόζη, δύο μόρια

γαλακτόζης και γλυκουρονικό οξύ (Asimakoroulou *et al.*, 2008; Lamari & Karamanos, 2006; Lauder, 2009).

Οι αλυσίδες CS είναι άφθονες στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς και σε άλλα θηλαστικά και σε ασπόνδυλα, γεγονός που αντανάκλα τον σημαντικό τους ρόλο στις βιολογικές λειτουργίες. Αποτελεί κύριο δομικό στοιχείο του αρθρικού χόνδρου παρέχοντάς του ελαστικότητα. Η δομή και η θείωση των CS αλυσίδων ποικίλουν ανάλογα με την πηγή προέλευσης ασκώντας επίδραση στις λειτουργίες τους (Lauder, 2009). Επίσης, η θείωση της CS μεταβάλλεται σε παθολογικές καταστάσεις, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της οστεοαρθρίτιδας στην οποία αλλάζει η θείωση των αλυσίδων CS στο χόνδρο και στο αρθρικό υγρό (Mankin & Lippiello, 1971; Plaas *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 1999). Δομικές αλλαγές των CS αλυσίδων επηρεάζουν τις βιολογικές ιδιότητες των CSPGs. Έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στην δομή της βερσικάνης και της διακοσμιτίνης στον καρκίνο του παχέος εντέρου του ανθρώπου όπου οι αλυσίδες DS αντικαθίστανται από αλυσίδες CS που περιέχουν κυρίως μη θειωμένους και θειωμένους στη θέση C-6 δισακχαρίτες (Asimakoroulou *et al.*, 2008).

Μελέτες επισημαίνουν το ρόλο της CS στον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών αλλά και των καρκινικών κυττάρων, καθώς επίσης στη κινητικότητα, προσκόλληση και την μεταναστευτική τους ικανότητα (Aguiar *et al.*, 2005; Fthenou *et al.*, 2006; Fthenou *et al.*, 2007; Nikitovic *et al.*, 2007; Sirko *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2004).

1.3.1γ Θεική δερματάνη (DS)

Η θεική δερματάνη (DS), γνωστή και ως θεική χονδροϊτίνη Β (CS-B), είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης του οποίου οι δισακχαριτικές ομάδες αποτελούνται από μια Ν-ακετυλο-γαλακτοζαμίνη και ένα ουρονικό οξύ, το οποίο μπορεί να βρίσκεται είτε με τη μορφή γλυκουρονικού οξέος είτε ιδουρονικού οξέος (L-IdoU-α1,3-D-GalNAc-β1,4) (Εικόνα 1.1) (Rosenberg *et al.*, 1985; Choi *et al.*, 1989). Η παρουσία του ιδουρονικού οξέος στο μόριο της DS προσδίδει ελαστικότητα στη διαμόρφωσή της και μεγάλο αρνητικό φορτίο (Comper *et al.*, 1978; Sanderson *et al.*,

1987). Οι αλυσίδες της DS τροποποιούνται από τη θείωση στις θέσεις C-4 και C-6 της εξοζαμίνης και στη θέση C-2 του ιδουρονικού οξέος (Trowbridge & Gallo, 2002).

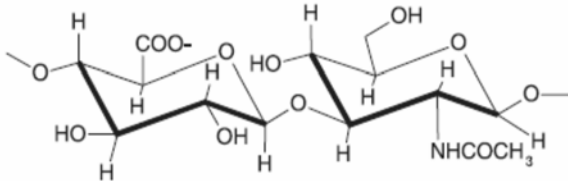
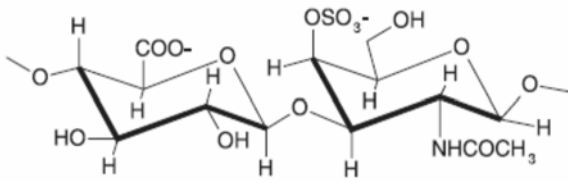
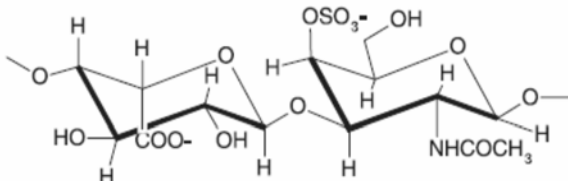
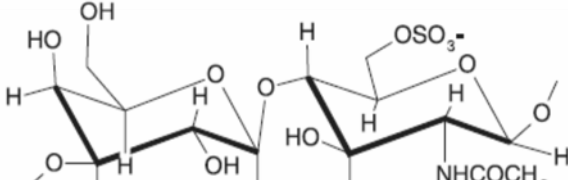
Μελέτες αναφέρουν ότι αλλαγές στις DS αλυσίδες, που αφορούν το μέγεθος, τη σύνθεση των δισακχαριτών και τη θείωση, καθορίζουν την ικανότητα πρόσδεσής της και ελέγχουν λειτουργικές αλληλεπιδράσεις με πιθανά πρωτεϊνικά μόρια-προσδέτες. Η DS εντοπίζεται σε πολλούς ιστούς του ανθρώπινου σώματος, ενώ αποτελεί κύριο συστατικό του δέρματος και απελευθερώνεται σε μεγάλες ποσότητες κατά την επούλωση των πληγών. Η DS συμμετέχει σε φυσιολογικές και παθολογικές αποκρίσεις, όπως στην πήξη του αίματος, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στις μολύνσεις και στην καρκινογένεση (Trowbridge & Gallo, 2002; Denholm *et al.*, 2000; Westergren-Thorsson *et al.*, 1993; Daidouji *et al.*, 2002).

1.3.1δ Θεϊκή κερατάνη (KS)

Η θεϊκή κερατάνη (KS) είναι ένα γραμμικό πολυμερές αποτελούμενο από επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες γαλακτόζης και N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης ενωμένες με $\beta 1 \rightarrow 4$ γλυκοζιτικό δεσμό (D-Gal- $\beta 1,4$ -D-GlcNAc- $\beta 1,3$) (Εικόνα1.1). Υπάρχουν εστεροποιημένες θεϊκές ομάδες στη θέση C-6 της γαλακτόζης και/ή της γλυκοζαμίνης. Το μέγεθος της ανθρακικής της αλυσίδας της KS, καθώς επίσης και ο βαθμός θείωσής της ποικίλουν με αποτέλεσμα το μοριακό της βάρος να κυμαίνεται από 4-20 kDa (Hascall & Riolo, 1972; Murata & Yokoyama, 1987).

Οι τύποι της KS προσδιορίζονται με βάση τη δομή του δεσμού και όχι ανάλογα με τον ιστό προέλευσης. Η KSI προσδένεται μέσω N-γλυκοζιτικού δεσμού στην ασπαραγίνη του πρωτεϊνικού κορμού και εντοπίζεται κυρίως στον κερατοειδή χιτώνα του ματιού, καθώς και στις μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRPs), όπως η λουμικάνη, η αγκρικάνη, η ινομοδουλίνη και η οστεοαντχερίνη (Ameye *et al.*, 2002; Raouf *et al.*, 2002; Ninomiya *et al.*, 2007; Funderburgh, 2000). Η KSII συνδέεται μέσω O-γλυκοζιτικών δεσμών στη σερίνη ή θρεονίνη του πρωτεϊνικού κορμού και βρίσκεται κυρίως στο χόνδρο. Ένας τρίτος τύπος KS, η

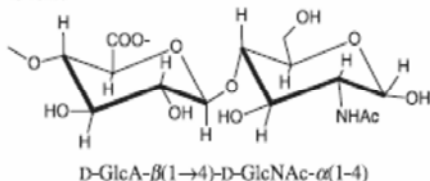
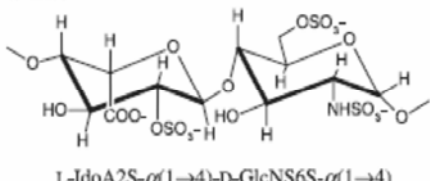
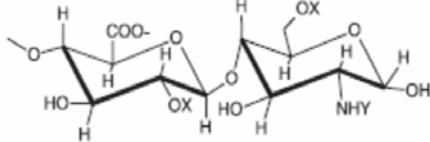
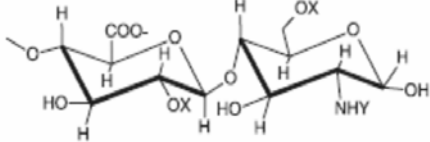
KSIII, έχει περιγραφεί στις πρωτεογλυκάνες του εγκεφάλου, όπου οι αλυσίδες KS προσδένονται στη σερίνη/θρεονίνη του πρωτεϊνικού κορμού μέσω ενός μορίου μαννόζης (Funderburgh, 2002; Hoffmann *et al.*, 1967; Choi *et al.*, 1975). Η παρουσία μεγάλης ποσότητας KS στον κερατοειδή χιτώνα σχετίζεται με τη διατήρηση της ενυδάτωσης του ιστού που είναι κρίσιμη για τη διαφάνεια του κερατοειδούς. Όμως, οι αλυσίδες KS εντοπίζονται και σε άλλους ιστούς όπου φαίνεται να έχουν λειτουργικό ρόλο στην κυτταρική αναγνώριση των πρωτεϊνών-προσδέτες και στην κινητικότητα των κυττάρων (Funderburgh, 2000).

| Glycosaminoglycan | Disaccharide units | Features |
|----------------------------|--|---|
| Hyaluronic acid |  <p>D-GlcA-β(1→4)-D-GlcNAc-α(1→4)</p> | <p>Molecular weight 4–8000 kDa</p> <p>Non-sulphated non-covalently attached to proteins in the ECM; also found in bacteria</p> <p>Usually found in synovial fluid, vitreous humour, ECM of loose connective tissue</p> <p>Excellent lubricators and shock absorbers</p> |
| Chondroitin sulphate |  <p>D-GlcA-β(1→3)-D-GalNAc4S-β(1→4)</p> | <p>Molecular weight 5–50 kDa</p> <p>Most abundant GAG in the body</p> <p>Found in cartilage, tendon, ligament, aorta</p> <p>Bind to proteins (like collagen) to form proteoglycan aggregates</p> |
| Dermatan sulphate |  <p>L-IdoA-α(1→3)-D-GalNAc4S-β(1→4)</p> | <p>Molecular weight 15–40 kDa</p> <p>Found in skin, blood vessels, heart valves</p> |
| Keratan sulphates I and II |  <p>D-Gal-β(1→4)-D-GalNAc6S-β(1→3)</p> | <p>Molecular weight 4–19 kDa</p> <p>Most heterogeneous GAG</p> <p>KS I is found in the cornea</p> <p>KS II is found in cartilage aggregated with CS</p> |

Εικόνα 1.1. Επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες των γλυκοζαμινογλυκανών HA, CS, DS και KS (Gandhi *et al.*, 2008).

1.3.1ε Θεϊκή ηπαράνη (HS) και ηπαρίνη (heparin)

Η ηπαρίνη και η θεϊκή ηπαράνη (HS) είναι γραμμικοί και αρνητικά φορτισμένοι πολυσακχαρίτες, των οποίων η επαναλαμβανόμενη δισακχαριτική μονάδα αποτελείται από N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη και ουρονικό οξύ, είτε με τη μορφή γλυκουρονικού οξέος, είτε του επιμερούς του στη θέση C-5 ιδουρονικού οξέος (D-GlcA-β1,4-D-GlcNAc-α1,4 ή L-IdoA-α1,4-D-GlcN-α1,4) (Εικόνα 1.2). Εστεροποιημένες Ο-θεϊκές ομάδες μπορούν να υπάρξουν στη θέση C-6 της γλυκοζαμίνης και στη θέση C-2 του ουρονικού οξέος. Επίσης, δεν είναι τόσο σπάνια η Ο-θειώση στον C-2 του ουρονικού οξέος και του C-3 της Ν-θειωμένης γλυκοζαμίνης. Η γλυκοζαμίνη μπορεί να είναι Ν-ακετυλιωμένη ή Ν-θειωμένη γεγονός που δημιουργεί περιοχές υποπήφιος για περαιτέρω δομικές τροποποιήσεις στην αλυσίδα (Skidmore *et al.*, 2008). Το μοριακό μέγεθος των πολυσακχαριτών κυμαίνεται από 10-70 kDa, ωστόσο συνήθως βρίσκεται κάτω από 15 kDa.

| Property | Heparan sulphate | Heparin |
|--|--|---|
| Sulphate versus hexosamine content | 0.8-1.8 | 1.8-2.4 |
| 2-deoxy-2-sulphamido-α-D-glucoopyranosyl content | 40-60% | >85% |
| α-L-Iduronic acid content | 30-50% | >70% |
| Site of synthesis | Extracellular component found in the basement membrane and as a ubiquitous component of cell surfaces | Intracellular component of mast cells, especially in the liver, lungs and skin |
| Mass | 10-70 kDa | 10-12 kDa |
| Major disaccharide repeating units |  D-GlcA-β(1→4)-D-GlcNAc-α(1→4) |  L-IdoA2S-α(1→4)-D-GlcNS6S-α(1→4) |
| Minor (variable) disaccharide repeating units (X = H or SO ₃ ⁻ , Y = Ac, SO ₃ ⁻ or H) |  D-GlcA-β(1→4)-D-GlcNAc-α(1→4) |  L-IdoA2S-α(1→4)-D-GlcNS6S-α(1→4) |

Εικόνα 1.2. Διαφορές μεταξύ αλυσίδων θεϊκής ηπαράνης (HS) και ηπαρίνης (Gandhi *et al.*, 2008).

Οι διαφορές μεταξύ της HS και της ηπαρίνης είναι κυρίως ποσοτικές και όχι ποιοτικές και εξαιτίας της δομικής τους ομοιότητας δεν είναι εύκολος ο διαχωρισμός

τους (Εικόνα 1.2). Οι αλυσίδες HS περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό ακετυλιωμένης γλυκοζαμίνης, είναι λιγότερο θειωμένες και παρουσιάζουν μεγαλύτερη δομική ποικιλία σε σχέση με την ηπαρίνη. Το ιδουρονικό οξύ εντοπίζεται σε υψηλότερα επίπεδα στην ηπαρίνη, γεγονός που την καθιστά έντονα θειωμένη και περισσότερο αρνητικά φορτισμένη (Turnbull & Gallagher, 1991; Mulloy & Forster, 2000; Salmivirta *et al.*, 1996; Skidmore *et al.*, 2008; Gandhi & Mancera, 2008). Η ηπαρίνη συντίθεται και αποθηκεύεται στα μαστοκύτταρα του συνδετικού ιστού, εντοπίζεται στο ήπαρ, στους μύες, στο δέρμα, στο έντερο, στους λεμφαδένες και στους πνεύμονες, ενώ η HS εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια όλων σχεδόν των κυττάρων των θηλαστικών και στην ECM με πρωτεογλυκανική μορφή (Skidmore *et al.*, 2008; Gandhi & Mancera, 2008; Middeldorp, 2008).

Η αντιπηκτική δράση της ηπαρίνης αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο της θεραπείας και της πρόληψης της θρόμβωσης για πολλές δεκαετίες και δρα δεσμευόμενη στην αντιθρομβίνη μέσω ενός πεντασακχαρίτη ασυνήθιστης δομής. Η δέσμευση της ηπαρίνης στην αντιθρομβίνη III επάγει αλλαγές στη στερεοδιάταξη της ώστε αυτή με τη σειρά της αναστέλλει τη θρομβίνη και άλλες πρωτεάσες που συμμετέχουν στην πήξη του αίματος, όπως ο παράγοντας Χα (Middeldorp, 2008). Μελέτες

Πίνακας 1.1. Βιολογικές (μη αιμοστατικές) ιδιότητες της ηπαρίνης (Μακρής, 1999).

1. αναστολή του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών ινών.
2. αναστολή της αύξησης των σκελετικών μυών.
3. ρύθμιση της αγγειογένεσης.
4. διέγερση της μετανάστευσης των λευκοκυττάρων.
5. ανοσοτροποποιητική.
6. μείωση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας μετά την επανασηρραγγοποίηση.
7. προφύλαξη από την αρτηριοσκλήρυνση.
8. επίδραση στην ινώδη δομή του κολλαγόνου.
9. αναστολή της παραγωγής της αλδοστερόνης.
10. αναστολή των ελαστασών.
11. διεγείρει τη μεσολάβηση της ελασάσης στην αναστολή της ΑΓ.
12. εισάγει την οστεοπόρωση.
13. επίδραση στην επούλωση των πληγών.
14. αναστολή των ηπαρινασών.

αποδεικνύουν ότι οι ολιγοσακχαρικές αλληλουχίες της ηπαρίνης δεν σχετίζονται μόνο με την επίδρασή της στο μηχανισμό της αιμόστασης, αλλά είναι υπεύθυνες και για πολλαπλές βιολογικές δράσεις της ηπαρίνης, τονίζοντας ότι η αντιπηκτική της ιδιότητα δεν είναι αναγκαστικά η κύρια δράση της (Πίνακας 1.1) (Μακρής, 1999; Niers *et al.*, 2007).

Σε *in vitro* μελέτες έχει δειχθεί ότι η ηπαρίνη και οι αλυσίδες HS αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν τη δράση ενζύμων, κυτοκινών, μορίων της ECM (ινονεκτίνη, λαμινίνη), μορίων προσκόλλησης (ιντεγκρίνες, σελεκτίνες) και μεμβρανικών πρωτεϊνών διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών (Πίνακας 1.2) (Powell *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2006; Pelosi *et al.*, 2007). Επίσης, έχει αποδειχθεί η αλληλεπίδραση των HS και της ηπαρίνης με ποικίλους αυξητικούς παράγοντες (FGF2, HGF, VEGF, PDGF-AA, μέλη της EGF οικογένειας) και/ή με τους υποδοχείς τους (Πίνακας 1.2), συμμετέχοντας με τον τρόπο αυτό στη ρύθμιση των

Πίνακας 1.2. Μόρια του εξωκυττάριου χώρου με τα οποία αλληλεπιδρούν οι αλυσίδες HS και η ηπαρίνη (Taylor & Gallo, 2006).

| HS/Hep ligands, GAG sequence known: | GAG sequence: |
|--|---|
| Anti-thrombin III Basic FGF (FGF2) Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) Herpes simplex virus gD | GlcNAc(6S)-GlcA-GlcNS(3S) (6S?)-IdoA(2S)-GlcNS(6S) GlcNS-GlcA-GlcNS-IdoA(2S)-GlcNS GlcA-GlcNS-IdoA-GlcNS-IdoA-GlcNS-IdoA-GlcNAc GlcA-GlcNS-IdoA(2S)-GlcN(3S) (6S?)-GlcA(2S?)-GlcNS |
| HS/Hep ligands, GAG sequence unknown: | |
| Growth factors: EGF family FGFs 1-15 IGF-II PDGF-AA TGFβ-1, -2 VEGF | Cytokines/chemokines: GM-CSF IL-8 (CXCL8) IP-10 MCP-1 and MCP-4 RANTES TNFα |
| Extracellular matrix components: Fibrin Fibronectin Laminin Thrombospondin Vitronectin | Adhesion molecules: L-selectin MAC-1 N-CAM P-selectin PECAM-1 |
| Microbes and microbial products: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bordetella pertussis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Enzymes and inhibitors: Heparin cofactor II Lipoprotein lipase Neutrophil elastase Plasminogen activator inhibitor Tissue plasminogen activator |

ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών και κατ'επέκταση σε πολλές βιολογικές λειτουργίες, όπως η εμβρυογένεση, η απόπτωση, η ανάπτυξη, η μετανάστευση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (Skidmore *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2006; Aguiar *et al.*, 2005; Flint *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2006; Sasaki *et al.*, 2000; Forsten *et al.*, 2000).

Η ηπαρίνη έχειδειχθεί ότι συμμετέχει σε ποικίλα στάδια της εξελικτικής διαδικασίας του καρκίνου. Μελέτες επισημαίνουν την ανασταλτική δράση της ηπαρίνης στην προσκόλληση και στη μετανάστευση των μελανοκυττάρων και των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Bobek & Kovarik, 2004). Ένας σημαντικός μηχανισμός της αντιμεταστατικής δράσης της ηπαρίνης φαίνεται να είναι η αναστολή της αλληλεπίδρασης των σελεκτινών με τους προσδέτες τους στα αρχικά στάδια της μεταστατικής διαδικασίας (Varki & Varki, 2001; Engelberg, 1999). Επίσης, η ηπαρίνη έχει αναφερθεί ότι οδηγεί τα κύτταρα του ρινοφαρυγγικού καρκινώματος σε απόπτωση, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αποπτωτική οδό (Li *et al.*, 2001).

Αντιφατικά πειραματικά δεδομένα υπάρχουν για τη δράση της ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Πολλές μελέτες επισημαίνουν την ανασταλτική δράση της ηπαρίνης στον *in vitro* πολλαπλασιασμό ποικίλων κυτταρικών σειρών, όπως των λείων μυικών κυττάρων των αγγείων, των φυσιολογικών ινοβλαστών, των μεσεγχυματικών κυττάρων, των οστεοβλαστών και των κυττάρων οστεοσαρκώματος του ανθρώπου (Au *et al.*, 1993; Ferrao & Mason, 1993; Westergren-Thorsson & Persson, 1993; Nikitovic *et al.*, 2005; Hausser & Brenner, 2004; Flint *et al.*, 1994). Υπάρχουν όμως και μελέτες που δείχνουν ότι η ηπαρίνη αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, των κυττάρων λευχαιμίας και των καρκινικών κυττάρων του στομάχου (Flint *et al.*, 1994; Maurer *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2006). Η ηπαρίνη διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, γεγονός που οδηγεί συχνά στη θεραπευτική της χρήση κατά της αρτηριοσκλήρυνσης, ενώ ταυτόχρονα παρεμβαίνει ανασταλτικά στην ανάπτυξη των λείων μυικών ινών των τοιχωμάτων των αγγείων (Μακρής, 1999). Επίσης, ο πολλαπλασιασμός των λείων μυικών κυττάρων των αγγείων και των περικυττάρων των αγγείων των πνευμόνων μειώνεται από τη δράση της ηπαρίνης, η οποία δεν επηρεάζει την κυτταρική απόπτωση, αλλά εμποδίζει τη μετάβαση από τη φάση G0 στη φάση S του

κυτταρικού κύκλου αυξάνοντας την έκφραση του p21 γονιδίου (Castellot *et al.*, 1985; Khoury & Langleben, 2000). Η ανασταλτική επίδραση της ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών κυττάρων των αγγείων των αρουραίων έχει επίσης συσχετιστεί με την αναστολή της δράσης των πρωτεϊνικών κινασών ενεργοποιούμενες από μιτογόνα (MAPKs).

1.3.2 Βιοσύνθεση των γλυκοζαμινογλυκανών

Ο πρωτεϊνικός κορμός όλων των GAGs, με εξαίρεση το HA, παράγεται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και υφίσταται μετα-μεταφραστική τροποποίηση από τις γλυκοσυλτρανσφεράσες στη συσκευή Golgi, όπου οι δισακχαρικές ομάδες των GAGs προστίθενται στον πρωτεϊνικό κορμό ώστε να σχηματιστούν οι πρωτεογλυκάνες. Η βιοσύνθεση των GAGs είναι στενά συνδεδεμένη με τον μεταβολισμό της γλυκόζης στα θηλαστικά (Grebner *et al.*, 1966; Kjellen *et al.*, 1991).

Η έναρξη της βιοσύνθεσης των GAGs συνδέεται με την προσθήκη του αναγωγικού άκρου της ξυλόζης στο κατάλοιπο σερίνης/θρεονίνης του πρωτεϊνικού κορμού με τη βοήθεια του ενζύμου ξυλοσυλτρανσφεράση. Εξαίρεση αποτελούν η θειική κερατάνη και το υαλουρονικό οξύ. Οι αλυσίδες της KS προσδένονται στον πρωτεϊνικό κορμό, είτε μέσω της πρόσδεσης N-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc) - ασπαραγίνης, είτε N-ακετυλογαλακτοζαμίνης (GalNAc) - σερίνης/θρεονίνης. Το HA συντίθεται ως GAG, χωρίς να προσδέεται ομοιοπολικά σε πρωτεϊνικό κορμό. Το σημείο πρόσδεσης της σερίνης για τον πολυμερισμό της CS/DS και της HS/ηπαρίνης εντοπίζεται στο διπεπτιδίο της σερίνης-γλυκίνης ή σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες όξινων αμινοξέων (Kolset *et al.*, 2004; Grebner *et al.*, 1966; Kjellen *et al.*, 1991; Sugahara *et al.*, 2000; Sugahara *et al.*, 2003).

Η πρώτη φάση του πολυμερισμού της CS/DS και της HS/ηπαρίνης ολοκληρώνεται με το σχηματισμό ενός τετρασακχαρίτη Xyl-Gal-Gal-GlcA. Οι μονάδες της γαλακτόζης μεταφέρονται από τη UDP-γαλακτόζη στην αρχική αλυσίδα με τη βοήθεια των ενζύμων γαλακτοσυλτρανσφεράση I και II, αντίστοιχα. Το τελευταίο μέλος της ολιγοσακχαρικής μονάδας, το γλυκουρονικό οξύ, μεταφέρεται

από το UDP-GlcA με το ένζυμο γλουκουρονυλτρανσφεράση I. Στη συνέχεια, η προσθήκη N-ακετυλογαλακτοζαμίνης ή N-ακετυλογλυκοζαμίνης στην αλυσίδα, από τα ένζυμα GalNAc ή GlcNAc, οδηγεί στο σχηματισμό CS/DS ή HS/ηπαρίνης, αντίστοιχα. Η επιμήκυνση των αλυσίδων επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ενζύμων πολυμεράσης θειικής χονδροϊτίνης/δερματάνης (ChSy) και θειικής ηπαράνης/ηπαρίνης (EXT1/2), τα οποία προσθέτουν δισακχαρτικές ομάδες GalNAc/GlcA ή GlcNAc/GlcA αντίστοιχα, με τη ταυτόχρονη προσθήκη των ομάδων θείου. Ο ανόργανος φώσφορος ενεργοποιείται με τη βοήθεια του ATP σε φωσφοαδενοσουλφωσφοθειικό (PAPS), που δίνει τη φωσφορική του ομάδα στις GAGs. Ειδικά ένζυμα, οι σουλφοτρανσφεράσες, καταλύουν αυτή την αντίδραση δίνοντας τη θειική ομάδα σε συγκεκριμένες θέσεις των μονάδων εξοζαμίνης ή του ιδουρονικού οξέος και περιστασιακά του γλυκουρονικού οξέος. Η βιοσύνθεση της DS φαίνεται να είναι όμοια με αυτή της CS, με την εξαίρεση ότι το D-γλουκουρονικό οξύ επιμερίζεται σε L-ιδουρονικό οξύ (Kolset *et al.*, 2004; Skidmore *et al.*, 2008; De Luca *et al.*, 1973; Malmstrom & Fransson, 1975).

Το κύριο σημείο διαφοροποίησης της βιοσύνθεσης της HS και της CS είναι η αποακετυλίωση και η N-θείωση των μονάδων της εξοζαμίνης. Το ένζυμο που έχει ρόλο-κλειδί στη βιοσύνθεση της HS/ηπαρίνης είναι η N-σουλφοτρανσφεράση (NDST) (Kolset *et al.*, 2004). Το πρόδρομο πολυμερές στην βιοσύνθεση των HS/ηπαρίνης αρχικά τροποποιείται μέσω αποακετυλίωσης και θείωσης των μονάδων GlcNAc για να δημιουργηθεί ένα μερικώς θειωμένο προϊόν το οποίο αναγνωρίζει ως υπόστρωμα η C5-επιμεράση του γλυκουρονικού οξέος. Για να αναγνωριστεί μια ομάδα γλυκουρονικού οξέος από την επιμεράση, απαιτείται η ύπαρξη θείωσης στην μονάδα της GlcNAc που βρίσκεται συνδεδεμένη με τον C4 του GlcA. Περαιτέρω τροποποιήσεις περιλαμβάνουν θείωση στις C2 του IdoA και C6 των GlcNAc ή GlcNSO₃, αλλά αν και σπάνια και στον C2 του GlcA και τον C3 της GlcNSO₃ (Sugahara & Kitagawa, 2002). Η παραγωγή της ηπαρίνης περιλαμβάνει εκτεταμένες τροποποιήσεις. Το προϊόν αυτό περιέχει σχετικά λίγες μονάδες GlcNAc και GlcA, και μεγάλα ποσοστά από GlcNSO₃, IdoA καθώς και O-θειωμένες θέσεις. Αντίθετα, στην HS η οποία έχει διαφορετική δομή, οι μονάδες του ιδουρονικού οξέος εντοπίζονται στις περιοχές με N-θείωση και στις περιοχές που έχουν μίγμα N-θείωσης και N-

ακετυλίωση, αλλά όχι σε αυτές με συνεχόμενη N-ακετυλίωση (Hook *et al.*, 1974; Sasisekharan & Venkataraman, 2000). Μετά από δομικές αναλύσεις, φαίνεται ότι η ηπαρίνη είναι υψηλά θειωμένη, ενώ η HS είναι έντονα θειωμένη σε συγκεκριμένες περιοχές (Kolset *et al.*, 2004).

Οι αλυσίδες της KS προσδένονται στον πρωτεϊνικό κορμό μέσω N-γλυκοζιτικού δεσμού στις μικρού μοριακού βάρους PGs ή μέσω O-γλυκοζιτικού δεσμού στις μεγάλου μεγέθους PGs. Στην πρώτη περίπτωση συντίθεται ένας ολιγοσακχαρίτης συνδεδεμένος με ένα λιποειδές, ο οποίος μεταφέρεται στη πρωτεΐνη που βρίσκεται στο ριβόσωμα. Μέσω των α-γλυκοσιδασών αποικοδομείται μέρος του πρόδρομου ολιγοσακχαρίτη και αρχίζει η προσθήκη των σακχάρων ως δομικών μονάδων της GAG. Στην δεύτερη περίπτωση, η περιοχή σύνδεσης αποτελείται από έναν διακλαδιζόμενο ολιγοσακχαρίτη GalNAc, συνδεδεμένο μέσω ενός υπόλοιπου σερίνης ή θρεονίνης με τον πρωτεϊνικό κορμό. Η KS επιμηκύνεται με τη βοήθεια ενζύμων, γλυκοσυλτρανσφερασών, τα οποία προσθέτουν εναλλάξη μια συνδεόμενη με σιαλικό οξύ γαλακτόζη και μια γαλακτόζη στο αναπτυσσόμενο πολυμερές (Funderburgh, 2002; Funderburgh, 2000).

Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες GAGs, το HA συντίθεται στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης ως ένα ελεύθερο, γραμμικό πολυμερές χωρίς να είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με πρωτεϊνικό κορμό. Τα μόρια του HA δεν περιέχουν θεικές ή εστεροποιημένες ομάδες. Στα θηλαστικά, μία οικογένεια διαμεμβρανικών γλυκοσυλτρανσφερασών, οι συνθάσες HAS1, HAS2 και HAS3, ρυθμίζουν τη βιοσύνθεση του HA. Οι συνθάσες του HA μεταφέρουν εναλλακτικά το UDP-επιμηκυσμένο μεγαλομόριο σε UDP-γλυκουρονικό οξύ και UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη στη συνεχώς αναπτυσσόμενη αλυσίδα του HA. Κάθε HAS ισομορφή επηρεάζει το περιεχόμενο του HA στην ECM του κυττάρου. Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι οι HAS1 και HAS2 πρωτεΐνες πολυμερίζουν αλυσίδες HA έως και 2×10^6 Dalton, ενώ η HAS3 συνθέτει αλυσίδες μεγέθους των 2×10^5 Dalton. Σε αντίθεση με άλλες GAGs, η επιμήκυνση του υαλουρονικού γίνεται με την προσθήκη των σακχάρων στο αναγωγικό άκρο και στη συνέχεια το νεοσυντιθέμενο HA κατά κύριο λόγο εκκρίνεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στην επιφάνεια του κυττάρου ή στην ECM. Παράλληλα με την επιμήκυνση πραγματοποιείται η ενυδάτωση και η

διόγκωση του μακρομορίου σχηματίζοντας ένα περικυτταρικό στρώμα. Τα νεοσυντιθέμενα μόρια κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης φαίνεται ότι κατακρατούνται στην κυτταρική επιφάνεια και στο ενεργό κέντρο του ένζυμου, χάρην της αλληλεπίδρασής τους με τον υποδοχέα CD44 του HA. Μειωμένη ικανότητα δέσμευσης των νεοσυντιθέμενων μορίων στον υποδοχέα, όπως παρατηρείται έπειτα από φωσφορυλίωση του CD44, έχει σαν συνέπεια το διαχωρισμό των νεοσυντιθεμένων μορίων και την επανενεργοποίηση της συνθάσης για το σχηματισμό νέων αλυσίδων. Το HA αποδομείται μέσω τριών διαφορετικών μονοπατιών με τη βοήθεια των υαλουρονιδασών (Hyal), που αποτελούν μια οικογένεια ενζύμων υπεύθυνη για τον καταβολισμό του HA. Τα μόρια του HA ποικίλουν σε μέγεθος και η διαφορετική επίδραση στις κυτταρικές λειτουργίες φαίνεται να σχετίζονται με το μέγεθος της αλυσίδας τους (Girish & Kemparaju, 2007; Stern *et al.*, 2006; Stuhlmeier, 2006; Kolset *et al.*, 2004; Itano & Kimata, 2002).

1.3.3 Πρωτεογλυκάνες (PGs)

Οι πρωτεογλυκάνες (PGs) είναι σύμπλοκα μακρομόρια που αποτελούνται από μία ή περισσότερες γραμμικές, θειωμένες αλυσίδες GAGs ομοιοπολικά συνδεδεμένες με έναν πρωτεϊνικό κορμό και εντοπίζονται στην ECM, στην κυτταρική επιφάνεια, ενώ υπάρχουν και ενδοκυττάρειες PGs. Το μοριακό μέγεθος των PGs ποικίλει ανάλογα με το μοριακό βάρος του πρωτεϊνικού κορμού και τον αριθμό των αλυσίδων GAG, προσδίδοντας στις PGs μοναδικές βιολογικές και φυσικοχημικές ιδιότητες (Kjellen *et al.*, 1991; Kolset *et al.*, 2004; Wegrowski & Maquart, 2004).

Οι PGs, εξαιτίας του υψηλού αρνητικού φορτίου τους, είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση του νερού στους ιστούς. Επίσης, έχει δειχθεί ότι οι PGs, μέσω του πρωτεϊνικού τους κορμού ή μέσω των GAG αλυσίδων τους, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυξητικούς παράγοντες και/ή με υποδοχείς αυτών, με μόρια προσκόλλησης και με το κολλαγόνο, επηρεάζοντας ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες. Ποιοτικές ή ποσοτικές αλλαγές στην παραγωγή των PGs έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη πολλών τύπων καρκίνου (Wegrowski & Maquart, 2004; Fjeldstad & Kolset, 2005).

Διακρίνονται διαφορετικές τάξεις των PGs ανάλογα με την εντόπισή τους στο κύτταρο, το είδος των GAGs που περιέχουν και την πρωτογενή δομή του πρωτεϊνικού τους κορμού.

1.3.3α Εξωκυττάρια πρωτεογλυκάνες

Οι εξωκυττάρια PGs περιλαμβάνουν τις υαλεκτάνες, τις μικρού μοριακού βάρους PGs πλούσιες σε λευκίνη (SLRPs) και τις PGs της βασικής μεμβράνης.

1.3.3α(i) Υαλεκτάνες

Οι υαλεκτάνες αποτελούν μία οικογένεια PGs που αλληλεπιδρούν με το HA και τις λεκτίνες. Η οικογένεια των υαλεκτανών περιλαμβάνει τέσσερα μέλη, τη βερσικάνη, την αγγρικάνη, τη μπρεβικάνη και τη νευρικάνη, τα οποία αποτελούνται από τρεις περιοχές, το N-τελικό άκρο που αποτελεί τη περιοχή δέσμευσης του HA, το κεντρικό τμήμα που φέρει τις αλυσίδες των GAGs και το C-τελικό άκρο που δεσμεύει τις λεκτίνες. Οι υαλεκτάνες έχουν κοινά χαρακτηριστικά στη δομή του πρωτεϊνικού τους κορμού, ενώ διαφέρουν στο κεντρικό τμήμα που φέρει τις CS αλυσίδες. Μελέτες *in vitro* αναφέρουν το ρυθμιστικό ρόλο των υαλεκτανών στην αλληλεπίδραση τόσο μεταξύ των κυττάρων, όσο και των κυττάρων με την ECM, καθώς επίσης τη συμμετοχή τους στη ρύθμιση της ανάπτυξης των νευραξόνων του νευρικού συστήματος (Iozzo, 1998; Schmalfeldt *et al.*, 1998).

Βερσικάνη. Η βερσικάνη αποτελεί τη μεγαλύτερη CSPG της οικογένειας των υαλεκτανών και εντοπίζεται σε πολλούς ιστούς, όπως στα λεία μυϊκά κύτταρα των τοιχωμάτων των αγγείων, στα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος και στα κύτταρα του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος. Αύξηση στην έκφραση της βερσικάνης, καθώς και μεταβολές στη δομή της, έχουν παρατηρηθεί σε κακοήθεις όγκους του παχέος εντέρου του ανθρώπου (Theocharis, 2002; Lin *et al.*, 2007). Πρόσφατες μελέτες επισημαίνουν τη σημασία της βερσικάνης στη ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης, του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης, ενώ

τονίζεται ο σημαντικός της ρόλος στην ανάπτυξη των ιστών καθώς και σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις (Rahmani *et al.*, 2006).

Ο πρωτεϊνικός κορμός της βερσικάνης αποτελείται από τρεις περιοχές. Η περιοχή G1 βρίσκεται στο N-τελικό άκρο της και αποτελείται από μια αλληλουχία που μοιάζει με ανοσοσφαιρίνη ακολουθούμενη από δύο διαδοχικές επαναλήψεις υπομονάδων που μοιάζουν με τη συζευκτική πρωτεΐνη και εμπλέκονται στη πρόσδεση του HA (HABR). Η κεντρική περιοχή G2 περιέχει τις GAG-α και GAG-β υπομονάδες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη πρόσδεση έως και 30 αλυσίδων CS/DS, καθώς και N-/O-ολιγοσακχαριτών. Τέλος, η περιοχή G3 αποτελείται από μια σειρά από επαναλαμβανόμενα δομικά μοτίβα όμοια με αυτά του EGF, ένα τμήμα που μοιάζει με τον C-τύπο λεκτίνης (CRD) και μια περιοχή που μοιάζει με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη του συμπληρώματος (CBP). Το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA της βερσικάνης στο κεντρικό τμήμα του πρωτεϊνικού κορμού που κωδικοποιεί την περιοχή πρόσδεσης των GAG αλυσίδων οδηγεί στη δημιουργία τεσσάρων ισομορφών της βερσικάνης, τις V0, V1, V2 και V3. Η V0 ισομορφή της βερσικάνης φέρει δύο περιοχές πρόσδεσης των GAGs, τις CSα και CSβ, ενώ στις μικρότερες ισομορφές V1 και V2 απουσιάζουν οι περιοχές CSα και CSβ, αντίστοιχα. Στη V3 ισομορφή απουσιάζουν όλα τα πιθανά σημεία πρόσδεσης των GAGs και συνεπώς αποτελείται μόνο από τις περιοχές G1 και G3. Το διαφορετικό μοτίβο έκφρασης των ισομορφών της βερσικάνης πιθανά υποδεικνύει τον διαφορετικό τους ρόλο στις κυτταρικές λειτουργίες (Iozzo, 1998; Wu *et al.*, 2005; Rahmani *et al.*, 2006; Wight, 2002).

Αγγκρικάνη. Η αγγκρικάνη αποτελείται από έναν πρωτεϊνικό κορμό 220 kDa στον οποίο προσδένονται αλυσίδες CS και KS. Εκφράζεται από τα χονδροκύτταρα και η ικανότητά της αφ' ενός μεν να δεσμεύει μεγάλες ποσότητες νερού και αφ' ετέρου να συνεργάζεται με το HA, την κάνει να προσδίδει στον αρθρικό χόνδρο ελαστικότητα στις δυνάμεις συμπίεσης. Επίσης, η αγγκρικάνη έχει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των χονδροκυττάρων μεταξύ τους καθώς και των χονδροκυττάρων με την ECM και ως εκ τούτου στη μορφογένεση και ανάπτυξης του χόνδρινου σκελετού κατά την διαδικασία της ανάπτυξης.

Ο πρωτεϊνικός κορμός της αγγρικής αποτελείται από τρεις περιοχές και σχετίζεται στενά η δομή της με αυτόν της βερσικής. Στο N-τελικό της άκρο εντοπίζεται η περιοχή G1 που περιέχει μια αλληλουχία που μοιάζει με ανοσοσφαιρίνη και στο C-τελικό άκρο βρίσκεται η περιοχή G3 αποτελούμενη από επαναλαμβανόμενα δομικά μοτίβα όμοια με εκείνο του EGF, ένα τμήμα που μοιάζει με τον C-τύπο λεκτίνης και μια περιοχή που μοιάζει με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη του συμπληρώματος. Μέσω του τμήματος που ομοιάζει με τον C-τύπο της λεκτίνης, η αγγρική εμπλέκεται με τρόπο εξαρτώμενο από τα ιόντα Ca^{2+} στη δέσμευση σακχάρων, με αποτέλεσμα να παίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις του εξωκυττάρου χώρου με τις κυτταρικές επιφάνειες. Στη περιοχή G2 βρίσκονται οι θέσεις πρόσδεσης των GAGs που μπορεί να φέρουν μέχρι και 100 αλυσίδες CS, μεγέθους των 20 kDa καθεμία. Οι αλυσίδες KS είναι λιγότερες, έως 60 στον αριθμό, και έχουν συνήθως μικρότερο μήκος. Η αγγρική μπορεί επίσης να περιέχει ποικίλο αριθμό O- και N-συνδεδεμένων ολιγοσακχαριτών (Luo *et al.*, 2000; Kiani *et al.*, 2002; Iozzo, 1998).

1.3.3α(ii) Μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRPs)

Οι μικρές πλούσιες σε λευκίνη PGs (SLRPs) αποτελούν μία ομάδα μορίων της ECM με δομική και λειτουργική ομολογία. Ο πρωτεϊνικός τους κορμός έχει μοριακό βάρος 40-50 kDa και ένα κεντρικό τμήμα αποτελούμενο από μοτίβα πλούσια σε λευκίνη (LRR), τα οποία χαρακτηρίζονται από κοινή μοριακή αρχιτεκτονική προσαρμοσμένη για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Στις περισσότερες SLRPs το κεντρικό τμήμα (LRR) συνορεύει με το αρνητικά φορτισμένο N-τελικό άκρο που περιέχει μόρια θειωμένης τυροσίνης και δισουλφιδικούς δεσμούς, καθώς και με τη C-τελική περιοχή στην οποία εντοπίζονται δύο συντηρημένα μοτίβα κυστεΐνης. Πολλές SLRPs φέρουν στη N-τελική περιοχή τους GAG αλυσίδες με διαφορετική χημική σύσταση, όπως CS/DS, αλλά και KS αλυσίδες (Nikitovic *et al.*, 2008; McEwan *et al.*, 2006).

Τα κύρια μέλη της οικογένειας των SLRPs ταξινομούνται με βάση τη φυλογενετική ανάλυση και τον αριθμό των επαναλήψεων των μορίων κυστεΐνης σε τρεις κατηγορίες. Η κατηγορία I περιλαμβάνει τη διακοσμιτίνη (decorin) και τη διγλυκάνη (biglycan), η κατηγορία II τις ινομοδουλίνη (fibromodulin), λουμικάνη (lumican), PRELP, κερατοκάνη (keratocan) και οστεοατχερίνη (osteoaderin) και η κατηγορία III τις επιφυκάνη (epiphycan) και οστεογλυκίνη/μιμεκάνη (osteoglycin/mimecan) (Hocking *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 1989; Oldberg *et al.*, 1989; Blochberger *et al.*, 1992; Bengtsson *et al.*, 1995; Sommarin *et al.*, 1998; Friedman *et al.*, 2000). Επίσης πρόσφατα έχουν ανακαλυφθεί η οπτικήνη (opticin) και η ασπορίνη (asporin) (Reardon *et al.*, 2000; Lorenzo *et al.*, 2001). Οι SLRPs συμμετέχουν στη ρύθμιση του σχηματισμού των ινών του κολλαγόνου, καθώς και στη δομική οργάνωση της ECM. Μελέτες αναφέρουν το σημαντικό ρόλο των SLRPs στις βιολογικές λειτουργίες μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με αυξητικούς παράγοντες (Nikitovic *et al.*, 2008; McEwan *et al.*, 2006).

Διακοσμιτίνη και διγλυκάνη. Η διακοσμιτίνη και η διγλυκάνη, δύο μόρια που αρχικά εντοπίστηκαν στον οστίτη ιστό και στο χόνδρο, παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στην γονιδιακή τους οργάνωση, που φτάνει το 57% σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Seidler *et al.*, 2008; Bereczki & Santha, 2008). Τόσο στη διακοσμιτίνη όσο και στη διγλυκάνη μπορούμε να διακρίνουμε τέσσερις περιοχές, τις I, II, III και IV. Η περιοχή I περιλαμβάνει το πεπτιδικό σήμα και ένα προπεπτίδιο του οποίου η λειτουργία δεν είναι πλήρως γνωστή (Fisher *et al.*, 1989). Στην περιοχή II εντοπίζονται τα σημεία πρόσδεσης των GAGs και τέσσερα κατάλοιπα κυστεΐνης (Iozzo, 1998; Neame *et al.*, 1989). Η περιοχή III αποτελείται από 10 επαναλαμβανόμενες περιοχές πλούσιες σε λευκίνη, η κύρια λειτουργία της οποίας είναι η δέσμευση και η αλληλεπίδραση με ίνες κολλαγόνου και άλλες πρωτεΐνες (Iozzo, 1999). Τέλος, στη περιοχή IV εντοπίζονται δύο κατάλοιπα κυστεΐνης και το C-τελικό άκρο των μορίων (Iozzo, 1998; Iozzo, 1999). Οι συγκεκριμένες SLRPs εντοπίζονται και σε μη γλυκοζυλιωμένη μορφή (Roughley *et al.*, 1993). Ο βαθμός γλυκοζυλίωσης και το είδος της GAG φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην οστεογένεση και τη χονδρογένεση (Rada *et al.*, 2000).

Ο πρωτεϊνικός κορμός της διακοσμιτίνης, μεγέθους 50 kDa, φέρει στο N-τελικό του άκρο μία CS ή DS αλυσίδα ανάλογα με τον ιστό προέλευσης. Η διακοσμιτίνη εντοπίζεται στον συνδετικό ιστό και εμφανίζεται να «διακοσμεί» τις ίνες του κολλαγόνου. Εκκρίνεται κυρίως από κύτταρα μεσεγγυματικής προέλευσης και συμμετέχει στη ρύθμιση της οργάνωσης της ECM μέσω της αλληλεπίδρασής της με την τροποελαστίνη, σταθεροποιώντας τις ίνες του κολλαγόνου και επιταχύνοντας την διαδικασία ασβεστοποίησης. Επίσης, η διακοσμιτίνη μπορεί να επηρεάσει κυτταρικές λειτουργίες, όπως η προσκόλληση, ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση (Seidler *et al.*, 2008; Zafiroopoulos & Tzanakakis, 2008). Μελέτες αναφέρουν τη συμμετοχή της διακοσμιτίνης στη διαφοροποίηση των πολυπόδων του παχέος εντέρου, καθώς και ότι η μείωση της έκφρασή της μπορεί να καταργήσει την προστατευτική δράση των κυττάρων του στρώματος και ως εκ τούτου την προαγωγή και ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου του παχέος εντέρου (Augoff *et al.*, 2008; Adany *et al.*, 1990).

Η διγλυκάνη αποτελείται από έναν πρωτεϊνικό κορμό 38 kDa στον οποίο βρίσκονται προσδεμένες δύο αλυσίδες CS ή DS (Bereczki & Santha, 2008). Κατά τη διάρκεια της οστεογένεσης η διγλυκάνη φέρεται να έχει αλυσίδες CS, ενώ στον χόνδρο αλυσίδες DS (Rada *et al.*, 2000). Η διγλυκάνη εντοπίζεται σε όλους σχεδόν τους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, όμως δεν παρουσιάζει ομοιόμορφη κατανομή στο εσωτερικό των οργάνων (Bereczki & Santha, 2008; Wadhwa *et al.*, 2004). Οι παραπάνω SLRPs, αν και έχουν ξεχωριστές λειτουργίες, είναι δομικά παρόμοιες και μπορούν να αντικαθιστούν η μία την άλλη (Corsi *et al.*, 2002).

Λουμικάνη. Ο πρωτεϊνικός κορμός της λουμικάνης έχει μοριακό βάρος περίπου 40 kDa (338 αμινοξέα) και διαθέτει 6-10 επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη μεταξύ των N- και C-τελικών του άκρων (Naito, 2005; Seya *et al.*, 2006). Η λουμικάνη αρχικά χαρακτηρίστηκε ως μία από τις κυριότερες PGs του κερατοειδή χιτώνα με υψηλά θειωμένες αλυσίδες KS. Στη συνέχεια εντοπίστηκε η έκφρασή της σε πολλούς ιστούς, όπως στο δέρμα, στις αρτηρίες, στους πνεύμονες, στα νεφρά, στα οστά και στο χόνδρο. Σε αυτούς τους ιστούς, η λουμικάνη μπορεί να υπάρχει ως γλυκοπρωτεΐνη φέροντας ολιγοσακχαρίτες ή φτωχά/μη θειωμένες αλυσίδες πολυλακτοζαμίνης (Seya *et al.*, 2006; Nikitovic *et al.*, 2008). Η λουμικάνη θεωρείται ένας από τους κύριους

ρυθμιστές του σχηματισμού των ινών του κολλαγόνου, μία διαδικασία σημαντική για την απόκτηση και τη διατήρηση της διαφάνειας του κερατοειδή χιτώνα (Seya *et al.*, 2006), καθώς και για την ωρίμανση του οστεοειδούς (Raouf *et al.*, 2002). Παράλληλα με τη δομική οργάνωση των ιστών, έχει προταθεί η συμμετοχή της λουμικάνης στη ρύθμιση κυτταρικών γεγονότων, όπως ο πολλαπλασιασμός, η προσκόλληση και η μετανάστευση των κυττάρων (Seya *et al.*, 2006; Nikitovic *et al.*, 2008). Η φτωχά ή μη θειωμένη λουμικάνη που εκφράζεται σε καρκινικούς ιστούς του παχέος εντέρου εντοπίζεται στα καρκινικά κύτταρα, καθώς και στα επιθηλιακά με μέτριου βαθμού δυσπλασία και στους ινοβλάστες γύρω από τα καρκινικά κύτταρα, γεγονός που πιθανόν συμβάλλει στην εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου (Lu *et al.*, 2002).

1.3.3α(iii) Πρωτεογλυκάνες της βασικής μεμβράνης

Τα λεπτά στρώματα της ECM που αποτελούν τις βασικές μεμβράνες διαχωρίζουν τα επιθηλιακά, τα ενδοθηλιακά, τα μυϊκά και τα λιπώδη κύτταρα από τον γύρω συνδετικό ιστό και λειτουργούν ως φράγμα επιλεκτικής διαπερατότητας για τα μακρομόρια (Jiang & Couchman, 2003; Kanwar *et al.*, 1980). Τα κύρια συστατικά της βασικής μεμβράνης είναι το κολλαγόνο τύπου IV, η λαμινίνη, οι ιντεγκρίνες, το ινιδογόνο και οι PGs (Jiang & Couchman, 2003). Μελέτες έχουν δείξει την σημαντική δράση των PGs της βασικής μεμβράνης στον έλεγχο κύριων λειτουργιών των καρκινικών κυττάρων όπως η διαφοροποίηση, η αγγειογένεση και η διήθηση (Bar-Shavit *et al.*, 1991). Στις PGs της βασικής μεμβράνης ανήκουν οι περλεκάνη (perlecan), αγκρίνη (agrin) και μπαμακάνη (bamacan), οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στις αγγειακές και επιθηλιακές βασικές μεμβράνες. Οι δύο πρώτες φέρουν κυρίως HS αλυσίδες, ενώ η τρίτη φέρει CS αλυσίδες.

Περλεκάνη. Η περλεκάνη αποτελεί την κύρια HSPG των βασικών μεμβρανών (Iozzo, 1994) και εντοπίζεται σε πολλά όργανα, όπως τη καρδιά, τον προστάτη, τα νεφρά και το παχύ έντερο (Jiang & Couchman, 2003; Molist *et al.*, 1998). Ο πρωτεϊνικός της κορμός έχει μέγεθος περίπου 400 kDa και χωρίζεται σε πέντε περιοχές, οι οποίες είναι ομόλογες με άλλα μόρια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπών, στην προσκόλληση και την ανάπτυξη των κυττάρων (Jiang & Couchman, 2003; Knox &

Whitelock, 2006; Whitelock *et al.*, 2008). Η N-τελική περιοχή I περιέχει μια SEA υπομονάδα (πρωτεΐνη σπέρματος, εντεροκινάσης και αγγρίνης) και τρία SGD πεπτίδια, των οποίων τα κατάλοιπα σερίνης αποτελούν σημεία πρόσδεσης των GAG αλυσίδων. Η περλεκάνη στα θηλαστικά φέρει κυρίως HS αλυσίδες, όμως περιστασιακά έχει παρατηρηθεί και η ύπαρξη CS/DS αλυσίδων (Couchman *et al.*, 1996; Kokenyesi & Silbert, 1995; Jiang & Couchman, 2003). Η περιοχή II αποτελείται από τέσσερις επαναλήψεις του τμήματος του υποδοχέα της LDL (LA), με τον οποίο παρουσιάζει ομολογία, και μια αλληλουχία που μοιάζει με ανοσοσφαιρίνη. Η περιοχή III περιέχει τρία τμήματα που είναι ομόλογα με τμήμα των α-αλυσίδων της λαμινίνης και οκτώ τμήματα παρόμοια με τις EGF επαναλήψεις της λαμινίνης (LE), ενώ στην περιοχή IV εντοπίζονται πολλές επαναλήψεις που μοιάζουν με την ανοσοσφαιρίνη, όπως και στο προσκολλητικό μόριο N-CAM. Η περιοχή V είναι ομόλογη προς τη G περιοχή της α-αλυσίδας της λαμινίνης και περιέχει τρία τμήματα και τέσσερα παρόμοια με τον EGF (EG) (Jiang & Couchman, 2003; Knox & Whitelock, 2006). Η περλεκάνη συμμετέχει σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική προσκόλληση και η απόπτωση, μέσω των αλληλεπιδράσεών της με αυξητικούς παράγοντες και άλλες πρωτεΐνες της ECM (Knox & Whitelock, 2006; Farach-Carson & Carson, 2007). Το εξωκυττάριο περιβάλλον καθορίζει τη δράση της περλεκάνης και συνεπώς την επίδρασή της στη δομή και τη λειτουργία του κάθε οργάνου (Knox & Whitelock, 2006).

1.3.3β Πρωτεογλυκάνες ενδοκυττάριας και της κυτταρικής επιφάνειας

Οι PGs της κυτταρικής επιφάνειας περιλαμβάνουν αρκετές ομάδες μορίων με ποικίλες βιολογικές λειτουργίες, όπως τις συνδεκάνες (syndecans), τις γλυπικάνες (glypicans), τον CD44, την μπεταγλυκάνη (betaglycan) και τη θρομβομοντουλίνη (thrombomodulin). Στις ενδοκυττάριας PGs ανήκει η σεργλυκίνη (serglycin), η οποία φέρει αλυσίδες ηπαρίνης ή CS με υψηλά επίπεδα θείωσης.

Συνδεκάνες. Η οικογένεια των συνδεκανών αποτελείται από τέσσερα μέλη, τις συνδεκάνες -1, -2 (fibroglycan), -3 (N-syndecan) και -4 (ryudocan/amphiglycan). Πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I αποτελούμενες από ένα N-τελικό

σηματοδοτικό πεπτίδιο, ένα εξωκυττάριο τμήμα που φέρει τα σημεία πρόσδεσης των GAG αλυσίδων, μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και ένα σύντομο C-τελικό κυτταροπλασματικό τμήμα (Carey, 1997; Woods, 2001). Τα διαμεμβρανικά και κυτταροπλασματικά τμήματα των συνδεκανών είναι καλά συντηρημένες γονιδιακές περιοχές, ενώ το εξωκυττάριο τμήμα τους παρουσιάζει περιορισμένη δομική ομοιότητα. Οι GAGs που συνδέονται στον πρωτεϊνικό κορμό των συνδεκανών είναι κυρίως αλυσίδες HS, όμως έχει δειχθεί ότι οι συνδεκάνες -1 και -4 μπορούν να φέρουν και αλυσίδες CS (Rapraeger *et al.*, 1985; Shworak *et al.*, 1994). Οι συνδεκάνες αλληλεπιδρούν, κυρίως μέσω των GAG αλυσίδων τους και λιγότερο μέσω των πρωτεϊνικών τους κορμών, με αυξητικούς παράγοντες και τους υποδοχείς τους, με πρωτεΐνες της ECM (ινονεκτίνη, κολλαγόνο, τενασκίνη) και με μόρια προσκόλλησης (Carey, 1997; Lopes *et al.*, 2006). Το ενδοκυττάριο τμήμα τους προσδένει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης.

Η συνδεκάνη-1 εντοπίζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα, καθώς επίσης και στο μεσέγχυμα κατά την ανάπτυξη, στα προ-B λεμφοκύτταρα και στα κύτταρα του πλάσματος. Η συνδεκάνη-2, που απομονώθηκε αρχικά από τους ινοβλάστες του πνεύμονα και τα ηπατοκύτταρα, εμφανίζεται άφθονη στους ιστούς παρεγχυματικών οργάνων, όπως το ήπαρ και τα νεφρά. Η συνδεκάνη-3 βρίσκεται κυρίως στο νευρικό ιστό, αλλά και σε εμβρυικούς και νεογνικούς ιστούς, ενώ η συνδεκάνη-4 παρουσιάζει ευρεία κατανομή και εντοπίζεται στα επιθηλιακά, ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα (Carey, 1997; Woods, 2001; Salmivitra & Jalkanen, 1995; Bernfield *et al.*, 1999; Kojima *et al.*, 1993). Διαφορετικοί τύποι κυττάρων συνθέτουν συνδεκάνες με διαφορετική δομή των GAGs και σε μερικές περιπτώσεις με διαφορετική λειτουργία. Επίσης, πολλοί τύποι κυττάρων εκφράζουν πάνω από ένα τύπο συνδεκάνης, η έκφραση των οποίων μπορεί να αλλάζει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των κυττάρων (Elenius *et al.*, 1991; Carey, 1997). Μελέτες έχουν δείξει τον σημαντικό ρόλο των συνδεκανών σε ποικιλία λειτουργιών φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων, όπως τον πολλαπλασιασμό, την προσκόλληση, τη διαφοροποίηση και τη μετανάστευση (Carey, 1997; Woods, 2001; Lopes *et al.*, 2006). Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι η αναστολή της έκφρασης της συνδεκάνης-1

σχετίζεται με τη φτωχή πρόγνωση στο καρκίνο του παχέως εντέρου και του ήπατος (Beauvais *et al.*, 2004 Sanderson, 2001).

Γλυπικάνες. Στα θηλαστικά η οικογένεια των γλυπικανών περιλαμβάνει έξι μέλη (glypicans 1-6). Όλες οι γλυπικάνες διαθέτουν έναν πρωτεϊνικό κορμό μεγέθους 60-70 kDa και αποτελούνται από ένα N-τελικό εκκρινόμενο σηματοδοτικό πεπτίδιο, 14 συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης που σταθεροποιούν τη τριτοταγή δομή τους και ένα C-τελικό άκρο γλυκοσυλφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (GPI-anchor) μέσω του οποίου προσδένονται στην κυτταρική επιφάνεια. Οι αλυσίδες HS που φέρουν οι γλυπικάνες προσδένονται σε συντηρημένες περιοχές των υπομονάδων της κυστεΐνης, οι οποίες εντοπίζονται μεταξύ της κεντρικής περιοχής και του C-τελικού άκρου, ενώ η απομάκρυνση του κεντρικού τμήματος οδηγεί στην πρόσδεση αλυσίδων CS (Filmus & Selleck, 2001; Fransson, 2003; Chen & Lander, 2001). Τα επίπεδα έκφρασης των γλυπικανών μεταβάλλονται ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο και τον ιστό, γεγονός που υποδεικνύει τη συμμετοχή τους στη ρύθμιση της μορφογένεσης. Επίσης, έχει επισημανθεί ο ρόλος τους στη ρύθμιση της σηματοδότησης ορισμένων αυξητικών παραγόντων (Filmus, 2001; Su *et al.*, 2006; Filmus & Selleck, 2001; Cheng *et al.*, 2008).

CD44. Το CD44 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I και λειτουργεί ως προσκολλητικό μόριο που αλληλεπιδρά με το HA. Το μέγεθός του κυμαίνεται μεταξύ 80 και 200 kDa ανάλογα με τη N-/O- γλυκοζυλίωση και το εναλλακτικό μάτισμα σε επίπεδο mRNA (Marhaba & Zoller, 2004; Georgolios *et al.*, 2006). Το εξωκυττάριο τμήμα του CD44 αλληλεπιδρά με μόρια της ECM, ενώ η ενδοκυτταρική του περιοχή προσδένει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Οι GAG αλυσίδες που φέρει είναι HS ή CS. Παρόλο που το CD44 έχει χαρακτηριστεί ως κύριος υποδοχέας του HA, έχει την ικανότητα να προσδένει και ποικίλες πρωτεΐνες της ECM, όπως κολλαγόνο, κυτοκίνες και πρωτεάσες (Marhaba & Zoller, 2004; Nagano & Saya, 2004). Εκφράζεται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους και συμμετέχει σε ποικίλες φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες, όπως την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων, την επάνοδο (homing) των λεμφοκυττάρων, τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Marhaba & Zoller, 2004; Nagano & Saya, 2004). Έχει δειχθεί ότι οι αλληλεπιδράσεις των CD44 υποδοχέων και του HA, που βρίσκεται σε μεγάλες

ποσότητες στο μικροπεριβάλλον του στρώματος των επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του HA-ErbB2-PI3kinase/AKT-β-catenin-COX-2 σηματοδοτικού μονοπατιού που οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών και των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου (Misra *et al.*, 2008).

1.3.4 Βιοσύνθεση των πρωτεογλυκανών

Η βιοσύνθεση των PGs περιλαμβάνει τη σύνθεση ενός πρωτεϊνικού κορμού πάνω στον οποίο προστίθενται πολυσακχαριτικές μονάδες με μετα-μεταφραστικές διαδικασίες. Πιο συγκεκριμένα, το DNA μεταγράφεται σε ειδικό mRNA που μεταφράζεται σε πρωτεΐνη και ακολούθως το νεοσυντιθέμενο μόριο μεταφέρεται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και τελικώς στο σύμπλεγμα Golgi, όπου πραγματοποιείται η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών και η προσθήκη των θειωμένων GAGs αντίστοιχα (Esko & Selleck, 2002; Sugahara *et al.*, 2003). Στη συνέχεια, οι νεοσυντιθέμενες PGs μεταφέρονται από τα κυστίδια μεταφοράς στον εξωκυττάριο χώρο (διακοσμίτη, διγλυκάνη, λουμικάνη, αγγρικάνη κ.α), είτε στην κυτταρική μεμβράνη (συνδεκάνες, γλυπικάνες κ.α), είτε αποθηκεύονται μέσα στο κύτταρο (σεργλυκίνη).

1.4 Αυξητικοί παράγοντες και καρκίνος του παχέος εντέρου

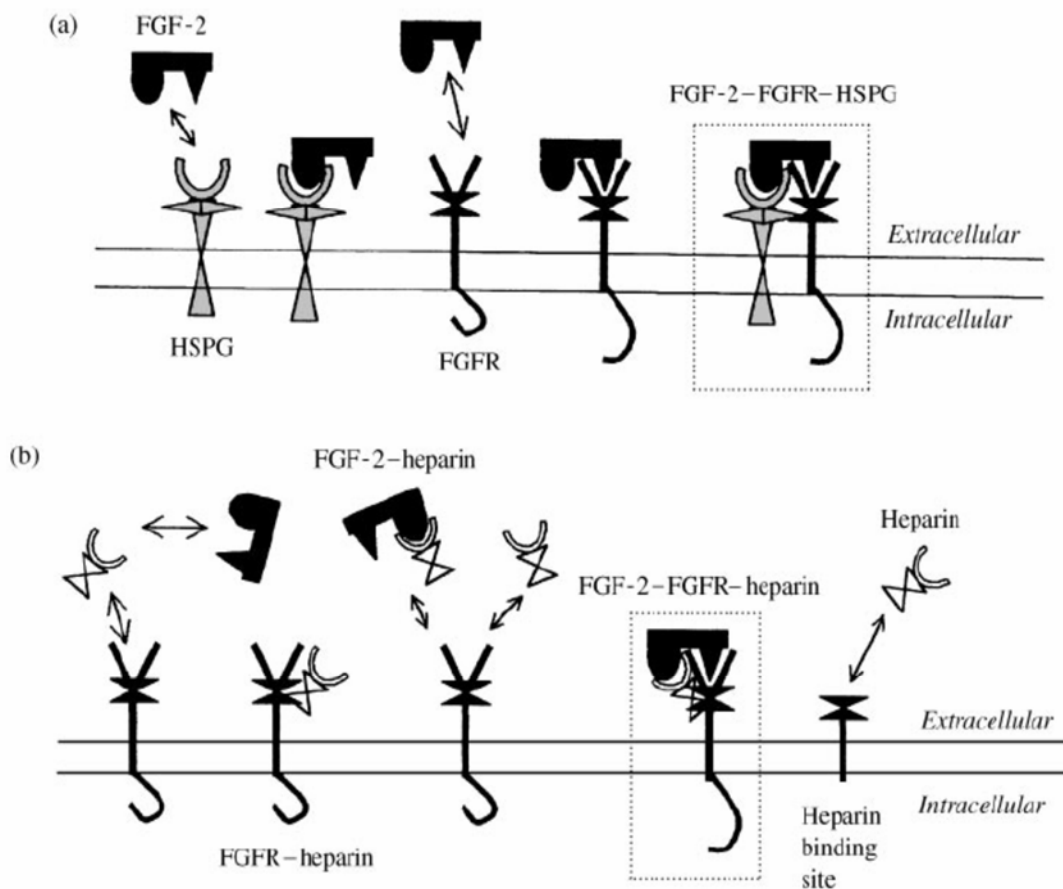
Η ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης είναι αποτέλεσμα τόσο της βιολογικής ισορροπίας μεταξύ των αυξητικών παραγόντων (GFs), των υποδοχέων τους και των επαγόμενων σηματοδοτικών μονοπατιών, όσο και των παραγόντων της ECM που περιβάλλει τα κύτταρα και των αλληλεπιδράσεών τους με μεμβρανικούς υποδοχείς (Kresse & Schoenherr, 2001; Lin & Bissell, 1993). Οι περισσότεροι υποδοχείς των GFs διαθέτουν εγγενή ενζυμική δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης στην κυτταροπλασματική τους περιοχή. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης από τη δέσμευση των αυξητικών παραγόντων έχει ως αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων

σηματοδοτικών μονοπατιών που μεταβάλλουν τη γονιδιακή έκφραση και συνεπώς την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των φυσιολογικών ή μη κυττάρων (Lin & Bissell, 1993; Perona, 2006). Μελέτες αναφέρουν ότι η σύσταση της ECM επηρεάζει τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη μετάσταση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Ohtaka *et al.*, 1996). Πολλοί αυξητικοί παράγοντες, όπως ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (fibroblast growth factor-FGF2), ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1 (insulin-like growth factor-IGF1), ο αυξητικός παράγοντας του μετασχηματισμού (transforming growth factor-TGFβ), ο αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (hepatocyte growth factor-HGF) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor-EGF), παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών γεγονότων σε επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου.

Ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF-2/bFGF) είναι μέλος μίας μεγάλης οικογένειας δομικά σχετιζόμενων πρωτεϊνών και αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης, της αγγειογένεσης και της μετανάστευσης ποικίλων κυτταρικών τύπων σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις (Bikfalvi *et al.*, 1997; Delrieu, 2000; Nugent & Iozzo, 2000). Η ικανότητα του FGF-2 να προσδένεται και να σηματοδοτεί μέσω των μεμβρανικών υποδοχέων του, FGFR1-4, επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία των αλυσίδων HS και της ηπαρίνης που λειτουργούν ως συνυποδοχείς ενισχύοντας την πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα. Μελέτες έχουν τεκμηριώσει την αλληλεπίδραση των HS αλυσίδων/ηπαρίνης με τον FGF-2 και τους υψηλής συγγένειας υποδοχείς του (FGFR1-4) σε ένα τριμερές σύμπλοκο στην επιφάνεια του κυττάρου (Εικόνα 1.3) (Forsten *et al.*, 2000; Aviezer *et al.*, 1994; Pellegrini, 2001; Fannon *et al.*, 2000; Harmer, 2006).

Έκφραση του FGF-2 και των υποδοχέων του έχει παρατηρηθεί σε φυσιολογικό και σε καρκινικό βλεννογόνο, καθώς και σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου του ανθρώπου (Wilkinson *et al.*, 1993; Murgue *et al.*, 1994; New & Yeoman, 1992). Μελέτες έχουν δείξει ότι η προσθήκη εξωγενούς FGF-2 προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, ενώ δεν επηρεάζει τη διαφοροποίησή τους (Jayson *et al.*, 1994;

Dignass *et al.*, 1994). Επίσης, έχει παρατηρηθεί μείωση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μετά την αναστολή της έκφρασης του FGF-2, γεγονός που αναστρέφεται με την προσθήκη εξωγενούς FGF-2 (Netzer *et al.*, 2001). Ο σημαντικός ρόλος του ενδογενώς παραγόμενου FGF-2 έχει δειχθεί σε πείραμα όπου ο FGF-2 που παράγεται από τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου προκαλεί αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων, καθώς και της μεταστατικής τους ικανότητα (Galzie *et al.*, 1997).



Εικόνα 1.3. Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των HSPGs/ηπαρίνης, FGF-2, και των υποδοχών του αυξητικού παράγοντα, FGFRs (Forsten *et al.*, 2000).

Το σύστημα των ινσουλινόμορφων αυξητικών παραγόντων (IGF) αποτελείται από τρεις προσδέτες (ινσουλίνη, IGF-I και -II), έξι υποδοχείς (υποδοχέας ινσουλίνης IRα σε έμβρυα, IRβ σε ενήλικες, IGF-IR, IGF-IIR, υβρίδιο IGF-IR/IRα, υβρίδιο IGF-

IR/IRβ) και έως και επτά πρωτεΐνες πρόσδεσης (IGFBP1-7) (Sridhar & Goodwin, 2009). Η οικογένεια των IGF παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση, την ανάπτυξη και την εξέλιξη φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων (LeRoith & Roberts, 2003; Sridhar & Goodwin, 2009). Ο IGF-I είναι ένα πεπτίδιο που εκκρίνεται κυρίως από το ήπαρ ως απάντηση του αυξητικού παράγοντα της υπόφυσης (GH) ή της υψηλής θερμοδικής πρόσληψης και δρά κατά κύριο λόγο μέσω του IFG-IR, αλλά και των υποδοχέων της ινσουλίνης. Στην κυκλοφορία ο IGF-I βρίσκεται συχνότερα συνδεδεμένος με την IGFBP-3, η οποία ρυθμίζει την βιοδιαθεσιμότητά του, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό την αλληλεπίδραση του IGF-I με τους μεμβρανικούς υποδοχείς του (Sridhar & Goodwin, 2009; Davies *et al.*, 2006).

Ο IGF-I και ο υποδοχέας του, IGF-IR, συμμετέχουν στην ανάπτυξη και την εξέλιξη ποικίλων τύπων καρκίνου μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Sridhar & Goodwin, 2009; Bach, 1999; Reinmuth *et al.*, 2002). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο IGF-I αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και ρυθμίζει την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, καθώς επίσης έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του IGF-IR στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και συσχετισμός αυτού με το στάδιο εξέλιξης του όγκου (Sridhar & Goodwin, 2009; Davies *et al.*, 2006). Επίσης, η μείωση της έκφρασης του IGF-IR με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος οδηγεί σε μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Lahm *et al.*, 1994). Έχει δειχθεί ότι οι IGFs προκαλούν αύξηση του πολλαπλασιασμού της LIM 1215 καρκινικής κυτταρικής σειράς του παχέος εντέρου, ενώ παράλληλα αυξάνουν την απόπτωση των συγκεκριμένων κυττάρων μέσω του IGF-IR (Fu *et al.*, 2007). Αντίθετα, σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου έχει αναφερθεί ότι η αλληλεπίδραση του IGF-I με τον IGF-IR μειώνει την απόπτωση και βοηθάει στην εξέλιξη του όγκου μέσω του κυτταρικού κύκλου (Giovannucci, 2001). Επίσης, σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου ο IGF-I αυξάνει την παραγωγή του VEGF που αποτελεί παράγοντα αγγειογένεσης και ενισχύει την ανάπτυξη του όγκου (Warren *et al.*, 1996).

Επιπροσθέτως, έχει δειχθεί η συνεργασία του IGF-I με τον αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF) για τη μετανάστευση των καρκινικών

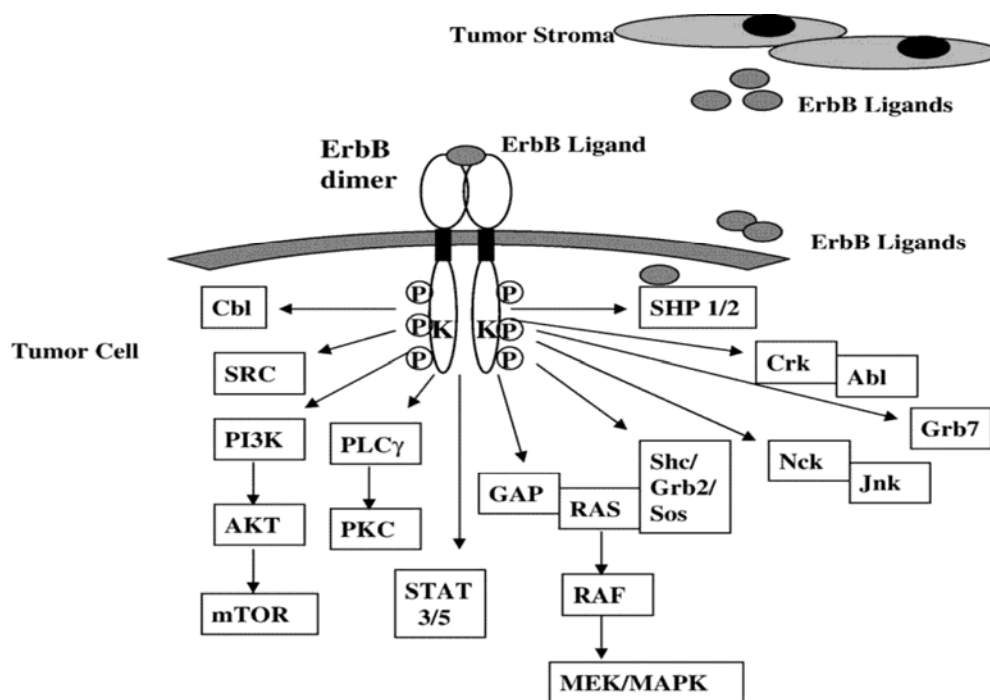
κυττάρων του παχέος εντέρου του ανθρώπου που πραγματοποιείται παρουσία των c-Met και uPA/uPAR (Bauer *et al.*, 2005). Ο HGF είναι μία κυτοκίνη μεσεγχυματικής προέλευσης με υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, c-Met, και συμμετέχει στην κυτταρική ανάπτυξη, στη μορφογένεση, στην αγγειογένεση και στην κινητικότητα των κυττάρων πολλών οργάνων, συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών κυττάρων του γαστρεντερικού συστήματος (Xiao *et al.*, 2001). Μελέτες αναφέρουν ότι ο HGF αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου κυρίως μέσω του PI3K/Akt μονοπατιού (Kanayama *et al.*, 2007).

Οι τρεις ισομορφές του αυξητικού παράγοντα του μετασχηματισμού (TGFβ 1,2 και 3) ανήκουν στην οικογένεια των κυτοκινών και ρυθμίζουν σημαντικές βιολογικές λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και την προέλευση του σήματος (Siegel & Massague, 2003). Ο TGFβ εκκρίνεται σε μη ενεργή μορφή (TGFβ-LAP) που με τη δράση των πρωτεασών ενεργοποιείται σχηματίζοντας μία πρωτεΐνη-διμερές μοριακού μεγέθους 25 kDa (Munger *et al.*, 1997). Όλες οι ισομορφές του TGFβ σηματοδοτούν μέσω της αλληλεπίδρασής τους με δύο διαμεμβρανικούς υποδοχείς κινάσης της σερίνης/θρεονίνης, τους υποδοχείς τύπου I και II (TGFβR-1, -2) (Derynck & Feng, 1997; Massague, 1998). Επίσης η πρωτεογλυκάνη, μπεταγλυκάνη, λειτουργεί ως συνυποδοχέας παρουσιάζοντας τους προσδέτες στο υποδοχέα τύπου II (Blobe *et al.*, 2001). Το TGFβ σηματοδοτικό μονοπάτι περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών από τον τύπου I υποδοχέα και τη δημιουργία συμπλόκων, Smad 2/3/4 που συγκεντρώνονται στον πυρήνα όπου σε συνεργασία και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση ποικίλων γονιδίων (Massague, 1998; Wrana, 2000; Heldin *et al.*, 1997).

Ο TGFβ έχει ιδιαίτερο ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Στα πρώιμα στάδια της νόσου λειτουργεί ως καταστολέας του όγκου μειώνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προκαλώντας απόπτωση, ενώ στα τελικά στάδια της καρκινογένεσης υπερεκφράζεται και προάγει την ανάπτυξη του όγκου ενεργοποιώντας τη μετάσταση, την αγγειογένεση και την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος (Ko *et al.*, 1994; Conery *et al.*, 2004; Derynck *et al.*, 2001; Baker *et al.*, 2008). Η εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου έχει

συσχετιστεί με την σταδιακή αύξηση της έκφρασης των TGFβ1 και TGFβ2 ισομορφών (Bellone *et al.*, 2001). Μεγάλο μέρος των καρκίνων του παχέος εντέρου αντιστέκεται στην ογκοκατασταλτική επίδραση του TGFβ, που μπορεί μερικώς να οφείλεται σε τροποποιήσεις του TGFβ σηματοδοτικού μονοπατιού (Derynck *et al.*, 2001). Επίσης, έχει δειχθεί ο σημαντικός ρόλος των Smad 2, 3 και 4 πρωτεϊνών στο TGFβ σηματοδοτικό μονοπάτι των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Li *et al.*, 2005). Μελέτες αναφέρουν ότι σε περιπτώσεις μη κληρονομικού καρκίνου του παχέος εντέρου, η TGFβ σηματοδότηση προσφέρει πλεονέκτημα στα κύτταρα του όγκου για τη μετάβαση από το επιθήλιο στο μεσέγχυμα και συγκεκριμένα από το μονοπάτι TGF1R/pSmad3C στο JNK/pSmad3L μονοπάτι (Matsuzaki *et al.*, 2006).

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) ανήκει στην ίδια οικογένεια με



Εικόνα 1.4. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων erbB μέσω της πρόσδεσης ποικίλων μακρομοριών του εξωκυττάρου χώρου, μεταξύ των οποίων και η ηπαρίνη, οδηγεί σε διμερισμό, ενεργοποίηση της κινάσης της τυροσίνης και φωσφορυλίωση των υποδοχέων. Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς αλληλεπιδρούν με μόρια σηματοδότησης και μεταδίδουν το σήμα στο εσωτερικό του κυττάρου επηρεάζοντας ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες (Normanno *et al.*, 2006).

τις πρωτεΐνες TGF α , HBEGF, betacellulin, amphiregulin, neuregulins και cripto, οι οποίες προσδένονται στους EGF υποδοχείς, EGFR/erbB1 και erbB2-4 (Beerli & Hynes, 1996; Harris *et al.*, 2003). Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση κατά την ανάπτυξη, η ομοιόσταση και η ογκογένεση (Εικόνα 1.4) (Schneider & Wolf, 2009). Ορισμένοι από τους αυξητικούς παράγοντες της οικογένειας EGF που αλληλεπιδρούν με την ηπαρίνη ή με HS μόρια, όπως οι HB-EGF και amphiregulin, δεν μπορούν να σηματοδοτήσουν απουσία των αλυσίδων αυτών (Aviezer & Yayon, 1994; Schuger *et al.*, 1996).

Η οικογένεια των EGF έχει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του παχέος εντέρου ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων. Η αυξημένη έκφραση του υποδοχέα EGFR έχει συσχετιστεί με τη μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Radinsky, 1995; Saeki *et al.*, 1995). Η έκφραση του υποδοχέα erbB2 είναι σε χαμηλά επίπεδα στον φυσιολογικό ιστό του παχέος εντέρου, ενώ αυξάνεται σημαντικά στα αδενώματα και στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου και αυτοφωσφορυλιώνεται απουσία κάποιου προσδέτη (Karitanovic *et al.*, 1997; Saeki *et al.*, 1995; Lonardo *et al.*, 1990). Μελέτες έχουν δείξει ότι η εξωγενώς προστιθέμενη ηπαρίνη και οι HS αλυσίδες που παράγονται από τα ηπατοκύτταρα διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω της επαγωγής της έκφρασης των υποδοχέων erbB2 και erbB3 (Zvibel *et al.*, 1998; Zvibel *et al.*, 2001; Zvibel *et al.*, 1998; Fishman *et al.*, 2002).

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν ο χαρακτηρισμός των γλυκοζαμινογλυκανών που συνθέτουν οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου και η επίδραση της γενιστεΐνης στην παραγωγή και την κατανομή τους. Επίσης, στους στόχους της ερευνητικής μας πρότασης ήταν η μελέτη της επίδρασης των γλυκοζαμινογλυκανών/πρωτεογλυκανών στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, ο ρόλος των αυξητικών παραγόντων σ' αυτόν και η διερεύνηση των πιθανών ενδοκυττάρων μονοπατιών σηματοδότησης που επιδρούν στη ρύθμιση της συγκεκριμένης κυτταρικής λειτουργίας.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί αναμφισβήτητα ένα παγκόσμιο πρόβλημα, όντας ο τρίτος σε συχνότητα και θνητότητα καρκίνος. Στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο οι σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων, της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και των γύρω φυσιολογικών κυττάρων, καθώς επίσης και η σύσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες/πρωτεογλυκάνες ως κύρια συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας αλληλεπιδρούν, μέσω των πρωτεϊνικών τους κορμών ή/και των υδατανθρακικών τους αλυσίδων, με ποικίλα μακρομοριακά συστατικά ρυθμίζοντας σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Η μελέτη τους έχει ως στόχο την κατανόηση της παθογένειας των κακοήθων νεοπλασιών του παχέος εντέρου και την άντληση πληροφοριών ικανών να συνεισφέρουν στην έγκαιρη διάγνωση της νόσου και την κατάλληλη αντιμετώπισή της.

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Κυτταρικές καλλιέργειες

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου του ανθρώπου, οι HT29 (ATCC No: HTB-38), SW1116 (ATCC No: CCL-233) και HCT116 (ATCC No: CCL-247). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα CO₂ 5% (v/v) σε ειδικές φλάσκες καλλιέργειας. Οι κυτταρικές σειρές HT29 και SW1116 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό RPMI-1640 παρουσία 10% (v/v) ορού (FBS) και 0.5% τζενταμικίνης. Η κυτταρική σειρά HCT116 καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό RPMI-1640 παρουσία 10% (v/v) FBS και των αντιβιοτικών πενικιλίνη (100 IU/ml) και στρεπτομυκίνη (100 mg/ml). Η αλλαγή του θρεπτικού καλλιέργειας γινόταν κάθε δύο μέρες. Η αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες καλλιέργειας γινόταν με ήπια ενζυμική κατεργασία με τρυψίνη [0.25% τρυψίνη (w/v) σε PBS 0.1% (w/v) Na₂EDTA για 5-15 λεπτά στους 37 °C. Μετά την προσθήκη ενός όγκου θρεπτικού για τη λήξη της ενζυμικής δραστηριότητας, ακολουθούσε φυγοκέντρηση των κυττάρων για 10 λεπτά στις 1500 rpm, επαναδιάλυσή τους σε θρεπτικό και με την κατάλληλη αραίωση, καλλιέργειά τους σε νέες φλάσκες.

2.2 Απομόνωση και φωτομέτρηση ολικού RNA από κύτταρα

Τα κύτταρα HT29 (2×10^5), SW1116 (4×10^5) και HCT116 (2×10^5), στρώθηκαν σε πιάτα 24 οπών παρουσία 10% FBS για 24 ώρες και έπειτα σε συνθήκες έλλειψης FBS για 24 ώρες. Μετά από 0, 24, 48 ή 96 ώρες χορήγησης των παραγόντων έγινε απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων. Η εκχύλιση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αντιδραστηρίου TRIzol (Gibco), το οποίο είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης που διαρρηγνύει τα κύτταρα και διαλυτοποιεί τα κυτταρικά συστατικά, αφήνοντας άθικτο το RNA. Τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν παρουσία του TRIzol και η εκχύλιση του RNA έγινε με τη βοήθεια χλωροφορμίου. Ακολούθησε κατακρήμνιση του RNA με τη χρήση ισοπροπανόλης, καθαρισμός του με απόλυτη αιθανόλη (100%) και

επαναδιάλυσή του σε 15-20 μl DEPC νερού. Προσδιορισμός της καθαρότητας και της ποσότητας του ολικού RNA έγινε με φωτομετρική μέθοδο με μέτρηση των δειγμάτων στα 260 και 280 nm. Από την απορρόφηση των δειγμάτων στα 260 nm προσδιορίζεται η ποσότητα του RNA, ενώ ο λόγος 260/280 nm καθορίζει την καθαρότητά του (1.8 έως 2.0). Το RNA αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

2.3 Αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)

Ένα ή πέντε μg ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε από κάθε δείγμα για τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη χρήση των συστημάτων ThermoScript reverse transcription-PCR (RT-PCR) (Invitrogen) ή DyNAmo cDNA synthesis Kit (Finnzymes). Η ποσότητα του ολικού RNA μαζί με τους τυχαίους εκκινητές (random hexamers), τα ολιγονουκλεοτίδια (dNTPs) και το ένζυμο ανάστροφη μεταγραφάση (RTase) θερμαίνονται στους 25 °C για 10 λεπτά, έπειτα για 50 λεπτά στους 50 °C ή 30 λεπτά στους 37 °C και τέλος στους 85 °C για 5 λεπτά. Το cDNA αποθηκεύτηκε στους -20 °C.

2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της mRNA έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Platinum Taq polymerase ThermoScript RT-PCR (Invitrogen) και οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 20 μl σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα OLIGO 4.0 με βάση την γονιδιακή ακολουθία του εθνικού κέντρου βιοτεχνολογίας (InfoGenBank) ή βρέθηκαν από τη βιβλιογραφία. Το πρόγραμμα της PCR αντίδρασης ήταν το εξής: 94 °C για 15 λεπτά, 40 κύκλοι στους 94 °C για 20 δευτερόλεπτα, 55 °C για 30 δευτερόλεπτα και 72 °C για 10 λεπτά. Τα προϊόντα της αντίδρασης, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, ηλεκτροφορήθηκαν σε ηλεκτροφόρο αλατούχο 2% ή 3%. Ακολούθησε χρώση των πηκτών με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογράφησή τους με ψηφιακή μηχανή κάτω από UV λάμπα.

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η μέθοδος Real Time PCR χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της mRNA έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν. Η ανίχνευση των προϊόντων της Real Time PCR έγινε με τη χρήση ειδικής χρωστικής, του SYBR Green (QuantiTech SYBR Green master mix – Qiagen), η οποία ενσωματώνεται στο προϊόν της αντίδρασης και εκπέμπει φθορίζον σήμα που ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Αρχικά έγινε προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών της Real Time PCR, όπως η συγκέντρωση των εκκινητών και η θερμοκρασία πρόσδεσής τους στο DNA. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν 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 τα δείγματα υποβλήθηκαν σε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από τους 55 °C έως τους 95 °C για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης/σημείου τήξεως (melting curve) με σκοπό τον άμεσο χαρακτηρισμό των προϊόντων. Σε κάθε πείραμα και για κάθε γονίδιο χρησιμοποιήθηκαν καμπύλες αναφοράς οι οποίες απεικονίζουν τον κύκλο (Ct) ενάντια του λογαρίθμου της αρχικής πρότυπης αραίωσης (log dilution). Η ποσοτικοποίηση των γονιδίων-στόχων έγινε με βάση τη συγκέντρωση της καμπύλης αναφοράς (αντίγραφα/Ct). Στη συνέχεια, τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν με βάση τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς GAPDH και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους.

2.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

Η πρωτεϊνική σύσταση των δειγμάτων εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου. Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου αποτελείται από το πήκτωμα

επιστοιβαξης των πρωτεϊνών με συγκένρωση 4% (stacking gel) που εξασφαλίζει την ομοιόμορφη εισαγωγή των δειγμάτων στο πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) 8% ή 12%, ανάλογα με το μοριακό μέγεθος της υπό μελέτη πρωτεΐνης. 20-30 µg ολικής πρωτεΐνης από κάθε δείγμα αναμείχθηκε με ειδικό διάλυμα αποδιάταξης και μετά από 5-10 λεπτά βρασμού το μείγμα φορτώθηκε στο πήκτωμα ακρυλαμιδίου και ηλεκτροφορήθηκε στα 200 V για περίπου μία ώρα.

2.7 Ανοσοαποτύπωση κηλίδας (Dot blot)

Για την ανίχνευση πρωτεϊνών στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κηλίδας. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα (40 µl) και μία καμπύλη αναφοράς με γνωστές διαδοχικές αραιώσεις της υπό μελέτης CSA αλυσίδας τοποθετήθηκαν σε θετικά φορτισμένη PVDF μεμβράνη (Biotrace HP 0.45 µm, Gelman Sciences) και αφέθησαν να προσροφηθούν με τη μορφή κηλίδας. Κατόπιν ακολούθησε η επώαση με τα αντισώματα, όπως περιγράφεται παρακάτω στη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά western.

2.8 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)

Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα ακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0.45 µm, Pierce) με τη βοήθεια ειδικής συσκευής ηλεκτροφόρησης και κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για 2-3 ώρες, ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, στα 15 V. Στη συνέχεια, οι ελεύθερες πρωτεϊνικές περιοχές της μεμβράνης δεσμεύονται (blocking) μέσω επώασης της μεμβράνης με 5% (w/v) αποβουτυρωμένου γάλακτος σε PBS/Tween 0.1% (PBS-T) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4 °C για 18-20 ώρες. Έπειτα, ακολουθούν 10λεπτες πλύσεις της μεμβράνης για μισή ώρα με PBS-T. Κατόπιν, προστίθεται το πρώτο αντίσωμα αραιωμένο σε διάλυμα PBS-T που περιέχει 1% γάλα και επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρεις πλύσεις των 10 λεπτών καθεμία και προσθήκη του αντίστοιχου δεύτερου αντισώματος σε συγκεκριμένη συγκέντρωση και επώαση της μεμβράνης για

1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη στη συνέχεια εκπλένεται όπως και προηγουμένως. Τέλος, η μεμβράνη μετά την επώασή της για 5 λεπτά με το διάλυμα εμφάνισης ECL (Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate, Pierce), εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ όπου αποτυπώνεται η εκπομπή χημειοφωταύγειας από τις πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, τα φιλμ εμφανίζονται σε ειδικό μηχάνημα της Kodak και έπειτα σαρώνονται ψηφιακά. Η πυκνότητα των ζωνών χρησιμοποιείται ως ποσοτική παράμετρος και υπολογίζεται με την ανάλυση της ψηφιακής εικόνας με το πρόγραμμα Jimage. Η ημιποσοτικοποίηση των προϊόντων πραγματοποιείται με τον υπολογισμό του λόγου της πυκνότητας της ζώνης της πρωτεΐνης-στόχου προς την πυκνότητα της ζώνης της β-ακτίνης που χρησιμοποιείται ως πρωτεΐνη αναφοράς.

2.9 Ανάλυση των γλυκοζαμινογλυκανών και προδιορισμός των HS δισακχαριτών

Οι μεμβρανικές GAGs απομονώθηκαν με τη βοήθεια διαλύματος που περιέχει 50mM Tris-HCl pH 8.0, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) NaCl, αναστολέα των πρωτεασών της σερίνης (phenylmethanesulphonyl fluoride), υδροχλωρικό βενζαμιδίνης και εξανικό οξύ στη συγκέντρωση των 2, 5 και 50 mM αντίστοιχα (Karamanos *et al.*, 1995). Η απομόνωση ολοκληρώθηκε μετά από 2 ώρες ήπιας ανάδευσης στους 4 °C, χρησιμοποιώντας 1 ml του παραπάνω διαλύματος ανά 10⁶ κύτταρα. Το υπερκείμενο των κυτταροκαλλιιεργειών συμπυκνώθηκε (1:100) με μεμβράνες YM-10 Amicon (Millipore). Η κατακρήμιση των GAGs έγινε με την προσθήκη 4 όγκων αιθανόλης 95% (v/v) που περιείχε 2.5% (w/v) οξικό νάτριο. Για την πλήρη κατακρήμιση χρησιμοποιήθηκε ως φορέας 40 μl CSA (0.2 mg/L). Ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στους 4 °C και φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 10000 x g για 10 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε πέψη των κατακρημισμένων δειγμάτων με παπαΐνη (2 units/ml) στους 65 °C για 1 ώρα σε διάλυμα 100 mM PBS pH 7, 5 mM Na₂EDTA και 5mM υδροχλωρικής L-κυστεΐνης (Karamanos, 1999). Οι ελεύθερες GAGs κατακρημίστηκαν με την προσθήκη 10 όγκων 1% (w/v) χλωριούχου κετυλπριδίου (CPC) σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά από φυγοκέντρηση στις 10000 x g για 10 λεπτά, το ίζημα διαλύθηκε σε 500 μl διαλύματος προπανόλης-1 60% (v/v) και CPC 4% (w/v) (Antonopoulos *et al.*, 1961). Έπειτα έγινε ξανά

κατακρήμιση των ελεύθερων GAGs με την προσθήκη 6 όγκων του διαλύματος αιθανόλης 95% (v/v) και οξικού νατρίου 2.5% (w/v). Ακολούθησε πλύση με αιθανόλη και στέγνωμα των κατακρημισμένων δειγμάτων.

Για τον προσδιορισμό των HA και GalAGs (CS, DS) έγινε επαναδιάλυση των παρασκευασμάτων των GAGs σε νερό και πέψη αυτών με διάλυμα χονδροϊτινάσης ABC, ACII και χονδρο-4 και -6-σουλφατάσων (0.2 units/mL) (Yamagata *et al.*, 1968). Η απομάκρυνση των HS και KS έγινε με κατακρήμιση αιθανόλης. Τα υπερκείμενα αναλύθηκαν για το HA και τους Δ-δισακχαρίτες των GalAGs με τις τεχνικές HPLC και HPCE (Karamanos *et al.*, 1995; Karamanos *et al.*, 1994). Ο προσδιορισμός των HS πραγματοποιήθηκε μετά την απομάκρυνση των KS με κερατανάση II (Hashimoto *et al.*, 1988) και τη κατακρήμιση με αιθανόλη των δειγμάτων των GAGs που δεν υπέστησαν πέψη με χονδροϊτινάσες και χονδρο-σουλφατάσες και στη συνέχεια κατακρημίστηκαν. Στη συνέχεια έγινε πέψη με τις ηπαρινάσες I, II και III σε συνδιασμό με διάλυμα 20 mM οξικού pH 7 και 1 mMol οξικού ασβεστίου στους 37 °C για 90 λεπτά (Karamanos *et al.*, 1997). Το HS δισακχαριτικό περιεχόμενο των κυττάρων χαρακτηρίστηκε και ποσοτικοποιήθηκε με τη μέθοδο HPCE με την οποία διακρίνονται οι θειωμένοι δισακχαρίτες N, 2-O, 4-O και 6-O εκτός του σπάνιου δισακχαρίτη 3-O που συνήθως δεν υπάρχει στην ηπαρίνη. Σε όλες τις περιπτώσεις, η ποσότητα των GAGs προσδιορίστηκε από το εμβαδόν της κορυφής των Δ-δισακχαριτών των GAGs.

2.10 Μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 96 οπών (Corning) στη συγκέντρωση των 3×10^3 για τα HT29 και HCT116 κύτταρα και των 7×10^3 για τα SW1116 κύτταρα ανά οπή παρουσία 10% FBS για 24 ώρες και στη συνέχεια σε θρεπτικό απουσία ορού (0%) για 24 ώρες. Έπειτα έγινε χορήγηση των παραγόντων στα κύτταρα σε 0% θρεπτικό για 48 ώρες. Μετά την προσθήκη των παραγόντων προσδιορίστηκε ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων με τη φλουορομετρική μέθοδο CyQUANT cell proliferation Assay Kit (Molecular Probes-Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται μέτρηση του DNA

περιεχομένου με τη πρόσδεση φθορίζουσας χρωστικής. Για την μετατροπή των τιμών φθορισμού σε αριθμό κυττάρων χρησιμοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς διαδοχικών αραιώσεων γνωστού αριθμού κυττάρων από κάθε κυτταρική σειρά. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτες.

2.11 Μέτρηση της απόπτωσης

Τα κύτταρα στρώθηκαν σε πιάτα 12 οπών παρουσία 10% FBS για 24 ώρες, έπειτα έγινε αλλαγή του θρεπτικού σε 0% για 24 ώρες και ακολούθησε η προσθήκη των παραγόντων σε 0% θρεπτικό για 48 ώρες. Η μέτρηση της απόπτωσης έγινε με σήμανση ανεξίνης V (annexin V-FITC) και ιωδιούχου προπιδίου (PI) (BD Pharmingen) σε κυτταρομετρητή ροής (FACS), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Περιληπτικά, έγινε πλύση των κυττάρων με κρύο PBS και έπειτα αποκόλλησή τους με ειδικό διάλυμα (BB, binding buffer) στη τελική συγκέντρωση των 10^6 κυττάρων/ml. Στη συνέχεια προστέθηκε η ανεξίνη V (5 μ l) και το ιωδιούχο προπίδιο (5 μ l) σε 100μ l/ 10^5 κύτταρα και επώαστηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Μετά την επώαση έγινε προσθήκη 400 μ l BB και ανάλυση των κυττάρων σε μηχανήμα Beckton-Dickinson FACSArray με CELLQuest (Beckton-Dickinson). Τα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε DNaseI (3 U/ml) χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα ελέγχου.

2.12 Δοκιμασία ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου

Για την ανάλυση της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου χρησιμοποιήθηκε η κυτταρομετρία ροής (FACS). Μετά τη χορήγηση των παραγόντων για 48 ώρες, έγινε πλύση των κυττάρων και αποκόλλησή τους με PBS. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 1200 rpm για 5 λεπτά, επαναδιάλυση των κυττάρων σε κρύο διάλυμα 1:1 PBS και McIlvaine's, προσθήκη σταγόνα-σταγόνα 2 μ l παγωμένης αιθανόλης και επώαση των κυττάρων στους 4 °C για 1 ώρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα (10^6 /ml) φυγοκεντρήθηκαν (10 λεπτά, 2000 rpm), πλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και επώαστηκαν στο διάλυμα χρώσης (PBS, 100 μ g/ml RNase A, 10 μ g/ml PI) για 1 ώρα στους 37 °C. Η μέτρηση του DNA έγινε σε μηχανήμα

Beckton-Dickinson FACSArray. Για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, το άθροισμα όλων των κυττάρων ορίστηκε στο 100% και προσδιορίστηκε η κατανομή τους στις G0/G1, S και G2/M φάσεις.

2.13 Στατιστική ανάλυση

Η εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με *t*-test και ANOVA χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Microcal Origin (version 5.0). Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο $p < 0.05$.

2.14 Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού πρωτεϊνών (separating buffer): 1.5 M Tris-HCl, 4% SDS(w/v), pH 8.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοιβαξης πρωτεϊνών (stacking buffer): 0.5 M Tris-HCl, 1.6% SDS(w/v), pH 6.8
- Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών: 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% γλυκερόλη (glycerol), 1% μερκαπτοαιθανόλη (β-mercaptoethanol), 12.5 mM EDTA, 0.02% μπλέ υης βρωμοφαινόλης (bromophenol blue)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM γλυκίνη (glycine), 0.1% SDS
- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών: 10 mM CAPS, pH 11, containing 10% methanol
- Διάλυμα αποδιάταξης πρωτεϊνών (RIPA): Tris/HCL 50 mM, EDTA 0.5 M, Triton X-100 1%, NaCl 0.1%, and protease/phosphatase inhibitors (PMSF 1mM, NEM 5 mM, benzamidin 5 mM, sodium cholate 1%, orthovanadate 1mM)
- Διάλυμα έκπλυσης μεμβρανών: PBS, Tween 1% (v/v)
- Διάλυμα McIlvaine's: 0.2 M Na₂HPO₄, 0.1 M citric acid, pH 7.5

2.15 Εκκινητές

ER α _F 5' AATTCAGATAATCGACGCCAG 3'
ER α _R 5' GTGTTTCAACATTCTCCCTCCTC 3'
ER β _F 5' GTCCATCGCCAGTTATCACATC 3'
ER β _R 5' GCCTTACATCCTTCACACGA 3'
FGF-2_F 5' GAAGAGCGACCCTCACATCAAG 3'
FGF-2_R 5' CTGCCCAGTTCGTTTCAGTG 3'
FGFR1_F 5' ACAACCTGCCTT ATGTCCAGATC 3'
FGFR1_R 5' TGCGTCCTCAAAGGAGACATT 3'
FGFR2_F 5' GGTCACCA TGGCAACCTTGT 3'
FGFR2_R 5' TCTGGTTGAGAGATTTGGTATTTGG 3'
FGFR3_F 5' GGGCAATTCTATTGGGTTTTCTC 3'
FGFR3_R 5' GAAGCCCACCCCGTAGCT 3'
FGFR4_F 5' TCATCAACGGCAGCAGCTT 3'
FGFR4_R 5' CAGGACCTCCACCTCTGAGCTA 3'
p21WAF1/cip1_F 5' CTGCCCAAGCTCTACCTTCC 3'
p21WAF1/cip1_R 5' CAGGTCCACATGGTCTTCCT 3'
p53_F 5' CGTCTGGGCTTCTTGCATTC 3'
p53_R 5' AAGGCCTGCCCTGTGCAGC 3'
Cyclin D1_F 5' GCCCTCGGTGTCCTACTTCAA 3'
Cyclin D1_R 5' TCCTCCTCGCACTTCTGTTCC 3'
GAPDH_F 5' GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA 3'
GAPDH_R 5' GTCATTGATGGCAACAATATCCACT 3'

2.16 Αντισώματα

| <i>Πρώτα αντισώματα</i> | <i>Εταιρία</i> | <i>Αραίωση</i> |
|--|-------------------------|----------------|
| anti-FGF-2 | R & D Systems | 0.1 µg/ml |
| mouse anti-heparitinase stubs antibody(clone 3G10) | Seikagaku | 1:500 |
| mouse anti-CSA | Sigma | 1:200 |
| rabbit anti-p-EGFR | Biosource | 1: 1000 |
| mouse anti-p21 | SantaCruz Biotechnology | 1:200 |
| mouse anti-p53 | SantaCruz Biotechnology | 1:200 |
| rabbit anti-cyclin D1 | SantaCruz Biotechnology | 1:200 |
| rabbit anti-p38 | Cell Signaling | 1:1000 |
| rabbit anti-p-p38 | Cell Signaling | 1:1000 |
| rabbit anti-caspase 3 | Cell Signaling | 1:1000 |
| rabbit anti-cleaved caspase 3 | Cell Signaling | 1:1000 |
| goat anti-actin | SantaCruz Biotechnology | 1:200 |
| <i>Δεύτερα αντισώματα</i> | <i>Εταιρία</i> | <i>Αραίωση</i> |
| anti-mouse | SantaCruz Biotechnology | 1:2000 |
| anti-rabbit | SantaCruz Biotechnology | 1:2000 |
| anti-goat | SantaCruz Biotechnology | 1:4000 |

3 Αποτελέσματα

3.1 Μελέτη της σύνθεσης και της κατανομής των γλυκοζαμινογλυκανών/ πρωτεογλυκανών (GAGs/PGs) από δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου

3.1.1 Γενικά

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες θανάτου στις δυτικές χώρες τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες (Serrano *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006; Jemal *et al.*, 2008; Rougier & Mitry, 2003) και είναι ο τρίτος σε συχνότητα τύπος καρκίνου στην Αμερική (American cancer society, 2005). Μελέτες συνδέουν τη γονιδιακή αστάθεια (Grady, 2004), τις διατροφικές συνήθειες και τις ορμόνες ως πιθανούς κινδύνους ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου (Papapolychroniadis, 2004). Η πρόγνωση για τις κακοήθεις παθήσεις του παχέος εντέρου είναι συνήθως πτωχή, ιδιαίτερα εάν δεν διαγνωστούν σε πρώιμο στάδιο, καθώς ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου χαρακτηρίζεται από υψηλό μεταστατικό δυναμικό (Saunders & Iveson, 2006). Η μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες μη αποτελεσματικής θεραπείας του καρκίνου και έχει ως επακόλουθο το σύντομο σχετικά θανάτου των ασθενών (Gu *et al.*, 2005), γεγονός που σχετίζεται με την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να αποδομούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) και τη βασική μεμβράνη (Aumailley & Gayraud, 1998; Nakajima & Chop, 1991). Η ECM είναι ένα σύνθετο δίκτυο αποτελούμενο κυρίως από κολλαγόνο, ινονεκτίνη, λαμινίνη, υαλεκτάνη, πρωτεογλυκάνες (PGs) και το περιεχόμενο της επηρεάζει ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες (Wegrowski & Maquart, 2004).

Οι PGs είναι σύμπλοκα μόρια που αποτελούνται από έναν πρωτεϊνικό κορμό πάνω στον οποίο βρίσκονται ομοιοπολικά συνδεδεμένες μία ή περισσότερες αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών (GAGs) και εντοπίζονται κυρίως στην ECM και στην κυτταρική επιφάνεια, ενώ υπάρχουν και κάποιες ενδοκυττάρια PGs (Kolset *et al.*, 2004). Οι GAGs/PGs είναι ικανές να αλληλεπιδρούν με αυξητικούς παράγοντες και/ή με τους υποδοχείς τους και μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων μπορούν να

επηρεάσουν ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η μετανάστευση (Fjeldstad & Kolset, 2005). Ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές στην παραγωγή των GAGs/PGs έχει διατυπωθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη ποικίλων τύπων καρκίνου όπως του οστεσαρκώματος, μελανώματος, καρκίνου του μαστού και του αδenoκαρκινώματος του παχέος εντέρου (Wegrowski & Maquart, 2004).

Μελέτες, *in vitro* και *in vivo*, αναφέρουν ότι η γενιστεΐνη (genistein), ένα ισοφλαβονοειδές της σόγιας, είναι αναστολέας της ανάπτυξης ποικίλων καρκινικών όγκων συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του παχέος εντέρου (Sarkar & Li, 2004; Messina & Bennik, 1998). Γενικά, οι δράσεις της γενιστεΐνης έχουν σχετιστεί με τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M (Pagliacci *et al.*, 1994), ενώ σε ορισμένες κυτταρικές σειρές μπορεί να προκαλέσει διακοπή στο G0/G1 στάδιο του κυτταρικού κύκλου (Kuzumaki *et al.*, 1998). Η γενιστεΐνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1-2 μM) έχει αναφερθεί ότι μπορεί να προκαλέσει αύξηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Salti *et al.*, 2000). Επίσης, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η γενιστεΐνη εκτός από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό επηρεάζει τη σύνθεση των GAGs/PGs σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου μεσοθηλιώματος και καρκίνου του μαστού (Tzanakakis *et al.*, 1997; Mitropoulou *et al.*, 2002). Οι αλλαγές που παρατηρούνται στα επίπεδα των GAGs/PGs φαίνεται να σχετίζονται με το ρυθμό της κυτταρικής τους ανάπτυξης (Nikitovic *et al.*, 2005). Πολλοί πιθανοί μηχανισμοί της δράσης της γενιστεΐνης στα καρκινικά κύτταρα έχουν προταθεί. Έχει δειχθεί ότι η γενιστεΐνη αποτελεί αναστολέα της κινάσης της τυροσίνης (PTKs) (Akiyama *et al.*, 1987), αλληλεπιδρά με οιστρογονικούς υποδοχείς (ERs) (Polkowski & Mazurek, 2000), έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και αναστέλει την DNA τοποϊσομεράση II (Salti *et al.*, 2000).

3.1.2 Στοχός

Στόχος αυτής της μελέτης ήταν ο χαρακτηρισμός του τύπου των συντιθέμενων GAGs από δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου, HT29 και SW1116, και η μελέτη της επίδρασης της γενιστεΐνης στην παραγωγή και στην κατανομή τους, καθώς και στον πολλαπλασιασμό των παραπάνω κυττάρων.

3.1.3 Αποτελέσματα

3.1.3a Μελέτη της σύνθεσης και της κατανομής των GAGs σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου του ανθρώπου

Δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου μετρίου βαθμού διαφοροποίησης, HT29 και SW1116, χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Αρχικά ερευνήσαμε την σύνθεση και τη κατανομή των GAGs τόσο στο υλικό καλλιέργειας όσο και στην κυτταρική μεμβράνη αυτών των κυτταρικών σειρών. Η ανάλυση των μεταβολικά [³H]-επισημασμένων GAGs/PGs έδειξε ότι και οι δύο κυτταρικές σειρές συνθέτουν υαλουρονικό οξύ (HA), μεμβρανικές και εκκρινόμενες γαλακτοζαμινογλυκάνες (GalAGs), καθώς καιθειϊκή ηπαράνη (HS) σε διαφορετικές ποσότητες (Εικόνα 3.1Α-Ε). Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1, τα HT29 κύτταρα παράγουν 34% μεγαλύτερη ποσότητα συνολικών GAGs σε σύγκριση με τα SW1116 κύτταρα, γεγονός που δείχνει ότι οι δύο αυτές καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου έχουν διαφορετικά βιοσυνθετικά προφίλ. Συγκεκριμένα, τα HT29 κύτταρα συνθέτουν μέχρι και 300% περισσότερο HA και διατηρούν στην κυτταρική μεμβράνη 250% μεγαλύτερη ποσότητα GalAGs σε σύγκριση με τα SW1116 κύτταρα (Πίνακας 3.1). Επίσης, μεταξύ των κυτταρικών σειρών παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σχετικά με το πρότυπο κατανομής του κλάσματος των HS. Στα HT29 κύτταρα, οι HS εντοπίζονται κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη (57%), ενώ τα SW1116 κύτταρα εκκρίνουν και διατηρούν στο κύτταρο περίπου ίσες ποσότητες του συγκεκριμένου τύπου GAG. Αντίθετα, οι GalAGs εμφανίζονται κυρίως ως εκκρινόμενα προϊόντα στα HT29 (62%) καθώς και στα SW1116 (84%) κύτταρα, ενώ και οι δύο κυτταρικές σειρές εκκρίνουν στο υπερκείμενο περισσότερο από 93% του παραγόμενου HA.

Πίνακας 3.1. Επίπεδα και κατανομή των GAGs, ανάμεσα στο υπερκείμενο των καλλιιεργειών και την κυτταρική μεμβράνη, που συνθέτουν οι HT29 και SW1116 καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου του ανθρώπου ^a.

| Cell line | Fraction | HA | GalAGs | HS |
|-----------|---------------|--------------------------|------------|-------------|
| HT29 | Medium | 14373 (>93) ^b | 11330 (62) | 80950 (43) |
| | Cell fraction | - | 4383 (38) | 106610 (57) |
| SW1116 | Medium | 4494 (>93) | 11090 (84) | 61790 (49) |
| | Cell fraction | - | 1766 (16) | 64641 (51) |

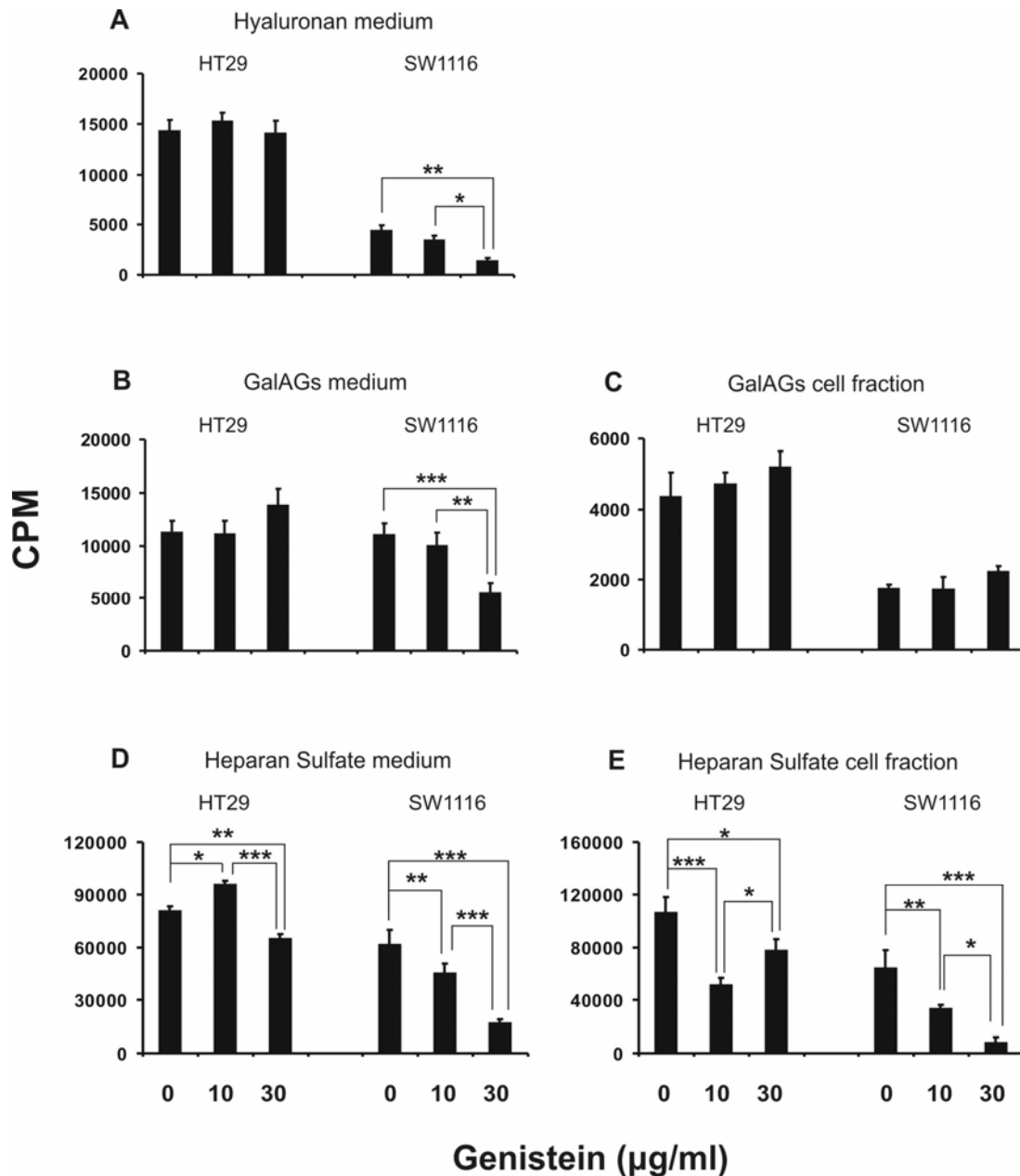
^a Τα επίπεδα εκφράζονται ως [³H]-ενσωματωμένη ραδιενέργεια στις GAGs

^b Το ποσοστό κατανομής των GAGs δίδεται στις παρενθέσεις

3.1.3β Δράση της γενιστεΐνης στη σύνθεση των GAGs/PGs

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της γενιστεΐνης στη σύνθεση εκκρινόμενων και μεμβρανικών GAGs/PGs. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γενιστεΐνη επηρεάζει την σύνθεση των GAGs/PGs στα HT29 κύτταρα με τρόπο εξαρτώμενο από τον τύπο των GAGs και την κατανομή τους. Συγκεκριμένα, τα HT29 κύτταρα παρουσία 10 μg/ml γενιστεΐνης αυξάνουν την σύνθεση των εκκρινόμενων HS, ενώ η σύνθεση των εκκρινόμενων στον εξωκυττάριο χώρο HA και GalAGs δεν επηρεάζεται (Εικόνα 3.1A-E). Η παραγωγή των μεμβρανικών HS μειώνεται στην ίδια συγκέντρωση γενιστεΐνης. Όταν η γενιστεΐνη χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 30 μg/ml, η σύνθεση των εκκρινόμενων HS μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με αυτή των 10 μg/ml γενιστεΐνης (Εικόνα 3.1D), ενώ παράλληλα η σύνθεση των συνολικών GalAGs αυξήθηκε (Εικόνα 3.1B και C).

Η παραγωγή των GAGs από τα SW1116 κύτταρα επηρεάζεται από την γενιστεΐνη με διαφορετικό τρόπο. Τα ποσοστά σύνθεσης του HA, αλλά και αυτά των εκκρινόμενων και μεμβρανικών HS μειώνονται με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα

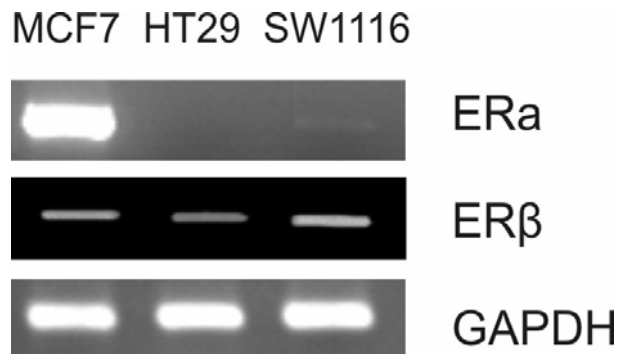


Εικόνα 3.1. Σύνθεση εκκρινόμενων και μεμβρανικών HA, GalAGs, HS από τις κυτταρικές σειρές HT29 και SW1116 και επίδραση της γενιστεΐνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως [³H]-επισημασμένη ραδιενέργεια ενσωματωμένη με την μορφή [³H]-γλουκοζαμίνη στα HA και HS και ως [³H]-γαλακτοζαμίνη στις GalAGs. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε τριπλέτες. Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων ελέγχου και των κυττάρων που έγινε χορήγηση της γενιστεΐνης (10 και 30 μg/ml) : *p < 0.05 , **p < 0.01, ***p < 0.001.

3.1A, D και E). Η παραγωγή των GalAGs που εκκρίνεται μειώνεται μόνο με την μεγαλύτερη συγκέντρωση γενιστεΐνης που χρησιμοποιήσαμε (Εικόνα 3.1B), ενώ η σύνθεση των μεμβρανικών GalAGs δεν επηρεάζεται σημαντικά (Εικόνα 3.1C).

3.1.3γ Μελέτη της έκφρασης των οιστρογονικών υποδοχέων (ERα και β) στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου του ανθρώπου

Ακολούθως εξετάστηκε η έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων (ERα και ERβ) σε επίπεδο mRNA στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου, HT29 και SW1116. Και οι δύο κυτταρικές σειρές εκφράζουν τον υποδοχέα ERβ σε επίπεδο mRNA, ενώ είναι αρνητικές για την έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα ERα (Εικόνα 3.2). Τα MCF7 κύτταρα καρκίνου του μαστού χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό δείγμα αναφοράς.

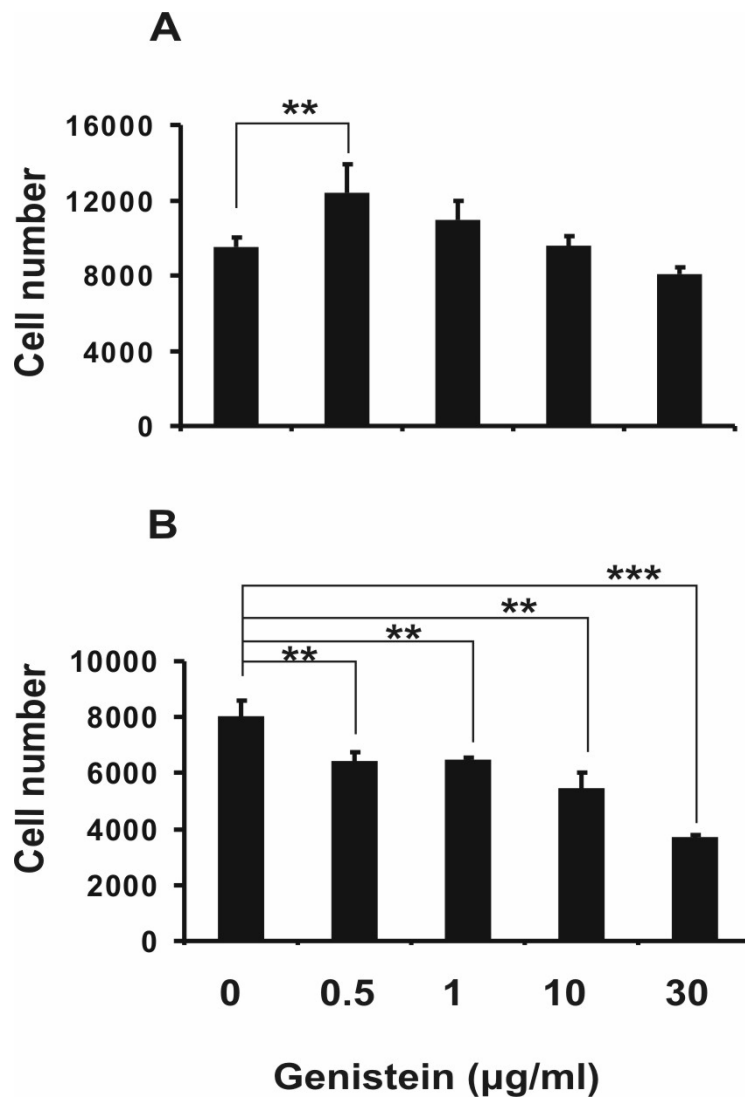


Εικόνα 3.2. Έκφραση, σε επίπεδο mRNA, των ERα, ERβ και GAPDH στις HT29 και SW1116 καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου μετά από RT-PCR ανάλυση. Τα MCF7 καρκινικά κύτταρα του μαστού χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό δείγμα αναφοράς.

3.1.3δ Δράση της γενιστεΐνης στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου

Επεξεργασία των HT29 κυττάρων με 0.5 μg/ml γενιστεΐνης οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της κυτταρικής τους ανάπτυξης (Εικόνα 3.3A). Οι συγκεντρώσεις 1 και 10 μg/ml γενιστεΐνης δεν επηρέασαν τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυτταρικών σειρών, ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση των 30

μg/ml προκάλεσε οριακή μείωση (16%) (Εικόνα 3.3A). Αντίθετα, η επεξεργασία με όλες τις δοκιμασμένες συγκεντρώσεις της γενιστεΐνης οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση του βασικού επιπέδου πολλαπλασιασμού των SW1116 κυττάρων (Εικόνα 3.3B).



Εικόνα 3.3 Δράση της γενιστεΐνης στο βασικό επίπεδο πολλαπλασιασμού καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου. Επίδραση της εξωγενώς προστιθέμενης γενιστεΐνης (0.5, 1, 10 και 30 μg/ml) στα HT29 (A) και SW1116 (B) καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου του ανθρώπου. (Means +/- SEM plotted; n=3) Στατιστικά σημαντικό : **p < 0.01, ***p < 0.001.

3.1.4 Συζήτηση

Η ικανότητα αμφότερων των καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου, HT29 και SW1116, να συνθέτουν GAGs/PGs επηρεάζεται σημαντικά από την προσθήκη γενιστεΐνης στις κυτταρικές καλλιέργειες. Το συγκεκριμένο ισοφλαβονοειδές έχειδειχθεί ότι αποτελεί ειδικό αναστολέα των κινασών της τυροσίνης (PTK) και ότι επιδρά ελάχιστα στην φωσφορυλίωση των κινασών θρεονίνης και σερίνης (Akiyama *et al.*, 1987; Sarkar & Li, 2002). Επομένως, η δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση της γενιστεΐνης στη σύνθεση των εκκρινόμενων και των μεμβρανικά συνδεδεμένων GAGs/PGs από τα SW1116 κύτταρα μπορεί να αποδοθεί στη δράση που ασκεί η ίδια στο PTK μονοπάτι σηματοδότησης. Το ανασταλτικό αποτέλεσμα της γενιστεΐνης στην παραγωγή των GAGs/PGs από τα SW1116 μέσω ενός PTK μηχανισμού βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που αφορούν κυτταρικές σειρές ανθρώπινου κακοήθους μεσοθηλιώματος επιθηλιακής και σαρκωματώδους διαφοροποίησης (Tzanakakis *et al.*, 1997; Syrokou *et al.*, 1999), καθώς και κύτταρα οστεοσαρκώματος (Nikitovic *et al.*, 2003).

Η γενιστεΐνη επηρεάζει την σύνθεση των GAGs/PGs στα HT29 κύτταρα τόσο στον τύπο των GAGs όσο και στην κατανομή τους. Συγκεκριμένα, η έκκριση των HS αυξήθηκε σημαντικά, ενώ η παραγωγή των μεμβρανικά συνδεδεμένων HS παρουσίασε έντονη μείωση. Παρατηρήθηκε μέτρια ενεργοποίηση της σύνθεσης των GalAGs, αλλά η παραγωγή του HA δεν επηρεάστηκε από την παρουσία της γενιστεΐνης. Η διαφορετική επίδραση της γενιστεΐνης στα αντίστοιχα κλάσματα των GAGs μπορεί μερικώς να εξηγηθεί από την ανασταλτική της δράση σε ειδικές κινάσες τυροσίνης. Έχειδειχθεί ότι στα HT29 κύτταρα η γενιστεΐνη αναστέλλει ειδικά τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα IGF-I, αλλά δεν επηρεάζει τη σηματοδότηση του EGF (Kim *et al.*, 2005).

Η γενιστεΐνη αναφέρεται επίσης ως φυτοοιστρογόνο που έχει παρόμοια δομή με την οιστραδιόλη και ασκεί οιστρογονική επίδραση (Arai *et al.*, 2000) κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασής της με τον υποδοχέα ERβ, για τον οποίο η ικανότητα πρόσδεσης της γενιστεΐνης είναι παρόμοια (94%) με αυτή του οιστρογόνου (Sarkar & Li, 2002). Τα οιστρογόνα έχει αναφερθεί ότι διαδραματίζουν ποικίλους ρόλους στην διαδικασία

της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου (Biglia *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004), καθώς επίσης έχει δειχθεί ότι αυξάνουν και/ή μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Biglia *et al.*, 2004; Di Leo *et al.*, 2001). Και οι δύο κυτταρικές σειρές, HT29 και SW1116, εκφράζουν τον υποδοχέα ERβ σε επίπεδο mRNA και είναι αρνητικές για την έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα ERα (Campbell-Thompson *et al.*, 2001). Μελέτες έχουν δείξει ότι η γενιστεΐνη διεγείρει τη σύνθεση των πρωτεογλυκανών στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 με ER+, καθώς και τον κυτταρικό τους πολλαπλασιασμό (Mitrouroulou *et al.*, 2002). Επομένως, η παρατηρούμενη εκλεκτική ενεργοποίηση της σύνθεσης των GAGs στα HT29 κύτταρα, υποδεικνύει ανάλογη ανταπόκριση με αυτή που έχουν στα οιστρογόνα, γεγονός που δεν ισχύει για τα SW1116 κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανώς να αντανakλούν τη διαφορετική επίδραση των οιστρογόνων στους ετερογενείς πληθυσμούς που συγκροτούν τον καρκινικό όγκο του παχέος εντέρου. Η ενεργοποίηση των ER από τη γενιστεΐνη στα HT29 κύτταρα ενισχύεται από τα αποτελέσματα των πειραμάτων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα οποία η γενιστεΐνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις, δρώντας πιθανά ως οιστρογονικός ενεργοποιητής, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των συγκεκριμένων κυττάρων, σε αντίθεση με τα SW1116 κύτταρα στα οποία όλες τις συγκεντρώσεις της γενιστεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν οδήγησαν σε συνεχή μείωση του βασικού επιπέδου του πολλαπλασιασμού τους.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η γενιστεΐνη επηρεάζει την σύνθεση των HA, GalAG και HS των δύο κυτταρικών σειρών παχέως εντέρου που εκφράζουν οιστρογονικούς υποδοχείς. Η προσθήκη της γενιστεΐνης 10 και 30 μg/ml, ανέστειλε με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την σύνθεση των εκκρινόμενων και των μεμβρανικών GAGs/PGs από τα SW1116 κύτταρα καθώς και τον πολλαπλασιασμό τους, πιθανότατα μέσω ενός PTK μηχανισμού. Η σύνθεση των GAGs/PGs από τα HT29 κύτταρα παρουσία γενιστεΐνης εμφανίζεται να είναι εξαρτώμενη από τον τύπο και την θέση τους, γεγονός που υποδεικνύει την πιθανή συμμετοχή των οιστρογονικών υποδοχέων. Η λειτουργία των οιστρογονικών υποδοχέων στα συγκεκριμένα κύτταρα ενισχύεται και από την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού τους που παρατηρήθηκε με την επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων γενιστεΐνης.

3.2 Επίδραση των γλυκοζαμινογλυκανών/πρωτεογλυκανών (GAGs/PGs) στο ρυθμό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου του ανθρώπου

3.2.1 Γενικά

Οι PGs είναι μακρομόρια που εντοπίζονται κυρίως στον εξωκυττάριο χώρο και στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ υπάρχουν και κάποιες ενδοκυτταριες PGs. Μέσω του πρωτεϊνικού τους κορμού ή διαμέσου των γλυκοζαμινογλυκανικών (GAGs) τους αλυσίδων, όπως της θεικής χονδροϊτίνης, κερατάνης, δερματάνης (CS, KS, DS) ή θεικής ηπαράνης (HS), οι PGs είναι ικανές να αλληλεπιδρούν με κολλαγόνο, αυξητικούς παράγοντες, υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων καθώς και με μόρια προσκόλλησης (Fjeldstad & Kolset, 2005). Οι PGs μέσω των παραπάνω αλληλεπιδράσεων συμμετέχουν στη ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών, όπως του πολλαπλασιασμού, προσκόλλησης ή μετανάστευσης των κυττάρων (Fjeldstad & Kolset, 2005; Wight & Kinsella, 1992). Μελέτες αναφέρουν ότι η επίδραση των GAGs/PGs στις κυτταρικές λειτουργίες καθορίζεται από τον πρωτεϊνικό τους κορμό, τη δομή, συγκέντρωση και θεϊωση των GAG αλυσίδων τους, τον κυτταρικό τύπο, καθώς και από τη σύνθεση της περιβάλλουσας ECM (Wright *et al.*, 1989; Volpi *et al.*, 1993; Volpi & Petrini, 1994; Aguiar *et al.*, 2005; Syrokou *et al.*, 1999; Nikitovic *et al.*, 2005).

Οι εξωγενώς προστιθέμενες GAGs επιδρούν στην ανάπτυξη φυσιολογικών και/ή μετασχηματισμένων κυττάρων σε καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, οι αλυσίδες DS, CS και η ηπαρίνη έχει δειχθεί ότι αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων κυττάρων μελανώματος (Nikitovic *et al.*, 2008). Οι αλυσίδες DS διεγείρουν την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών ανθρώπινου μεσοθηλιώματος και λευχαιμίας (Maurer *et al.*, 1994; Volpi & Petrini, 1994; Syrokou *et al.*, 1999), ενώ καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών ανθρώπινων ινοβλαστών πνεύμονα (Westergren-Thorsson & Persson, 1993; Fthenou *et al.*, 2007). Μελέτες αναφέρουν ότι οι αλυσίδες CS έχουν διεγερτική επίδραση σε κύτταρα λευχαιμίας (Maurer *et al.*, 1994; Volpi & Petrini, 1994) και σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες πνεύμονα (Westergren-Thorsson & Persson, 1993; Fthenou *et al.*, 2007). Το υαλουρονικό (HA) έχει δειχθεί

ότι αναστέλλει την ανάπτυξη κυττάρων ανθρώπινου μεσοθηλιώματος (Syrokou *et al.*, 1999), ενώ αντίθετα δρά διεγερτικά στην ανάπτυξη ανθρώπινων κυτταρικών σειρών λευχαιμίας (Maurer *et al.*, 1994). Παρόμοια αντιφατικά αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για τη δράση της ηπαρίνης. Μελέτες επισημαίνουν ότι η ηπαρίνη αναστέλλει τον *in vitro* πολλαπλασιασμό ποικίλων κυτταρικών σειρών, όπως των λείων μυικών κυττάρων των αγγείων (Au *et al.*, 1993), των φυσιολογικών ινοβλαστών (Ferraro & Mason, 1993; Westergren-Thorsson & Persson, 1993), των μεσεγχυματικών κυττάρων (Flint *et al.*, 1994), των οστεοβλαστών και των ανθρώπινων κυττάρων οστεοσαρκώματος (Nikitovic *et al.*, 2005; Hausser & Brenner, 2004). Υπάρχουν όμως και μελέτες που δείχνουν ότι η ηπαρίνη αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων (Flint *et al.*, 1994), των κυττάρων λευχαιμίας (Maurer *et al.*, 1994) και των κυττάρων ανθρώπινου καρκινώματος του στομάχου (Wu *et al.*, 2006).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η ECM που εκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα και πιά συγκεκριμένα οι πρωτεογλυκάνες θεικής ηπαράνης που εντοπίζονται μέσα σε αυτή, διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω της επαγωγής αυτοκρινών αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους (Zvibel *et al.*, 1998; Zvibel *et al.*, 1999; Zvibel *et al.*, 1998). Είναι γνωστό ότι ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες όπως οι FGF-2 και HB-EGF που αλληλεπιδρούν με μόρια θεικής ηπαράνης, δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν τα σηματοδοτικά τους μονοπάτια απουσία των αλυσίδων αυτών (Yayon *et al.*, 1991; Aviezer *et al.*, 1997). Η ηπαρίνη ή οι αλυσίδες θεικής ηπαράνης είναι απαραίτητες για την πρόσδεση του FGF-2 στους υψηλής συγγένειας υποδοχείς του, FGFR1-4, και στη δημιουργία ενός συμπλόκου που οδηγεί στην ενεργοποίηση των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών (Yayon *et al.*, 1991). Πειραματικά έχει δειχθεί ότι η ρύθμιση της λειτουργίας του FGF-2 από την ηπαρίνη εξαρτάται από τα ενδογενή επίπεδα HSPGs του κυττάρου και από την συγκέντρωση της ηπαρίνης (Forsten *et al.*, 2000).

3.2.2 Στόχος

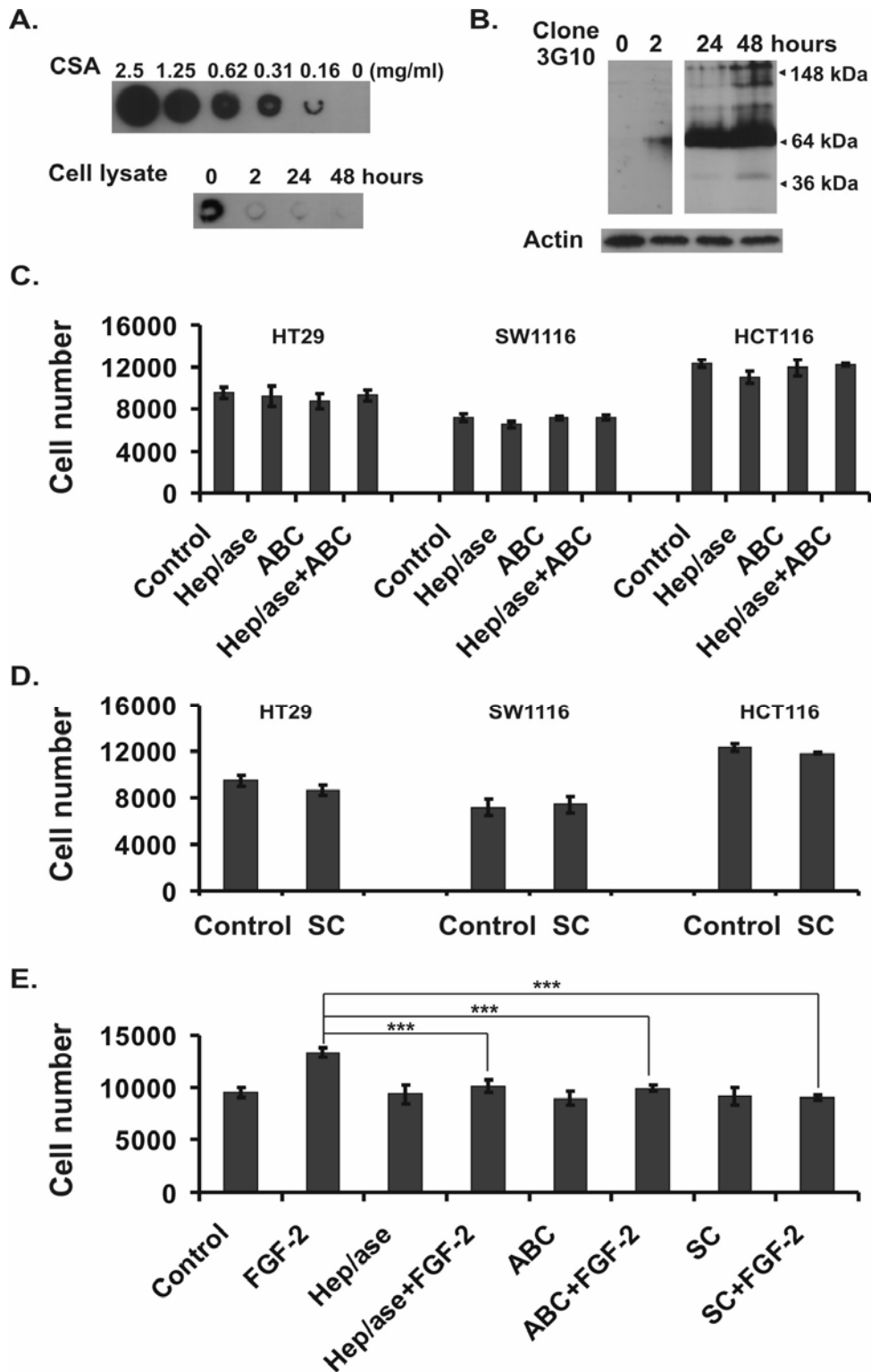
Στην παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκε αρχικά επεξεργασία με εξωγενώς προστιθέμενες GAGs αλυσίδες, στη συνέχεια αναστολή της σύνθεσης των ενδογενών GAGs/PGs και ενζυμική επεξεργασία για την απομάκρυνση των μεμβρανικών GAGs με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης των κυριότερων τύπων GAGs (CS, DS, HA και ηπαρίνη) στον πολλαπλασιασμό τριών ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών παχέος εντέρου, δύο μετρίου βαθμού διαφοροποίησης (HT29 και SW1116) και μιας επί πλέον χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης (HCT116) για ακριβέστερη αξιολόγηση και σύγκριση των αποτελεσμάτων.

3.2.3 Αποτελέσματα

3.2.3α Ρόλος των μεμβρανικών και των ενδογενών GAGs/PGs στην ανάπτυξη των ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου

Η πιθανή συμμετοχή των διαφορετικών επιφανειακών GAGs/PGs στην ανάπτυξη των κυττάρων αυτών μελετήθηκε με τη χορήγηση των ένζυμων χονδροϊτινάση ABC και ηπαριτινάση. Η χορήγηση της χονδροϊτινάσης ABC στα κύτταρα είχε ως στόχο την απομάκρυνση των αλυσίδων CS και DS, ενώ οι αλυσίδες HS αφαιρέθηκαν με τη χορήγηση της ηπαριτινάσης. Η ενζυμική επεξεργασία των κυττάρων με χονδροϊτινάση ABC (Εικόνα 3.4A) δεν είχε κανένα σημαντικό αποτέλεσμα στο βασικό επίπεδο αύξησης των τριών κυτταρικών σειρών (Εικόνα 3.4C). Ο πολλαπλασιασμός των HT29, SW1116 και HCT116 κυττάρων επίσης δεν επηρεάστηκε από την απομάκρυνση των αλυσίδων HS με την ηπαριτινάση (Εικόνα 3.4B, C). Επίσης, η αφαίρεση των αλυσίδων CS, DS και HS ως αποτέλεσμα της συνδυασμένης χρήσης των δύο ενζύμων δεν είχε καμία επίδραση στο βασικό επίπεδο πολλαπλασιασμού των HT29, SW1116 και HCT116 κυτταρικών σειρών (Εικόνα 3.4C). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι ο πολλαπλασιασμός των συγκεκριμένων κυττάρων είναι ανεξάρτητος από το περιεχόμενο των μεμβρανικών τους GAGs.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ένας εξωγενώς προστιθέμενος αναστολέας της θείωσης των αλυσίδων των GAGs, το χλωρικό νάτριο (SC), για την μελέτη της



Εικόνα 3.4. Δράση της χονδροϊτινάσης ABC, της ηπαριτινάσης, του FGF-2 και του γλωρικού νατρίου στον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου. A: Ανίχνευση των αλυσίδων CSA με ανοσοαποτύπωση κηλίδας (dot blot analysis).

Αυξανόμενες συγκεντρώσεις του CSA (0.15 έως 2.5 mg/mL) και 40 μl κυτταρικών εκχυλισμάτων από τα HT29 κύτταρα στα οποία είχε γίνει επίδραση με τη χονδροϊτινάση ABC (0.1 U/mL) για 0, 2, 24 και 48 ώρες ακινητοποιήθηκαν σε θετικά φορτισμένες μεμβράνες PVDF. B: Κυτταρικά εκχυλίσματα από τα HT29 κύτταρα μετά από χορήγηση ηπαριτινάσης (0.001 U/mL) για 0, 2, 24 και 48 ώρες, ανιχνεύτηκαν με το μονοκλωνικό αντίσωμα 3G10 που αναγνωρίζει τον επίτοπο που δημιουργείται μετά από την πέψη με την ηπαριτινάση (διαδρομή 1: κύτταρα ελέγχου, διαδρομή 2: κύτταρα μετά τη χορήγηση ηπαριτινάσης για 2 ώρες, διαδρομή 3: κύτταρα μετά τη χορήγηση ηπαριτινάσης για 24 ώρες, διαδρομή 4: κύτταρα μετά τη χορήγηση ηπαριτινάσης για 48 ώρες). C, D: Επίδραση της χορήγησης των GAG λυασών και του χλωρικού νατρίου (SC) (25 mM/well) στον πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 κυττάρων και E: σε συνδιασμό με τη χορήγηση FGF-2 στα HT29 κύτταρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε τριπλέτες. Means±S.E.M. plotted: στατιστικά σημαντικό: ***p < 0.001.

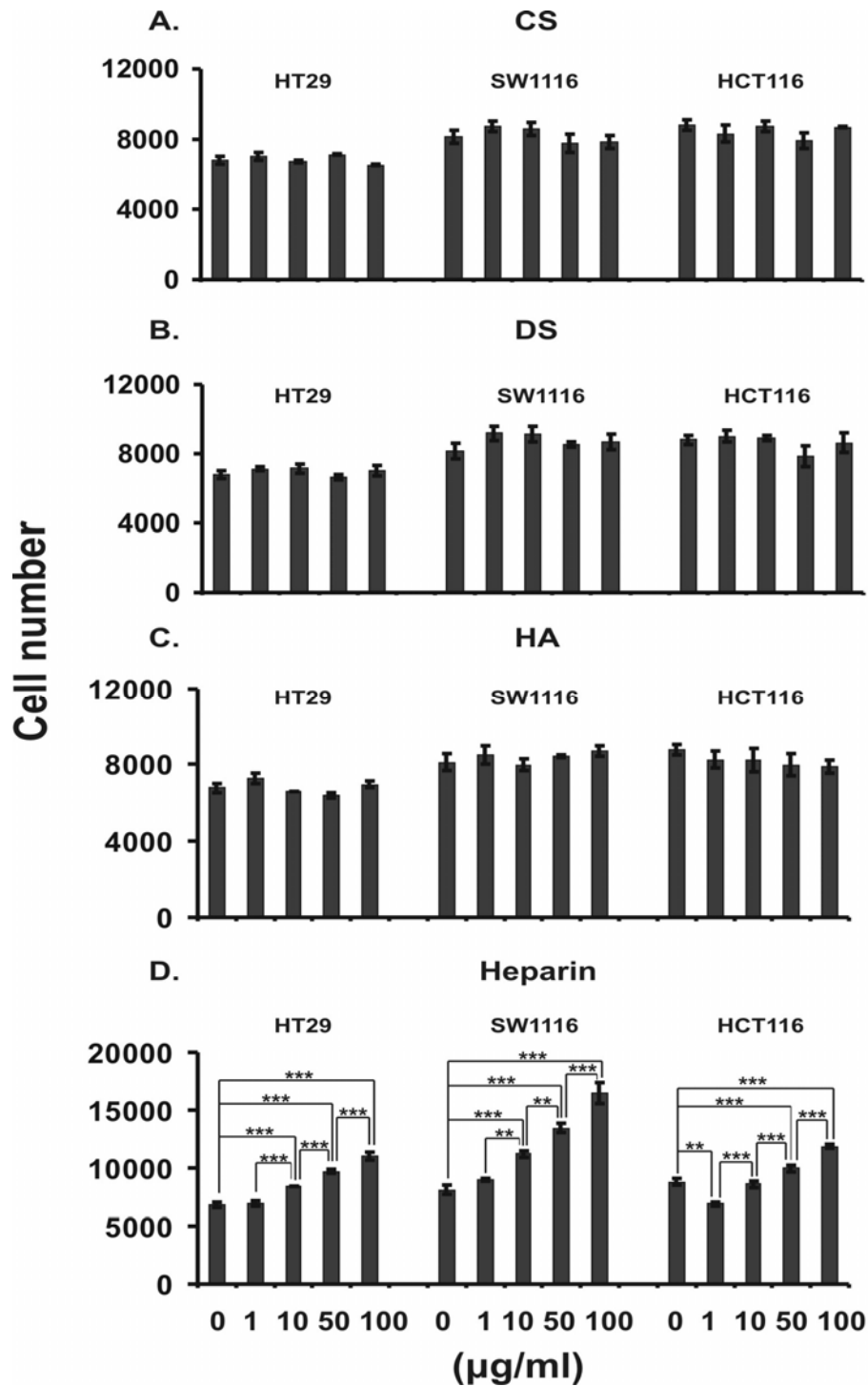
δράσης των ενδογενών GAGs στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4D, η εξωγενής χορήγηση του χλωρικού νατρίου δεν είχε επίδραση στο βασικό επίπεδο πολλαπλασιασμού των τριών κυτταρικών σειρών, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι θειωμένες PGs δεν είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των συγκεκριμένων καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου. Επιπρόσθετα πειράματα με ένζυμα-λύασες ή με χλωρικό νάτριο αρχικά και χορήγηση του FGF-2 στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν στα HT29 κύτταρα με σκοπό την επιβεβαίωση της ορθότητας των πειραμάτων που προηγήθηκαν και στα οποία έγινε αναστολή της σύνθεσης των ενδογενών GAGs (Εικόνα 3.4E).

3.2.3β Δράση των εξωγενών GAGs στον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των εξωγενώς προστιθέμενων GAGs στον πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Η χορήγηση των αλυσίδων CS ή DS δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στο βασικό επίπεδο πολλαπλασιασμού των HT29, SW1116 και HCT116 κυττάρων, σε καμία από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 3.5A, B). Παρομοίως, ο ρυθμός του βασικού επιπέδου ανάπτυξης των τριών κυτταρικών σειρών δεν άλλαξε παρουσία των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων του HA (Εικόνα 3.5C). Αντίθετα, η εξωγενώς προστιθέμενη ηπαρίνη είχε ως αποτέλεσμα τη δόσοεξαρτώμενη διέγερση της ανάπτυξης των HT29, SW1116 και HCT116 καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Εικόνα 3.5D). Συγκεκριμένα, η παρουσία της ηπαρίνης, στη συγκέντρωση των 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οδήγησε σε δόσοεξαρτώμενη αύξηση του πολλαπλασιασμού των HT29 και SW1116 κυττάρων. Ο ρυθμός ανάπτυξης των HCT116 κυττάρων αυξήθηκε σημαντικά μετά τη χορήγηση 50 και 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ηπαρίνης, ενώ δεν παρατηρήθηκε παρόμοια επίδραση στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Καμία από τις συγκεντρώσεις των αλυσίδων των GAGs που χρησιμοποιήθηκαν δεν είχε τοξική επίδραση στα κύτταρα ή αλλαγές στη μορφολογία τους. Προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα της ύπαρξης ενεργών αυξητικών παραγόντων ικανών να αλληλεπιδρούν με την ηπαρίνη πραγματοποιήθηκε βρασμός στο παρακείμενο της ηπαρίνης που χρησιμοποιήθηκε. Ο βρασμός δεν επηρέασε τη δράση της ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

3.2.3γ Προσδιορισμός της θείωσης των HS (GlcAGs) δισακχαριτικών μονάδων των καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου

Προηγούμενες μελέτες έχουν συνδέσει τη θείωση των GAG αλυσίδων με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν ανάλυση των αλυσίδων HS που παράγονται από τα HT29, SW1116 και HCT116 κύτταρα. Η ανάλυση HPCE μετά από πέψεις με ειδικά ένζυμα έδειξε ότι η χημική σύνθεση των εξεταζόμενων HS



Εικόνα 3.5. Επίδραση των αλυσίδων (A) CS, (B) DS, (C) HA και της (D) ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε τριπλέτες. Means±S.E.M. plotted· στατιστικά σημαντικό: **p < 0.01***p < 0.001.

διαφέρει σημαντικά μεταξύ των κυτταρικών σειρών (Πίνακας 3.2). Συγκεκριμένα, ο μη-θειωμένος δισακχαρίτης (Δdi-nonS) ήταν η κύρια δισακχακχαριτική μονάδα των κυτταροσυνδεδεμένων HS που παράγονται από τα HCT116 κύτταρα. Αντίθετα, μέχρι και 62% των μεμβρανικά συνδεδεμένων HS που συνθέτουν τα HT29 κύτταρα ήταν μονο-θειωμένοι Δdi-mono6S και Δdi-mono2S δισακχαρίτες. Ως κύρια δισακχαριτική μονάδα των μεμβρανικών HS των κυττάρων SW1116 ανιχνεύτηκε η Δdi-mono6S, που αποτελεί το 63% της συνολικής ποσότητας των μεμβρανικά συνδεδεμένων HS αλυσίδων των κυττάρων αυτών. Παρατηρήθηκαν επίσης διαφορές μεταξύ των κυτταρικών σειρών που εξετάστηκαν όσον αφορά τις ποσότητες των HS δισακχαριτών που εντοπίζονται στη κυτταρική τους μεμβράνη. Τα HT29 κύτταρα παρήγαγαν 0.8μg ανά 10^6 κύτταρα, ενώ 0.4 and 0.5μg ανά 10^6 κύτταρα ανιχνεύτηκαν στη μεμβράνη των HCT116 και SW1116 κυττάρων.

Πίνακας 3.2. Ανάλυση της θείωσης των HS δισακχαριτών μετά από ειδική ενζυμική επεξεργασία και HPCE ανάλυση.

| Disaccharides | HT29 | SW1116 | HCT116 |
|---------------|------|--------|--------|
| Δdi-nonS | 38* | 37 | > 90 |
| Δdi-mono2S | 26 | - | traces |
| Δdi-mono6S | 36 | 63 | traces |

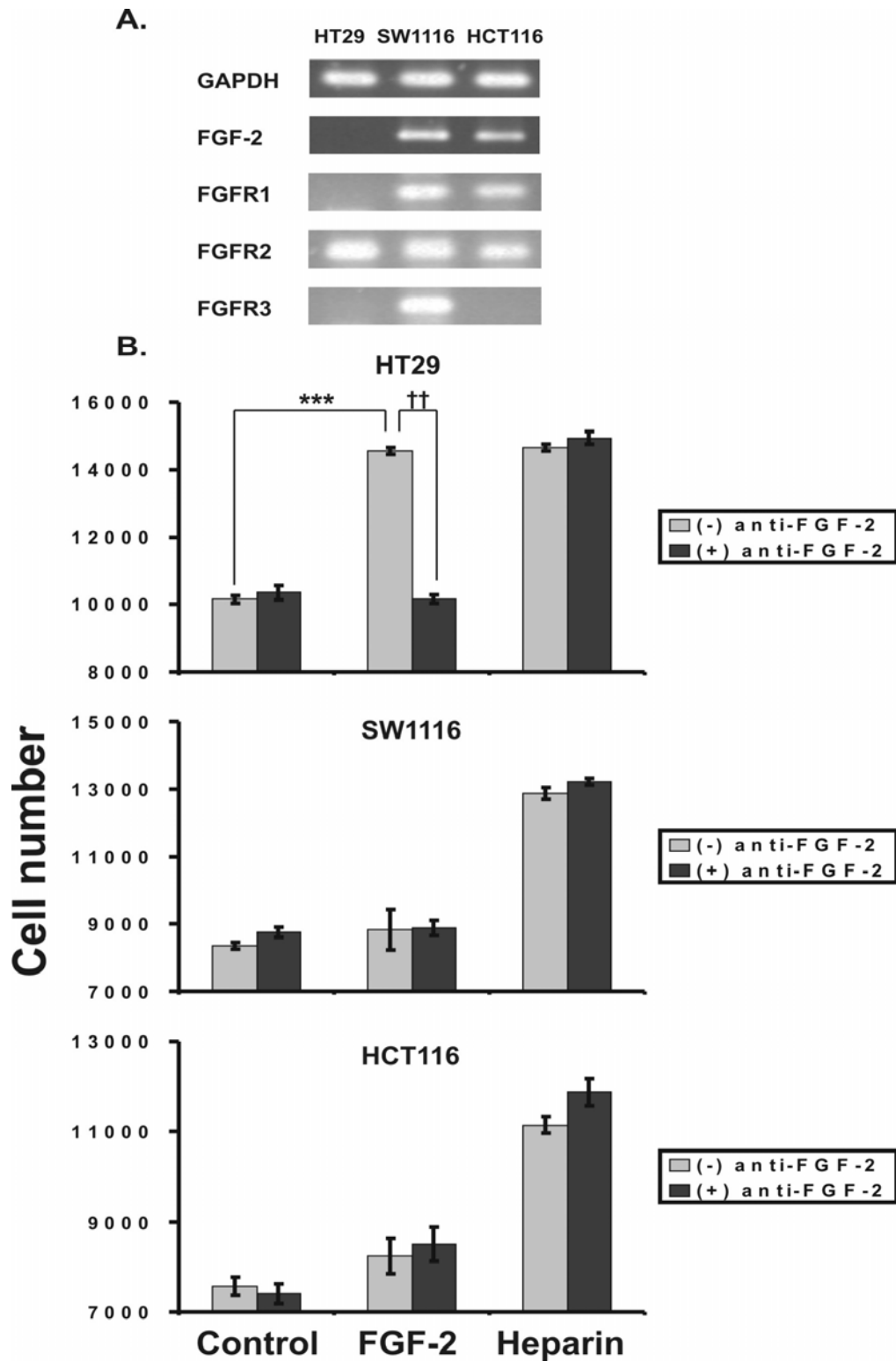
* Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό της συνολικής ποσότητας των Δ-δισακχαριτών που ανιχνεύτηκαν από την HPCE ανάλυση.

3.2.3δ Προφίλ έκφρασης του FGF-2 και των υποδοχέων του – Παρέμβαση στη δράση του αυξητικού παράγοντα

Για να μελετηθεί η πιθανή συμμετοχή του FGF-2 σηματοδοτικού μονοπατιού στη δράση της ηπαρίνης, έγινε ανάλυση της έκφρασης του ίδιου του αυξητικού παράγοντα και των υποδοχέων του στις συγκεκριμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου, τόσο σε μοριακό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο με ανάλυση RT-

PCR και western blotting, αντίστοιχα. Όπως φαίνεται και στην 3.6A, τα SW1116 και HCT116 κύτταρα εκφράζουν τον FGF-2 σε mRNA επίπεδο, ενώ η κυτταρική σειρά HT29 ήταν αρνητική για τον συγκεκριμένο αυξητικό παράγοντα σε μοριακό και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στα επίπεδο έκφρασης του FGF-2 mRNA μετά την προσθήκη ηπαρίνης (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) στα HT29 κύτταρα. Όλες οι κυτταρικές σειρές εκφράζουν τον FGFR-2 υποδοχέα σε επίπεδο mRNA, ενώ σε καμία από αυτές δεν βρέθηκαν ανιχνεύσιμα mRNA επίπεδα του FGFR-4. Η έκφραση των υποδοχέων FGFR-1 και -3 ήταν συγκεκριμένη για κάθε κυτταρική σειρά. Ο FGFR-1 εκφράζεται από τις κυτταρικές σειρές SW1116 και HCT116, αλλά όχι από τα HT29 κύτταρα. Όλες οι κυτταρικές σειρές βρέθηκαν να εκφράζουν τον FGFR-2, ενώ καμία δεν εκφράζει ανιχνεύσιμα επίπεδα FGFR-4. Από τις τρεις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, μόνο τα SW1116 κύτταρα εκφράζουν τον FGFR-3 σε επίπεδο mRNA.

Εξωγενής προσθήκη του FGF-2 (10 ng/mL) προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού μόνο των HT29 κυττάρων (Εικόνα 3.6B). Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντισώματος anti-FGF-2 που θα χρησιμοποιηθεί, έγιναν πιλοτικά πειράματα με τα HT29 κύτταρα που έδειξαν ότι η ταυτόχρονη χορήγηση του αντισώματος anti-FGF στη συγκέντρωση των 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ή και μεγαλύτερων συγκεντρώσεων ανέστειλε πλήρως τον επαγόμενο από τον FGF-2 πολλαπλασιασμό των HT29 κυττάρων. Για να εξεταστεί η πιθανότητα η ηπαρίνη να δρά μέσω του FGF-2 σηματοδοτικού μονοπατιού, χορηγήθηκε και στις τρεις κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου συνδυασμός της ηπαρίνης (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και του αντισώματος anti-FGF-2 στη συγκέντρωση των 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η προσθήκη της ηπαρίνης παρουσία του anti-FGF-2 αντισώματος οδήγησε σε διέγερση της ανάπτυξης των κυττάρων που είχαν υποστεί επεξεργασία με το αντίσωμα, στο ίδιο επίπεδο με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί ηπαρίνη. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η δράση της ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 κυττάρων δεν εξαρτάται από το FGF-2 σηματοδοτικό μονοπάτι.



Εικόνα 3.6. (Α) Έκφραση, σε επίπεδο mRNA, του αυξητικού παράγοντα FGF-2 και των υποδοχέων του (FGFR1-4) στις HT29, SW1116 και HCT116 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου, σύμφωνα με τη μέθοδο RT-PCR. Η GAPDH

χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. (B) Επίδραση της εξωγενώς προστιθέμενης ηπαρίνης παρουσία του anti-FGF-2 αντισώματος. Στα HT29, SW1116 και HCT116 κύτταρα, σε συνθήκες καλλιέργειας έλλειψης ορού, χορηγήθηκε ηπαρίνη (50 $\mu\text{g/ml}$) παρουσία του anti-FGF-2 αντισώματος (0.1 $\mu\text{g/ml}$) για 48 ώρες. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε τριπλέτες. Means \pm S.E.M. plotted; στατιστικά σημαντικό: *** $p < 0.001$ μεταξύ κυττάρων ελέγχου και κυττάρων που έγινε χορήγηση FGF-2 †† $p < 0.001$ μεταξύ κυττάρων που έχει χορηγηθεί FGF-2 και κυττάρων που έγινε χορήγηση anti-FGF2/FGF-2.

3.2.4 Συζήτηση

Οι σύνθετες αλληλεπιδράσεις των καρκινικών κυττάρων με τα γειτονικά φυσιολογικά κύτταρα και την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία τους έχει επισημανθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου (Zigrino *et al.*, 2005; Aguiar *et al.*, 2005; Lin & Bissell, 1993). Τα κακοήθη κύτταρα τροποποιούν ενεργά τη σύσταση της ECM τους ώστε να ευνοηθεί η ανάπτυξη του όγκου (Pupa *et al.*, 2002; Aguiar *et al.*, 2005; Ricciardelli & Rodgers, 2006). Παρομοίως, τα γειτονικά κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων που μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη και την εξέλιξή τους (Morikawa *et al.*, 1988; Doerr *et al.*, 1989; Bosman *et al.*, 1993). Οι GAGs/PGs είναι κύρια συστατικά της ECM και έχει δειχθεί ότι συμμετέχουν στη παθογένεση των όγκων μέσω των πρωτεϊνικών τους κορμών και των GAG αλυσίδων τους (Fjeldstad & Kolset, 2005).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, το χλωρικό νάτριο (SC), ένας γνωστός αναστολέας της θείωσης των αλυσίδων των GAGs, χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της δράσης των ενδογενών GAGs στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Το SC αναστέλλει τη θείωση των αλυσίδων των GAGs με αποτέλεσμα την παραγωγή ανώμαλα γλυκοζυλιωμένων PGs των οποίων η έκκριση παρεμποδίζεται μερικώς από ποιοτικούς μηχανισμούς ελέγχου των κυττάρων (Fannon & Nugent, 1996). Ανταγωνίζεται το θείο στη σύνθεση του 3'-φωσφοαδενοσίνη 5'-θειϊκοφωσφόρο, που είναι η πηγή του θείου για τη θείωση των GAGs, χωρίς καμία επίδραση στις GAGs, στη σύνθεση των πρωτεϊνών ή στη βιωσιμότητα του κυττάρου

(Yip *et al.*, 2002). Έχει επίσης δειχθεί ότι δεν προκαλεί τοξικά φαινόμενα στα κύτταρα ούτε μετά από παρατεταμένη χορήγηση (Mendes de Aguiar *et al.*, 2002; Fannon & Nugent, 1996). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η μείωση της θείωσης των GAGs/PGs από τη δράση του SC μειώνει το βασικό επίπεδο πολλαπλασιασμού ποικίλων κυτταρικών σειρών, όπως του ινοσαρκώματος, της λευχαιμίας και του μελανώματος (Alvarez-Silva & Trentin, 1996; Fthenou *et al.*, 2006; Nikitovic *et al.*, 2008). Η εξωγενής χορήγηση του SC δεν είχε επίδραση στο βασικό επίπεδο πολλαπλασιασμού των HT29, SW1116 και HCT116 κυττάρων, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι ενδογενείς θειωμένες GAGs/PGs δεν είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των συγκεκριμένων καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου.

Ειδικές λύσεις των GAGs έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί σε ζωντανά κύτταρα για την μελέτη του ρόλου των CSPGs και HSPGs της κυτταρικής επιφάνειας (Denholm *et al.*, 2000; Lyon *et al.*, 1997; Maeda *et al.*, 1996; Milev *et al.*, 1998; Rapraeger and Yeaman, 1989). Η απομάκρυνση των μεμβρανικών αλυσίδων των CS/DS/HS με τη χορήγηση ηπαριτινάσης, χονδροϊτινάσης ABC ή και με τον συνδυασμό αυτών, ώστε να αποκλειστεί πιθανή αθροιστική τους δράση δεν επηρέασε το βασικό επίπεδο πολλαπλασιασμού των HT29, SW1116 και HCT116 κυττάρων, αποδεικνύοντας ότι δεν είναι ευαίσθητα στις αλλαγές των μεμβρανικών GAGs/PGs.

Στη συνέχεια, παρασκευάσματα των αλυσίδων CS, DS, HA και της ηπαρίνης, που είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί βιοχημικά (Nikitovic *et al.*, 2005), προστέθηκαν εξωγενώς και στις τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου. Μετά τη χορήγηση της ηπαρίνης ο ρυθμός ανάπτυξης των HT29, SW1116 και HCT116 κυττάρων αυξήθηκε σημαντικά, σε αντίθεση με τα παρασκευάσματα των υπολοίπων GAGs που δεν είχαν καμία επίδραση. Μελέτες αναφέρουν τη διεγερτική αλλά και την ανασταλτική δράση της ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό ποικίλων κυτταρικών τύπων (Syrokou & Tzanakakis, 1999; Nikitovic *et al.*, 2005; Fthenou *et al.*, 2006; Au *et al.*, 1993; Maurer *et al.*, 1994). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η εξωγενώς προστιθέμενη ηπαρίνη και οι αλυσίδες HS που παράγονται από τα κύτταρα του ήπατος επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω της επαγωγής της έκφρασης των υποδοχέων EGFR και της erb-B

οικογένειας (Fishman *et al.*, 2002; Zvibel *et al.*, 1998). Είναι αξιοσημείωτο ότι τα ηπατοκύτταρα *in vivo* παράγουν αρκετά μεγάλη ποσότητα των HS (~ 0.08 mg ανά γραμμάριο υγρού ηπατικού ιστού) (Vongchan *et al.*, 2005). Επομένως, από τις παραπάνω μελέτες φαίνεται ότι η ηπαρίνη/HS παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου.

Μελέτες επισημαίνουν ότι η επίδραση των GAGs στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι στενά συνδεδεμένη με τη δομή των GAG αλυσίδων και με το βαθμό της θείωσης τους (Syrokou & Tzanakakis, 1999; Nikitovic *et al.*, 2005). Έχει αναφερθεί η διεγερτική επίδραση ενός τρι-θειωμένου δισακχαρίτη σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου με χαμηλό μεταστατικό δυναμικό, ενώ ο πολλαπλασιασμός κυτταρικών σειρών με υψηλό μεταστατικό δυναμικό οδηγήθηκε σε μείωση από έναν HS δισακχαρίτη με δύο θειϊκές ομάδες (Fishman *et al.*, 2002). Στη δική μας μελέτη φάνηκε ότι οι τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου που χρησιμοποιήθηκαν παράγουν αλυσίδες HS αποτελούμενες από μη θειωμένους και/ή μονο-θειωμένους δισακχαρίτες. Οι HS αλυσίδες που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη των HCT116 κυττάρων εμφανίζονται πλούσιες σε μη θειωμένους δισακχαρίτες, ενώ τα HT29 και SW1116 κύτταρα παρουσιάζουν υψηλό περιεχόμενο σε Δdi-mono6S and Δdi-mono2S HS δισακχαρίτες, καθώς και σε μη θειωμένους δισακχαρίτες. Το γεγονός αυτό είναι αξιοσημείωτο καθώς προσδιορίζει ότι οι HS αλυσίδες των συγκεκριμένων κυτταρικών σειρών να έχουν χαμηλό ολικό φορτίο και θείωση. Σε προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί ότι τα μετασχηματισμένα/αδιαφοροποίητα HT29 κύτταρα έχουν HS αλυσίδες με μικρότερο βαθμό θείωσης σε σύγκριση με τα αντίστοιχα διαφοροποιημένα κύτταρα (Molist *et al.*, 1997). Το παρασκεύασμα της ηπαρίνης που χρησιμοποιήθηκε είχε δειχθεί σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου ότι έχει υψηλά επίπεδα θείωσης (Nikitovic *et al.*, 2005), με περιεχόμενο μεγάλης ποσότητας τρις-θειωμένων δισακχαριτών. Τρις-θειωμένοι δισακχαρίτες, οι οποίοι εντοπίζονται σε μεγάλες ποσότητες στις αλυσίδες των HS που παράγονται από το ήπαρ (Fishman *et al.*, 2002), έχει δειχθεί ότι διεγείρουν την *in vitro* ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Επομένως, ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου αυξήθηκε από την ηπαρίνη που είναι πλούσια σε τρις-θειωμένους δισακχαρίτες, ενώ

οι φτωχά θειωμένες αλυσίδες των HS που παράγονται από τις κυτταρικές σειρές δεν επηρέασαν τον ρυθμό ανάπτυξής τους. Τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου που μελετήσαμε δεν επηρεάζονται από τη δράση των ενδογενών GAGs, γεγονός που πιθανά καθιστά την ανάπτυξη των κυττάρων αυτών πιο ευαίσθητη σε σήματα προερχόμενα από τις εκκρινόμενες GAGs των κυττάρων των γύρω ιστών και/ή από κύτταρα των οργάνων-στόχων της μετάστασης, όπως του ήπατος.

Ένας σημαντικός ρόλος των αλυσίδων των GAGs είναι η αλληλεπίδραση με τους αυξητικούς παράγοντες και η δημιουργία συμπλόκων, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό τη δράση των αυξητικών παραγόντων είτε παρουσιάζοντας τους στους υποδοχείς τους είτε προστατεύοντας τους από την πρωτεολυτική αποδόμηση (Saksela *et al.*, 1988; Berry *et al.*, 2003; Chua *et al.*, 2004). Ειδικότερα, οι HSPGs/ηπαρίνη έχειδειχθεί ότι αυξάνουν την ικανότητα πρόσδεσης του FGF-2 στους υποδοχείς του FGFR1-4, λειτουργώντας ως συνυποδοχείς (Nugent & Iozzo, 2000). Μελέτες έχουν προτείνει την ενεργή συμμετοχή των σηματοδοτικών μονοπατιών του FGF στα αρχικά στάδια της ογκογένεσης του παχέος εντέρου καθώς και στην μετάστασή του (Netzer *et al.*, 2001). Αρχικά μελετήθηκε η απόκριση της ανάπτυξης των κυττάρων στην εξωγενή χορήγηση του FGF-2. Η εξωγενής προσθήκη του FGF-2 προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού των HT29 κυττάρων, ενώ οι SW1116 και HCT116 κυτταρικές σειρές δεν επηρεάστηκαν από την παρουσία του FGF-2. Ωστόσο, ο Day *et al.* έδειξαν ότι η χορήγηση του FGF-2 προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού των HCT116 κυττάρων και ότι η παρουσία της ηπαριτινάσης οδηγεί σε σημαντική μείωση στον επαγόμενο από τον FGF-2 πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Day *et al.*, 1999). Αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στη μελέτη του Day *et al.* χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων (5% FBS), καθώς επίσης και διαφορετική μέθοδος μέτρησης των κυττάρων (MTT). Για να μελετηθεί η πιθανή συνεργασία της διεγερτικής επίδρασης της ηπαρίνης και της σηματοδότησης του FGF-2 χρησιμοποιήθηκε ένα αντίσωμα (anti-FGF-2 neutralizing antibody) που εμποδίζει την ικανότητα του αυξητικού παράγοντα να διεγείρει κυτταρικές λειτουργίες, όπως την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό (Kurokawa *et al.*, 1989). Αυτά τα αντισώματα ενάντια στη δράση του FGF-2 εμποδίζουν τη δέσμευση του αυξητικού παράγοντα στους υψηλής

συγγένειας υποδοχείς του, αλλά δεν αποτρέπουν την ικανότητά του να αλληλεπιδράσει με την ηπαρίνη (Kurokawa *et al.*, 1989). Η χορήγηση του αντισώματος αυτού (anti-FGF-2) στα HT29, SW1116 και HCT116 καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, που παρουσιάζουν διαφορετικό προφίλ έκφρασης των FGF-2/FGFRs, έδειξε ότι η επίδραση της ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό αυτών των κυττάρων είναι ανεξάρτητη από το σηματοδοτικό μονοπάτι του FGF-2.

Είναι γνωστό ότι η ηπαρίνη μπορεί να αλληλεπιδράσει με ποικίλους αυξητικούς παράγοντες, όπως οι HGF/SF, VEGF και EGF, συμμετέχοντας με τον τρόπο αυτό στη ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών των αντίστοιχων αυξητικών παραγόντων. Παρότι η ηπαρίνη και οι HS έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν τη λειτουργία πολλών πρωτεϊνών, όπως ενζύμων, κυτοκινών, μορίων προσκόλλησης και συστατικών της ECM εντούτοις, δεν υπάρχουν έως σήμερα δεδομένα για τους ενδεχόμενους μηχανισμούς μέσω των οποίων η ηπαρίνη ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Powell *et al.*, 2004; Taylor & Gallo, 2006).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου αυξάνεται από την εξωγενή χορήγηση της ηπαρίνης, ενώ δεν επηρεάζεται από την παραγωγή των ενδογενών GAGs/PGs, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από την αντίστοιχη θείωσή τους. Επίσης συμπεραίνουμε ότι η διεγερτική επίδραση της ηπαρίνης δεν πραγματοποιείται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού του FGF-2.

3.3 Η ηπαρίνη ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω μονοπατιών σηματοδότησης εξαρτώμενων από το p38

3.3.1 Γενικά

Κάθε όργανο έχει τη δική του μοναδική ECM, οι ιδιότητες της οποίας μπορούν είτε να μειώσουν είτε να αυξήσουν τη μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων, ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευσή τους. Το ήπαρ αποτελεί το συνηθέστερο σημείο μετάστασης του καρκίνου του παχέος εντέρου, και έχει δειχθεί ότι η ECM που προέρχεται από τα ηπατοκύτταρα αυξάνει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου (Zvibel *et al.*, 2001). Συγκεκριμένα, οι αλυσίδες της HS που αποτελούν συστατικά της ECM του ήπατος και δομικά παρόμοιες με την ηπαρίνη που είναι έντονα θειωμένη (Lyon *et al.*, 1994), έχει προταθεί ότι ενισχύουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Zvibel *et al.*, 2001). Επίσης, ο ρόλος-κλειδί των μεταβολιτών που προέρχονται από τις αλυσίδες της HS στη γένεση του καρκίνου του παχέος εντέρου ενισχύεται από μελέτες στις οποίες αναφέρονται ότι η έκφραση της ηπαρινάσης συσχετίζεται με την εξέλιξη του συγκεκριμένου καρκίνου (Nobuhisa *et al.*, 2005; Naomoto *et al.*, 2005; Perreti *et al.*, 2008).

Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν την ανασταλτική δράση της ηπαρίνης στον *in vitro* πολλαπλασιασμό ποικίλων κυτταρικών τύπων, (Nikitovic *et al.*, 2005; Hausser *et al.*, 2004; Au *et al.*, 1993; Ferrao *et al.*, 1993; Westergren *et al.*, 1993; Nikitovic *et al.*, 2008). Υπάρχουν όμως ορισμένες μελέτες που εισηγούνται τη δυνατότητα της ηπαρίνη να διεγείρει την κυτταρική ανάπτυξη (Flint *et al.*, 1994; Maurer *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2006). Δικά μας αποτελέσματα έδειξαν ότι η ηπαρίνη αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Chatzinikolaou *et al.*, 2008), ενώ προηγούμενες μελέτες παρουσίασαν ότι οι δισακχαρίτες των αλυσίδων HS που παράγονται από τα ηπατοκύτταρα αναστέλλουν και διεγείρουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου ανάλογα με το βαθμό θειώσής τους (Fishman *et al.*, 2002).

Πολυάριθμοι μηχανισμοί εμπλέκονται στη δράση της ηπαρίνης όπως, αυξητικοί παράγοντες και οι υποδοχείς τους (Schlessinger 2000; Lyon *et al.*, 1994), κυτοκίνες, πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα (MAPKs) (Ottlinger *et al.*, 1993) καθώς και η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (Yu *et al.*, 2006). Επομένως, η ηπαρίνη και οι δομικά συγγενείς αλυσίδες των HS δρουν ως εξωκυττάρια ερεθίσματα ικανά να ενεργοποιήσουν πολυάριθμα σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου και σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες (Rabenstein 2002).

Η μεταγωγή πληθώρας σημάτων από το εξωτερικό περιβάλλον των κυττάρων προς τον πυρήνα τους γίνεται με τη μεσολάβηση ποικίλων πρωτεϊνικών κινασών, συμπεριλαμβανομένης της οικογένειας των MAPKs (Nebreda & Porras, 2000; Zhai *et al.*, 2004; Juretic *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007). Οι MAPKs είναι μια οικογένεια κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης που αποτελείται από τρεις κύριες ομάδες κινασών, ERKs (extracellular-regulating kinases), JNK (c-Jun amino-terminal kinases) και p38 MAPKs, οι οποίες διαφέρουν στο υπόστρωμά τους και τις αποκρίσεις τους στα εξωκυτταρικά ερεθίσματα. Τα μονοπάτια σηματοδότησης των MAPKs έχειδειχθεί ότι συμμετέχουν σε ευρύ φάσμα κυτταρικών λειτουργιών, όπως τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη μετανάστευση (Ding & Adgian, 2001; Hecquet *et al.*, 2003; Igarashi *et al.*, 2000; McMullen *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2005). Μελέτες επισημαίνουν ότι το μονοπάτι σηματοδότησης του ERK1/2 συχνά απορρυθμίζεται σε περιπτώσεις καρκίνου και εμπλέκεται στη δημιουργία του καρκίνου του παχέος εντέρου (Balmanno & Cook, 2008), ενώ η κινάση c-Jun NH₂-terminal kinase 1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Tong *et al.*, 2007). Μολονότι η κινάση p38 είχε αρχικά προταθεί ως μια MAP κινάση που συμμετέχει στην διαδικασία της απόπτωσης και στην κυτταρική απόκριση στο στρες, υπάρχουν στοιχεία από πρόσφατες μελέτες που δείχνουν ότι η ενεργοποίηση της p38 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου (Comes *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2006; Sun & Sinicrope, 2005).

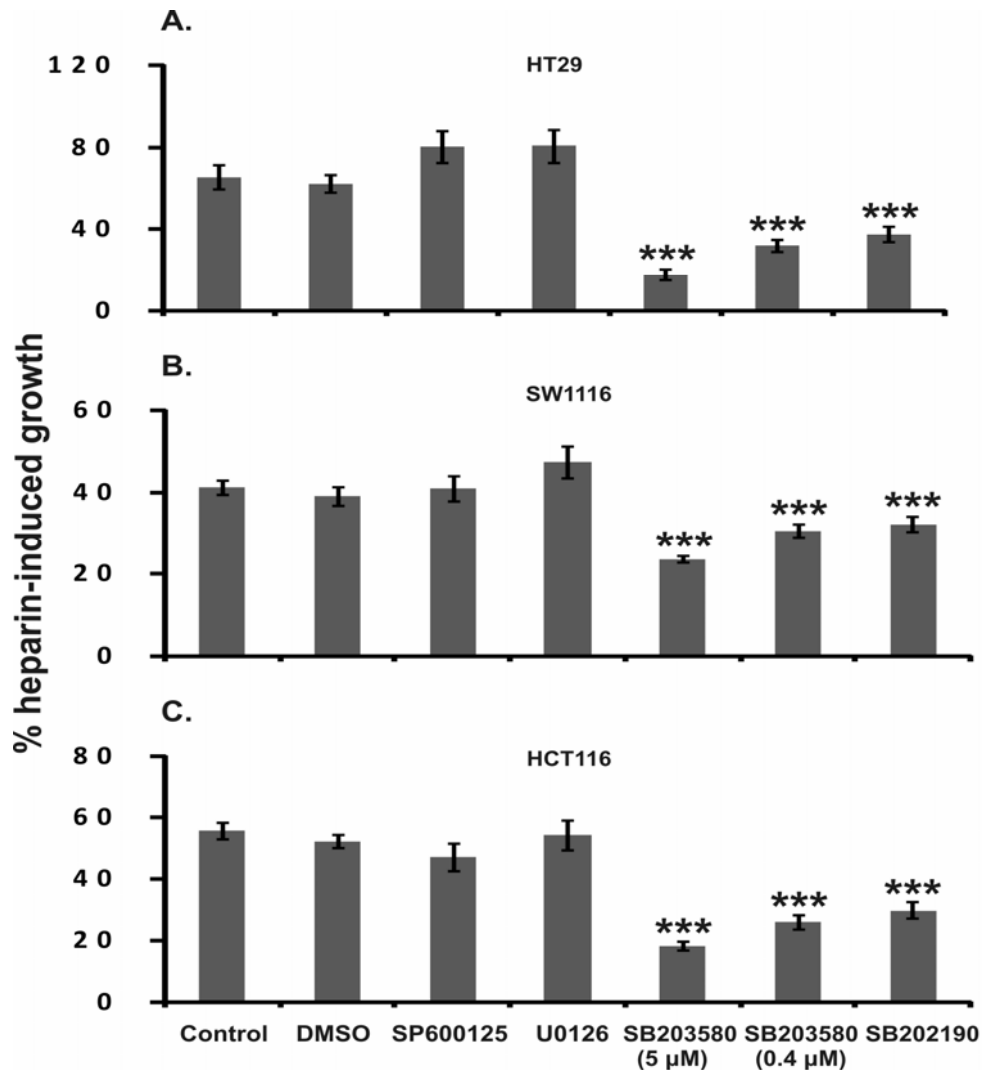
3.3.2 Στοχός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εξέταση των πιθανών μηχανισμών που χρησιμοποιεί η ηπαρίνη, για να ρυθμίσει τον πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου.

3.3.3 Αποτελέσματα

3.3.3a Επίδραση ειδικών αναστολέων των MAPKs στον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου

Τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια των MAPKs είναι σημαντικά για την ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Kim *et al.*, 2007; Roux & Blenis, 2004; Welsh *et al.*, 2006) και συμμετέχουν στην εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου (Balmanno *et al.*, 2008; Comes *et al.*, 2007). Η πιθανή συμμετοχή των MAPKs στον επαγόμενο από την ηπαρίνη ρυθμό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μελετήθηκε με τη χρήση ειδικών αναστολέων των MAPKs. SP600125, ένας ειδικός αναστολέας του JNK· U0126, ένας ειδικός αναστολέας του MEK1/2, ο οποίος είναι ενεργοποιητής του ERK1/2· και οι SB203580 και SB202190 ειδικοί αναστολείς του p38 χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις που δεν επηρεάζουν την μορφολογία των κυττάρων όπως επιβεβαιώνεται από το φωτονικό μικροσκόπιο. Η χορήγηση των SP600125 (5 μ M) και U0126 (30 μ M) δεν είχε επίδραση στον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 κυττάρων (Εικόνα 3.7A-C). Αντίθετα, η επεξεργασία των κυττάρων με τους ειδικούς αναστολείς της p38 κινάσης, SB203580 και SB202190 στη συγκέντρωση των 5 μ M, και του SB203580 στη χαμηλή συγκέντρωση των 0.4 μ M (Lali *et al.*, 2000) ανέστειλε σημαντικά την επαγόμενη από την ηπαρίνη ανάπτυξή τους (Εικόνα 3.7A-C), ενώ δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στο βασικό επίπεδο πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Το DMSO, στο οποίο διαλύονται οι αναστολείς, στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκε δεν επηρέασε τον πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 κυττάρων (Εικόνα 3.7A-C). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το p38 σηματοδοτικό μονοπάτι εμπλέκεται στον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου.



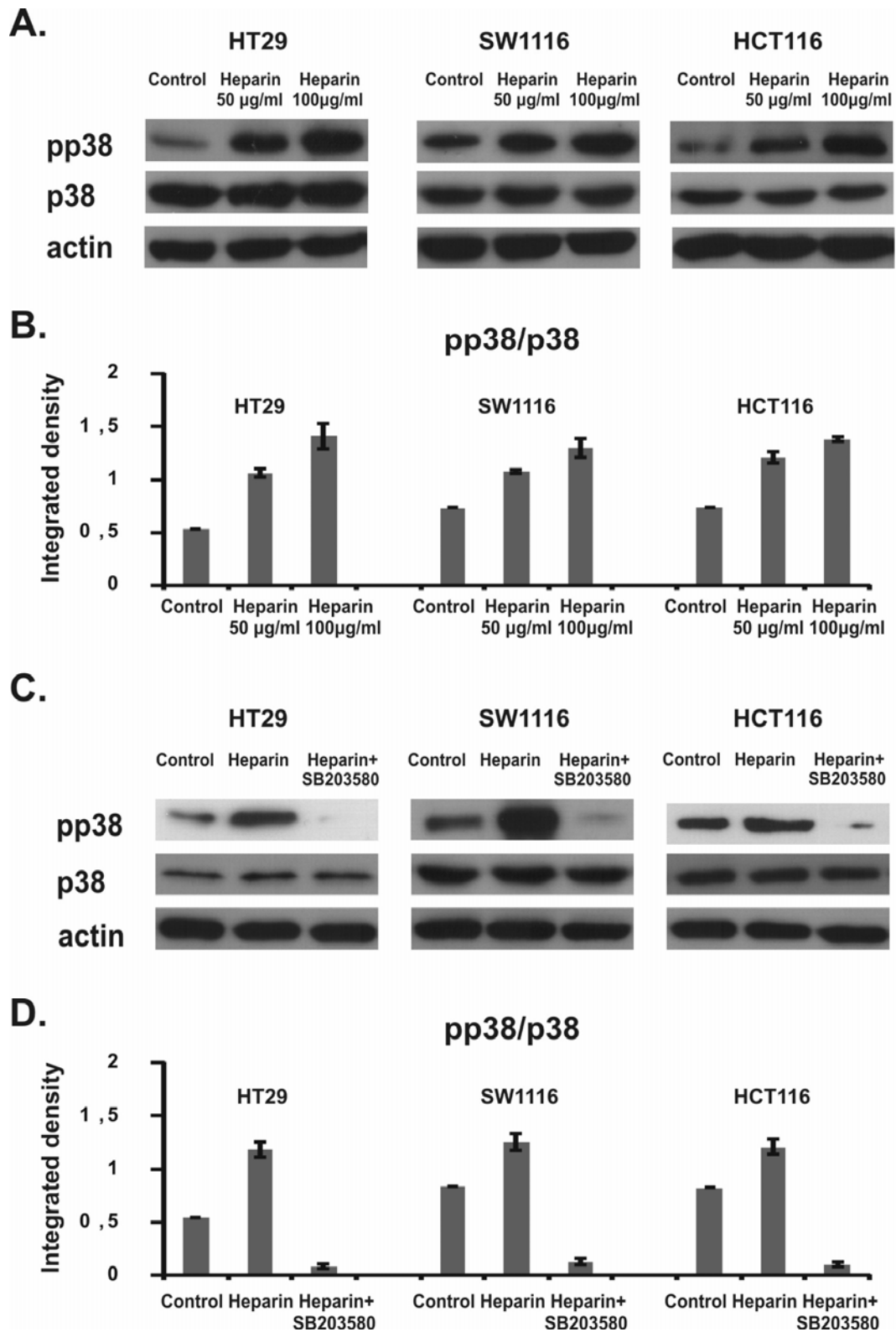
Εικόνα 3.7. Επίδραση των αναστολέων των MAP κινασών στον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Τοπική χορήγηση των SP600125 (5 μ M), U0126 (30 μ M), SB202190 (5 μ M) και SB203580 (0.4 ή 5 μ M) (αναστολείς των JNK, MEK1/2 και p38 MAPK, αντίστοιχα) ή συνδιασμός αυτών με την ηπαρίνη (100 μ g/mL) στις HT29 (A), SW1116 (B) και HCT116 (C) καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου. Στα διαγράμματα παρουσιάζεται ο επαγόμενος από την ηπαρίνη ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων εκφραζόμενος ως το ποσοστό του λόγου μεταξύ των κυττάρων στα οποία χορηγήθηκαν οι αναστολείς και των κυττάρων που τους χορηγήθηκε συνδιασμός των αναστολέων με την ηπαρίνη ή των κυττάρων που τους χορηγήθηκε ηπαρίνη και των κυττάρων ελέγχου (medium ή DMSO). Στο διάγραμμα παρουσιάζονται και τα κύτταρα ελέγχου που τους χορηγήθηκε DMSO. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε τριπλέτες. Means \pm S.E.M. plotted; στατιστικά σημαντικό: *** p < 0.001 σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (medium ή DMSO).

3.3.3β *Η ηπαρίνη επηρεάζει τη φωσφορυλίωση της p38 κινάσης*

Για να διευκρινιστεί η δράση της ηπαρίνης στη σηματοδότηση του p38 στα HT29, SW1116 και HCT116 καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα ενάντια στο συνολικό περιεχόμενο της p38 πρωτεΐνης (anti-p38) και των επιπέδων φωσφορυλίωσής της (anti-pp38). Το pp38 αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει τη φωσφορυλίωση σερίνης/θρεονίνης στη θέση 181/182 της πρωτεΐνης p38, έδειξε ότι η ηπαρίνη αυξάνει με δόσοεξαρτώμενο τρόπο τη φωσφορυλίωση του p38 στα HT29, SW1116 και HCT116 κύτταρα (Εικόνα 3.8A, B). Η ενεργοποίηση της p38 MAPK δεν φαίνεται να σχετίζεται με αλλαγές στο συνολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο της p38, καθώς η έκφραση της p38 πρωτεΐνης δεν επηρεάστηκε (Εικόνα 3.8A, B). Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι η ηπαρίνη προκαλεί ενεργοποίηση της p38 κινάσης στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. Σε πειράματα ελέγχου μελετήθηκε η επίδραση της ηπαρίνης στη φωσφορυλίωση της p38 παρουσία του ειδικού SB203580 αναστολέα της p38 κινάσης, (5 μ M) (Εικόνα 3.8C, D), ο οποίος κατήργησε την επαγόμενη από την ηπαρίνη ενεργοποίηση της p38.

3.3.3γ *Η ηπαρίνη ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μέσω ενός p38-εξαρτώμενου μηχανισμού*

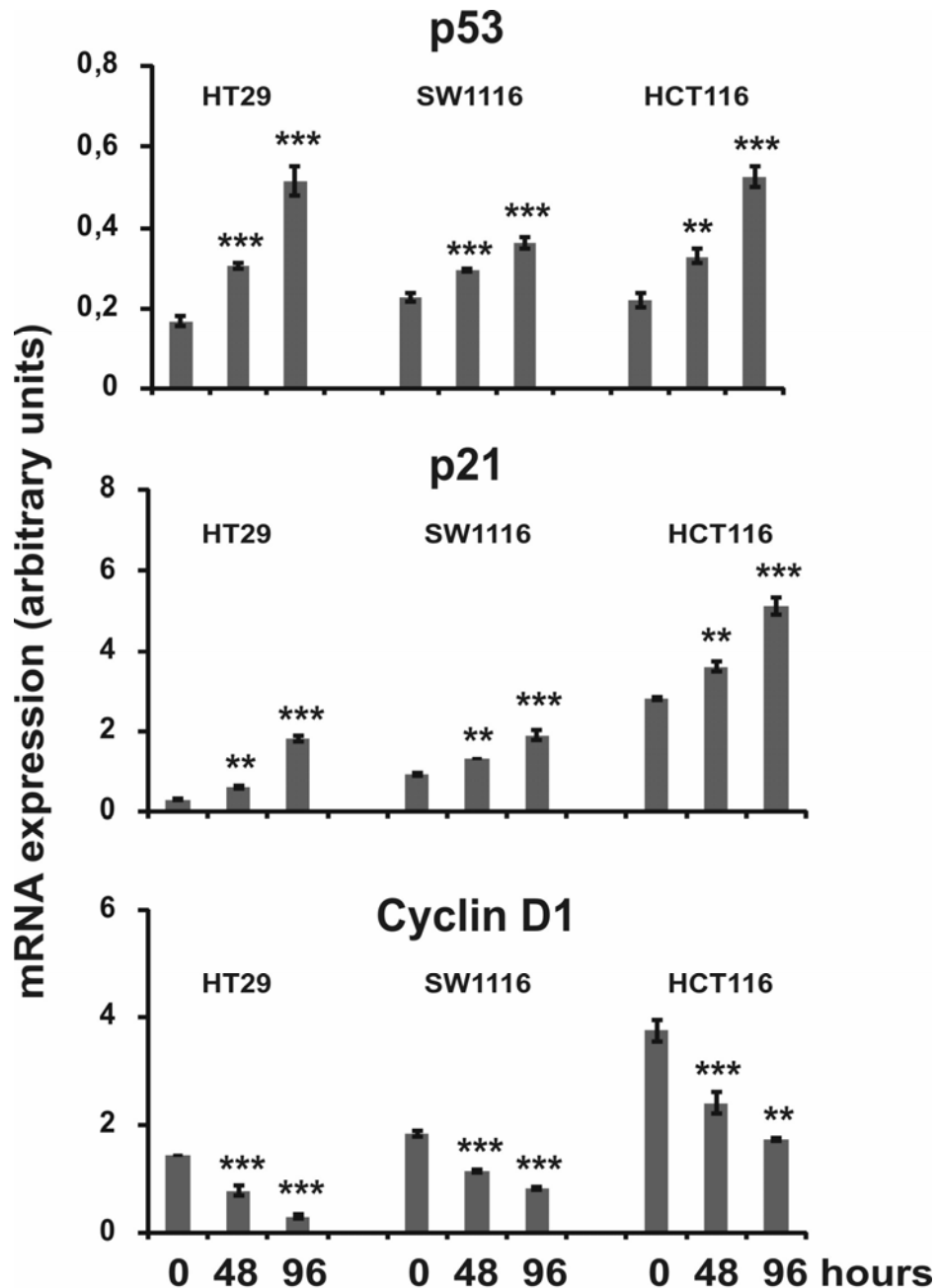
Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκφραση τριών γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο με σκοπό την διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκουν το μονοπάτι του p38 στον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Αρχικά, τα HT29, SW1116 και HCT116 κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 96 ώρες και εκτιμήθηκε η έκφραση των p21WAF/cip1, p53 και της κυκλίνης D1 στα χρονικά σημεία των 0, 48 και 96 ωρών (Εικόνα 3.9). Η ανάλυση realtime PCR έδειξε ότι η έκφραση των μεταγράφων των p21WAF/cip1 και p53 γονιδίων αυξήθηκε σημαντικά στις 48 και 96 ώρες ($p < 0.001$), ενώ τα επίπεδα των μεταγράφων της κυκλίνης D1 μειώθηκαν ($p < 0.001$) σε σύγκριση με τη χρονική στιγμή των 0 ωρών σε όλες τις κυτταρικές σειρές που εξετάσαμε. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η έκφραση των εξεταζόμενων γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο συσχετίζονται με τις καμπύλες ανάπτυξης των HT29,



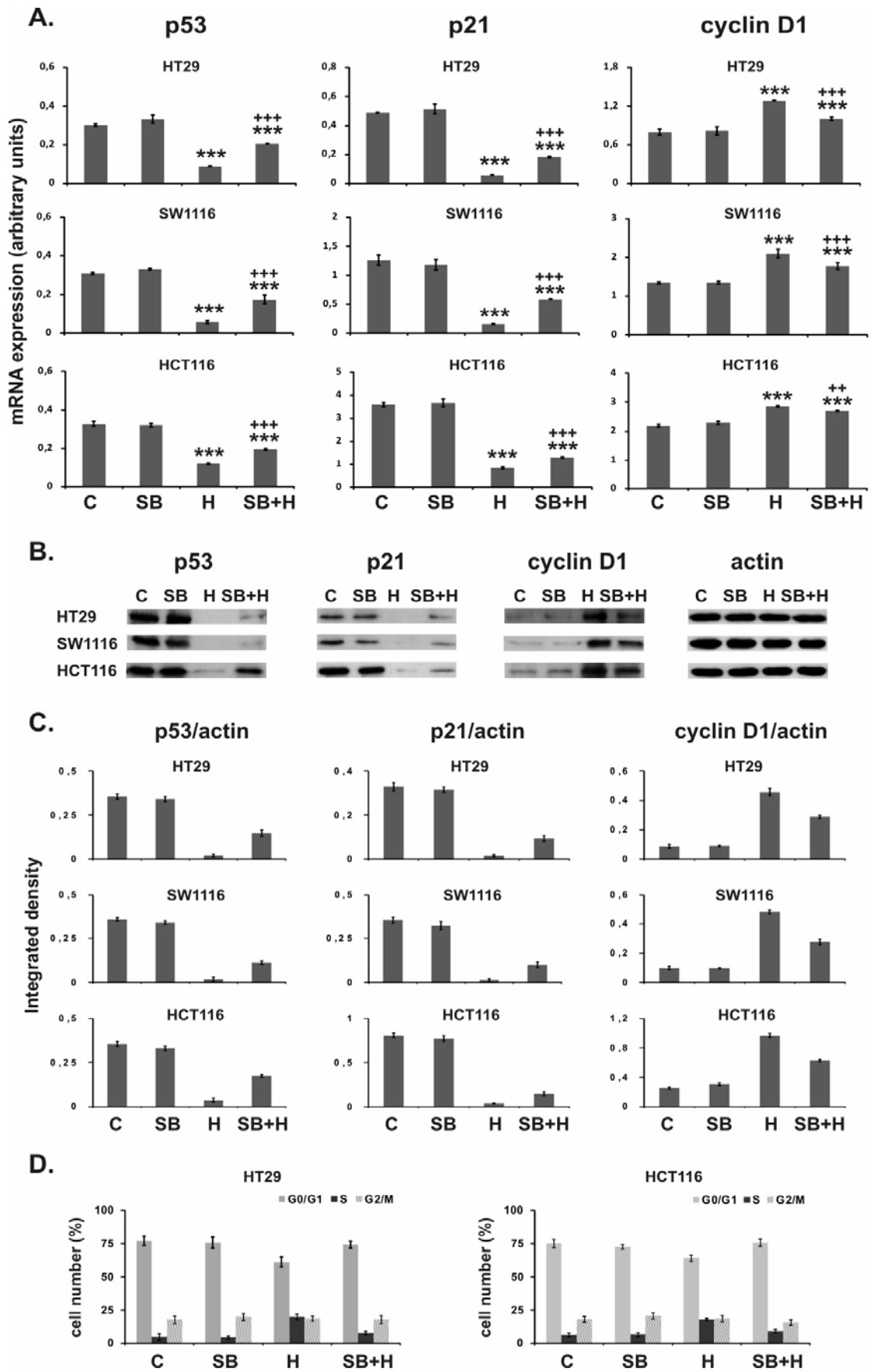
Εικόνα 3.8. Επίδραση της ηπαρίνης στην ενεργοποίηση της p38 κινάσης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. (Α) Ενεργοποίηση της φωσφορυλίωσης της p38 στα

HT29, SW1116 και HCT116 κύτταρα μετά τη χορήγηση 50 και 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ηπαρίνης σύμφωνα με την ανάλυση κατά western. (B) Ποσοτικοποίηση των ζωνών, από τρία ανεξάρτητα πειράματα, με πυκνομετρική ανάλυση των εικόνων και προσδιορισμός του λόγου της φωσφορυλιωμένης p38/ολικής p38 (phospho-p38/p38). (C) Ενεργοποίηση της φωσφορυλίωσης της p38 στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μετά τη συνδιασμένη χορήγηση ηπαρίνης (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και SB203580 (5 μM) και (D) πυκνομετρική ανάλυση των ζωνών. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανοσοαποτύπωση κατά western. Means \pm S.E.M. plotted.

SW1116 και HCT116 κυττάρων. Ακολουθώς, μελετήσαμε την πιθανή επίδραση της ηπαρίνης στην έκφραση των γονιδίων p21WAF/cip1, p53 και κυκλίνης D1, με τη χορήγηση ηπαρίνης, SB203580 ή συνδιασμό και των δύο για 48 ώρες στα HT29, SW1116 και HCT116 κύτταρα, σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης. Η ηπαρίνη μέσω ενός p38-εξαρτώμενου μηχανισμού τροποποίησε την έκφραση των γονιδίων και των πρωτεϊνών p21WAF/cip1, p53 και κυκλίνης D1. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε έντονη μείωση στα επίπεδα των μεταγράφων και των πρωτεϊνών p21WAF/cip1 και p53 και στις τρεις κυτταρικές σειρές ($p < 0.001$), ενώ η έκφραση της κυκλίνης D1 σε mRNA και πρωτεϊνικό επίπεδο αυξήθηκε σημαντικά παρουσία της ηπαρίνης ($p < 0.001$) (Εικόνα 3.10A-C). Επίσης, η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των HT29 και HCT116 κυττάρων παρουσία της ηπαρίνης (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) και/ή του SB203580 (5 μM) αναστολέα μελετήθηκε με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Η χορήγηση της ηπαρίνης είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση του ποσοστού των HT29 και HCT116 κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου ($p < 0.001$), που ανεστάλη όταν χορηγήθηκε συγχρόνως ο SB203580 αναστολέας (Εικόνα 3.10D). Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των SW1116 κυττάρων δεν προσδιορίστηκε με την ανάλυση FACS λόγω της τάσης που έχουν τα συγκεκριμένα κύτταρα να σχηματίζουν συσσωματώματα. Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η ηπαρίνη συμμετέχει στο μεταγραφικό έλεγχο των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου μέσω ενός p38-εξαρτώμενου μηχανισμού.



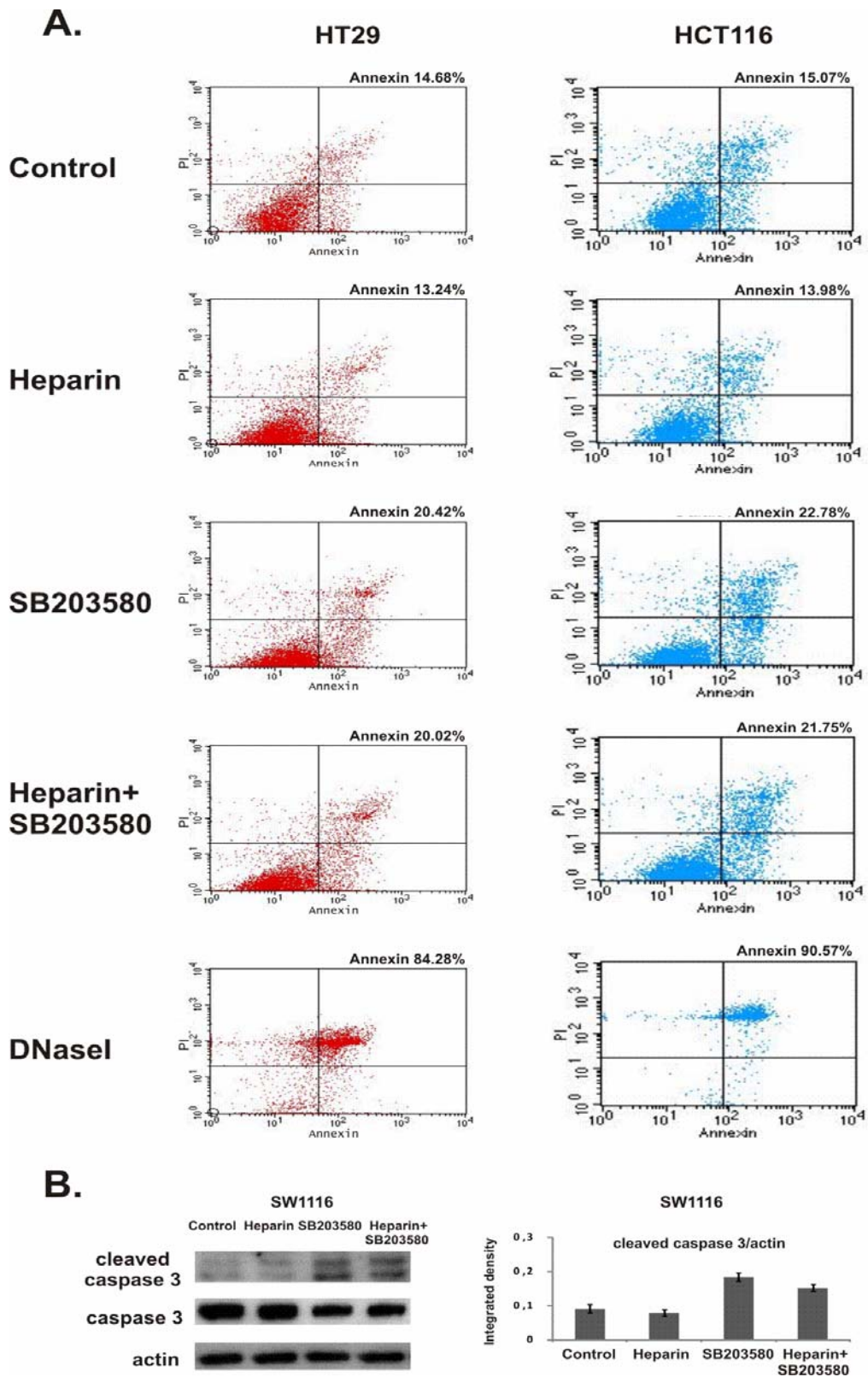
Εικόνα 3.9. Ανάλυση της mRNA έκφρασης των γονιδίων p21WAF/cip1, p53 και κυκλίνης D1 στο χρονικό διάστημα των 96 ωρών. Έκφραση σε επίπεδο mRNA των γονιδίων p21WAF/cip1, p53 και κυκλίνης D1 στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μετά από 0, 48 και 96 ώρες καλλιέργειας απουσία ορού, όπως προσδιορίζεται από τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR). Means±S.E.M. plotted n=3. Στατιστικά σημαντικό: **p < 0.01, ***p < 0.001 σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου των 0 ωρών.



Εικόνα 3.10. Επίδραση της ηπαρίνης στον κυτταρικό κύκλο των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Έκφραση σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης των p21WAF/cip1, p53 και κυκλίνης D1 μεταγράφων στα HT29, SW1116 και HCT116 κύτταρα μετά τη χορήγηση ηπαρίνης (H) (100 µg/mL), SB203580 (SB) (5 µM) ή συνδιασμού αυτών (SB+H) για 48 ώρες, σύμφωνα με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) (A) και της ανάλυσης κατά western (B). (C) Η πυκνομετρική ανάλυση των πρωτεϊνικών ζωνών παρουσιάζεται ως τον λόγο p53, p21 και κυκλίνη D1/ακτίνη. (D) Κατανομή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου των HT29 και HCT116 κυττάρων μετά τη χορήγηση ηπαρίνης (100 µg/ml) και/ή SB203580 (5 µM), όπως προσδιορίζεται με τη σήμανση ιωδιούχου προπιδίου (PI) σε κυτταρομετρητή ροής (FACS). Παρουσιάζεται το ποσοστό των κυττάρων στις φάσεις G0/G1, S and G2/M. Means±S.E.M. plotted n=3. Στατιστικά σημαντικό: ***p < 0.001 σε σύγκριση με το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου (C) και το δείγμα που επεξεργάστηκε με τον αναστολέα SB203580: ++ p < 0.01, +++ p < 0.001 κύτταρα που χορηγήθηκε ηπαρίνη σε σύγκριση με κύτταρα που χορηγήθηκε ηπαρίνη/SB203580.

3.3.3δ Επίδραση της ηπαρίνης στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου

Η p38 MAP κινάση χαρακτηρίζεται ως ένα σημαντικό σημείο ελέγχου του κυττάρου στο μονοπάτι που οδηγεί στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Comes *et al.*, 2007). Πραγματοποιήθηκε λοιπόν προσδιορισμός του βαθμού της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου στα οποία είχε χορηγηθεί ο αναστολέας του p38 (SB203580, 5 µM), ηπαρίνη (100 µg/mL) ή συνδιασμός αυτών (Εικόνα 3.11A), με συγκεκριμένη δοκιμή της απόπτωσης. Η ανάλυση FACS έδειξε ότι ο ρυθμός της απόπτωσης των HT29 και HCT116 καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, στις 48 ώρες, δεν επηρεάστηκε από την παρουσία της ηπαρίνης. Ο προσδιορισμός της απόπτωσης στα SW1116 κύτταρα δεν ήταν εφικτός με την ανάλυση FACS λόγω της τάσης που έχουν τα συγκεκριμένα κύτταρα να σχηματίζουν συσσωματώματα όταν αποκολλούνται με μηχανικό τρόπο. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε, με ανάλυση κατά western, η ενεργοποίηση της



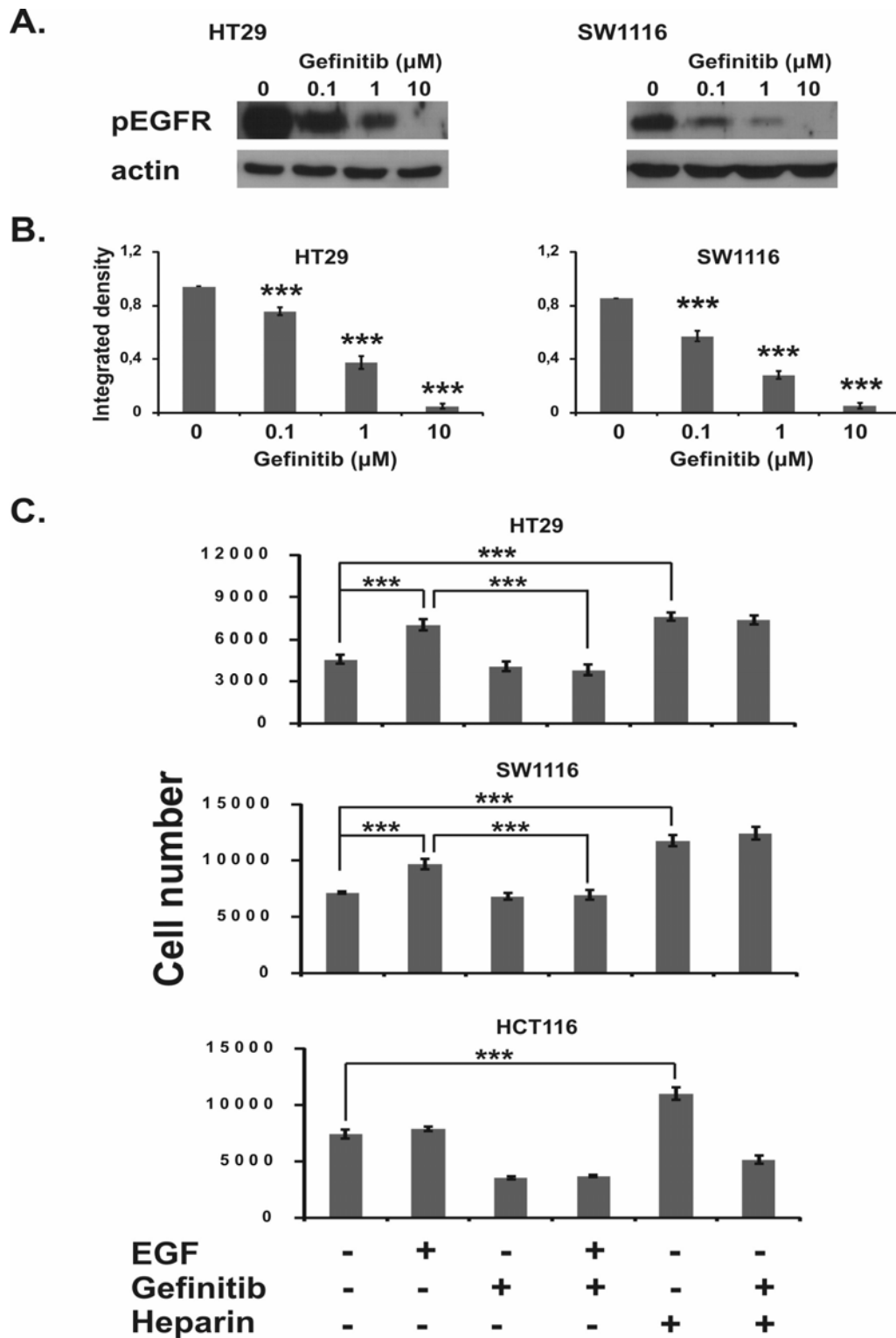
Εικόνα 3.11. Επίδραση της ηπαρίνης στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. (Α) Επίδραση της ηπαρίνης (100 µg/mL), του αναστολέα SB203580 (5 µM) ή του

συνδυασμού αυτών στην απόπτωση των HT29 και HCT116 κυττάρων μετά από 48 ώρες επώασης, όπως προσδιορίζεται από τη σήμανση των κυττάρων με ανεξίνη V (annexin V-FITC) και ιωδιούχο προπιδίο (PI) και την μετέπειτα FACS ανάλυση. Κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί DNaseI (3 U/mL) χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό δείγμα αναφοράς. Τα επίπεδα της απόπτωσης αντιπροσωπεύουν το ποσοστό των κυττάρων που επισημάνθηκαν με ανεξίνη V. (B) Πρωτεϊνική έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 στα SW1116 μετά από 48 ώρες επεξεργασίας με ηπαρίνη και/ή SB203580, σύμφωνα με την ανάλυση κατά western, και ο λόγος της ενεργοποιημένης κασπάσης 3/ακτίνη μετά από ψηφιακή επεξεργασία της εικόνας. Means \pm SEM plotted.

κασπάσης 3 (cleaved caspase 3) που αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της απόπτωσης των κυττάρων των θηλαστικών. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.11B, ο αναστολέας SB203580 και ο συνδιασμός του με την ηπαρίνη αυξάνουν την πρωτεϊνική έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 στα SW1116 κύτταρα, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της FACS ανάλυσης για τα HT29 και HCT116 κύτταρα.

3.3.3ε Επίδραση της σηματοδότησης μέσω του EGFR στον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου

Σε προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί ότι οι αλυσίδες HS συμμετέχουν στη διέγερση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού που ξεκινά από τον υποδοχέα EGFR (Fishman *et al.*, 2002). Επομένως, το gefitinib (IRESSA, ZD1839), ένας αναστολέας της δράσης της κινάσης της τυροσίνης του υποδοχέα του EGF, χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί εάν ο επαγόμενος από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου εξαρτάται από τη σηματοδότηση μέσω του EGFR. Πιλοτικά πειράματα έδειξαν ότι η χορήγηση του gefitinib ανέστειλλε με δόσοεξαρτώμενο τρόπο το βασικό επίπεδο της φωσφορυλίωσης του EGFR στις HT29 και SW1116 κυτταρικές σειρές (Εικόνα 3.12A, B). Η προσθήκη του gefitinib στη συγκέντρωση των 10 μ M κατήργησε τον επαγόμενο από τον EGF πολλαπλασιασμό στα HT29 και SW1116 κυττάρων, ενώ η ηπαρίνη παρουσία του gefitinib οδήγησε σε αύξηση του



Εικόνα 3.12. (A) Αυξανόμενες ποσότητες του gefitinib (0, 0.1, 1 και 10 μM) χορηγήθηκαν στα HT29 και SW1116 κύτταρα σε συνθήκες έλλειψης ορού και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης του EGFR στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων, με την μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά western και (B) υπολογίστηκε με

πυκνομετρική ανάλυση ο λόγος των φωσφορυλιωμένων EGFR/ακτίνη. (C) Επίδραση των EGF (50 ng/mL), ηπαρίνης (100 µg/mL), gefitinib (10 µM) ή συνδυασμός αυτών στον πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε τριπλέτες. Means±S.E.M. plotted στατιστικά σημαντικό: ***p < 0.001.

πολλαπλασιασμού των παραπάνω κυττάρων στο ίδιο επίπεδο με αυτό των κυττάρων που είχε χορηγηθεί μόνο ηπαρίνη (Εικόνα 3.12C). Ο ρόλος της σηματοδότησης μέσω του EGFR στον επαγόμενο από την ηπαρίνη ρυθμό ανάπτυξης των HCT116 κυττάρων δεν ήταν εφικτό να εκτιμηθεί, διότι το gefitinib είχε τοξική επίδραση στα συγκεκριμένα κύτταρα όπως φαίνεται από τη μείωση του βασικού επιπέδου του πολλαπλασιασμού τους (Εικόνα 3.12C) και από την ημιποσοτική μέθοδο αποκλεισμού της χρωστικής κυανού του τρυπανίου (% κυτταροτοξικότητα: 45.8% gefinitib 0.1 µM, 58% gefinitib 1 µM, 71.4% gefinitib 10 µM). Το βασικό επίπεδο πολλαπλασιασμού των HT29 και SW1116 κυττάρων δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση της gefitinib, όπως φαίνεται από τη μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Εικόνα 3.12C) και επαληθεύτηκε με τη μέθοδο αποκλεισμού της χρωστικής κυανού του τρυπανίου. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η επαγωγική επίδραση της ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου του ανθρώπου δεν εξαρτάται από το μονοπάτι σηματοδότησης του EGFR.

3.3.4 Συζήτηση

Η ανάπτυξη των μεταστατικών εμφανίζεται συνήθως σε συγκεκριμένα όργανα και σημαντικός παράγοντας υποδεικνύεται η ECM των οργάνων αυτών (Pupa *et al.*, 2002; Kouniavsky *et al.*, 2002; Radisky *et al.*, 2001). Η σύσταση της ECM του κάθε οργάνου μπορεί να έχει διεγερτική ή ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Zvibel *et al.*, 2001). Οι PGs/GAGs είναι μόρια-κλειδιά της ECM, τα οποία έχει δείχθει ότι επηρεάζουν την επιβίωση και τον

πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Fjeldstad & Kolset, 2005; Nikitovic *et al.*, 2008). Σε προηγούμενες μελέτες έχει αναφερθεί ότι οι αλυσίδες HS που προέρχονται από τα ηπατοκύτταρα έχουν διεγερτική επίδραση στον *in vitro* ρυθμό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Zvibel *et al.*, 2001). Δικά μας αποτελέσματα έδειξαν ότι η ηπαρίνη αυξάνει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο τον πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 κυττάρων (Chatzinikolaou *et al.*, 2008). Επίσης, έχει δειχθεί ότι οι δισακχαρίτες των αλυσίδων HS ανάλογα με τη δομή και το βαθμό θείωσης τους, διέγειραν σε κυτταροκαλλιέργειες με υπόστρωμα ινονεκτίνης την ανάπτυξη των χαμηλής μεταστατικής ικανότητας καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου με δευτεροπαθείς εντοπίσεις στο ήπαρ ενώ, ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυτταρικών σειρών με υψηλό μεταστατικό δυναμικό (Fishman *et al.*, 2002). Τα αποτελέσματα αυτά επισημαίνουν τη σημασία των μονοπατιών μέσω των οποίων οι αλυσίδες HS συμμετέχουν στην ανάπτυξη και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου.

Λαμβάνοντας υπόψιν την καλά τεκμηριωμένη συμμετοχή της σηματοδότησης των MAPKs στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Balmanno *et al.*, 2008; Tong *et al.*, 2007; Comes *et al.*, 2007; Welsh *et al.*, 2006), εξετάστηκε η συμβολή των τριών κυριότερων μονοπατιών των MAPKs, JNK, ERK1/2 και p38, στη μιτογονική δράση της ηπαρίνης. Ο επαγόμενος από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμός των HT29, SW1116 και HCT116 κυττάρων μειώθηκε από την αναστολή της κινάσης p38, ενώ δεν επηρεάστηκε από τη δράση των αναστολέων των JNK και MEK1/2, γεγονός που δείχνει ότι η μιτογονική δράση της ηπαρίνης πραγματοποιείται μέσω της σηματοδότησης της p38 MAPK. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το μονοπάτι της p38 MAPK διαδραματίζει κύριο ρόλο στην ομοιόσταση του καρκίνου του παχέος εντέρου συμμετέχοντας σε βιολογικές διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και ο κυτταρικός θάνατος (Comes *et al.*, 2007; Cheung *et al.*, 2008; Corona *et al.*, 2007; Sun & Sinicrope 2005). Επίσης, η χορήγηση του SB202190 ειδικού αναστολέα των p38α/β κινασών οδήγησε σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου· αυτοφαγία και κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Comes *et al.*, 2007). Σε άλλη μελέτη έχει αναφερθεί ότι οι πολυφαινόλες από το ελαιόλαδο μειώνουν τη φωσφορυλίωση του

p38 ασκώντας αρνητική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Corona *et al.*, 2007). Αντίθετα, το PEITC προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 μέσω της ενεργοποίησης του p38 μονοπατιού, το οποίο φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση σημαντικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου του καρκίνου του παχέος εντέρου (Cheung *et al.*, 2008). Επομένως, τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τη σύνθετη σχέση ανάμεσα του p38 μονοπατιού, αναστολής του κυτταρικού κύκλου, πολλαπλασιασμού και απόπτωσης των κυττάρων που φαίνεται να εξαρτάται από το κυτταρικό περιεχόμενο, τον κυτταρικό τύπο, και τα ερεθίσματα που επιδρούν στα συγκεκριμένα κύτταρα.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση της ηπαρίνης στην έκφραση των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου, p21WAF/cip1, p53 και κυκλίνη D1, που είναι σημαντικά για την εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Το ογκογονίδιο κυκλίνη D1 είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της μετάβασης από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου κατά τρόπο εξαρτώμενο από τα εξωκυτταρικά ερεθίσματα (Matsushima *et al.*, 1991). Η έκφραση της κυκλίνης D1 έχει συσχετιστεί με τον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων του παχέος εντέρου και με τη μη απόκρισή τους στη χημειοθεραπευτική αγωγή (Liao *et al.*, 2007). Ο αναστολέας της κυκλινο-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης p21WAF/cip1 που συμμετέχει στον έλεγχο της G1/S και G2/M μετάβασης του κυτταρικού κύκλου έχει δείχθει ότι διαδραματίζει ρόλο-κλειδί στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Wilson *et al.*, 2008), ενώ η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 ασκεί ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό ενεργοποιώντας ή αλληλεπιδρώντας με διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης, καθώς η απορρύθμιση της δραστηριότητάς του ευνοεί την εξέλιξη του όγκου (Damia & Brogginì, 2004). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ηπαρίνη μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από την p38 κινάση επηρεάζει την mRNA και την πρωτεϊνική έκφραση των συγκεκριμένων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Επίσης, η χορήγηση της ηπαρίνης οδηγεί σε σημαντική αύξηση του ποσοστού των HT29 και HCT116 κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, γεγονός που αναστέλλεται όταν χορηγηθεί συγχρόνως ο SB203580 αναστολέας. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ηπαρίνη προάγει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου

αυξάνοντας τον αριθμό των κυττάρων στη φάση S. Η ανάπτυξη και η μετάσταση του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι γνωστό ότι εξαρτάται από τις GAGs της περιβάλλουσας ECM. Επομένως, προτείνεται η ύπαρξη ενός καινούριου μηχανισμού που συνδέει την εξωκυττάρια GAG ηπαρίνη με τη ρύθμιση του κύκλου των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου.

Ο καρκίνος προκύπτει ως αποτέλεσμα της έλλειψης ισορροπίας μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και απόπτωσης (Raff, 1992). Μελέτες αναφέρουν τη συμμετοχή των μονοπατιών της p38 MAP κινάσης στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, καθώς και στην προστασία που παρέχουν στα κύτταρα αυτά ενάντια στην αυτοφαγία και την απόπτωση (Comes *et al.*, 2007; Chiacchiera & Simone, 2008). Στη παρούσα μελέτη, η χορήγηση της ηπαρίνης δεν επηρέασε το ποσοστό της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Συνεπώς, η επίδραση της ηπαρίνης στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου πιθανώς να γίνεται μέσω της παρατηρούμενης μεταβολής στην έκφραση των ρυθμιστών-γονιδίων του κυτταρικού κύκλου.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι οι αλυσίδες HS που εκκρίνονται από τα κύτταρα του ήπατος, καθώς και οι εξωγενώς προστιθέμενοι διασακχαρίτες HS, αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει την αυξημένη έκφραση των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης της erbB οικογένειας (Zvibel *et al.*, 1998; Zvibel *et al.*, 1998; Fishman *et al.*, 2002). Με βάση τις παραπάνω μελέτες εξετάστηκε η πιθανότητα συμμετοχής του σηματοδοτικού μονοπατιού του EGFR υποδοχέα στον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου με τη χρήση ενός αναστολέα κινάσης τυροσίνης του EGFR, την gefitinib (Baselga & Averbuch, 2000; Inoue *et al.*, 2003). Η συνδυασμένη χορήγηση ηπαρίνης και gefitinib στις HT29 και SW1116 καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου έδειξε ότι η επίδραση της ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών δεν εξαρτάται από τη σηματοδότηση του EGFR. Αντιθέτως, η τοξική επίδραση της gefitinib στα HCT116 κύτταρα δεν κατέστησε εφικτή την εκτίμηση του ρόλου της EGFR σηματοδότησης στην επαγόμενη από την ηπαρίνη ανάπτυξη των συγκεκριμένων κυττάρων. Η

ενεργοποίηση του EGFR έχει δειχθεί από προηγούμενη μελέτη ότι εξαρτάται από τη δομή των HS (Fishman *et al.*, 2002). Η έλλειψη της συμμετοχής του EGFR στη δράση της ηπαρίνης, όπως παρατηρήθηκε στη μελέτη αυτή, πιθανώς να σχετίζεται με την αλληλουχία και τη θείωση των δισακχαριτών του παρασκευάσματος της ηπαρίνης που χρησιμοποιήθηκε, η οποία έχει δειχθεί προηγουμένως σε άλλα συστήματα-μοντέλα (Nikitovic *et al.*, 2008). Επίσης, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα οι HS αλυσίδες που παράγονται από συγκεκριμένα όργανα να χρησιμοποιούν το παραπάνω p38 μονοπάτι σηματοδότησης για να ρυθμίσουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι μια εξωκυττάρια GAG, η ηπαρίνη, μπορεί να τροποποιήσει την έκφραση γονιδίων σημαντικών για τη ρύθμιση του κύκλου των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω της ενεργοποίησης της p38 κινάσης. Επίσης, το γεγονός ότι η ηπαρίνη δρά μέσω του p38 μονοπατιού στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μπορεί να αποτελέσει στόχο για μελλοντικές αποτελεσματικές θεραπείες.

4 Συζήτηση

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής υπήρξε η μελέτη του ρόλου των γλυκοζαμινογλυκανικών αλυσίδων και των πιθανών μηχανισμών δράσης τους στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την τρίτη κατά σειρά αιτία θανάτου από κακοήθεις νεοπλασίες παγκοσμίως παρά τη σημαντική πρόοδο που έχει σημειωθεί στη θεραπευτική αντιμετώπισή του (Xu *et al.*, 2006). Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου στους άνδρες και στις γυναίκες είναι παρόμοια (Jemal *et al.*, 2008). Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες έχει αναφερθεί ότι συμμετέχουν στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου που συνιστά μία πολυδιάστατη διαδικασία που αρχίζει με το σχηματισμό των πολυπόδων και καταλήγει στην εμφάνιση της κακοήθους νεοπλασίας (Zimbalist & Plumer, 1995; Li & Lai, 2009).

Η ύπαρξη ενός πολυδιάστατου δικτύου αλληλεπιδράσεων μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων και του γύρω μικροπεριβάλλοντός τους είναι σημαντική για την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου (Zigginò *et al.*, 2005). Στο καρκινικό μικροπεριβάλλον του στρώματος εντοπίζονται ποικίλοι κυτταρικοί τύποι, αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες και άφθονη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM), η οποία αποτελεί ένα σύνθετο δίκτυο αποτελούμενο κυρίως από κολλαγόνο, γλυκοπρωτεΐνες και πρωτεογλυκάνες (PGs) (Li *et al.*, 2007). Τα σήματα που προέρχονται από την ECM μπορούν να επηρεάσουν πολλές πτυχές της κυτταρικής συμπεριφοράς, όπως τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την προσκόλληση των κυττάρων (Pura *et al.*, 2002). Η σύσταση της ECM τροποποιείται σημαντικά από τα καρκινικά κύτταρα αλλά και από τα γύρω φυσιολογικά κύτταρα, γεγονός που επηρεάζει την ανάπτυξη και την εξέλιξη του νεοπλάσματος.

Οι PGs είναι κύρια συστατικά του εξωκυττάριου χώρου και της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ υπάρχουν και κάποιες ενδοκυττάρια PGs. Μέσω του πρωτεϊνικού τους κορμού ή διαμέσου των γλυκοζαμινογλυκανικών (GAGs) τους αλυσίδων, όπως της θειικής χονδροϊτίνης, κερατάνης, δερματάνης (CS, KS, DS) ή θειικής ηπαράνης (HS)/ηπαρίνης, οι PGs είναι ικανές να αλληλεπιδρούν με κολλαγόνο, αυξητικούς παράγοντες, υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων και μόρια προσκόλλησης. Οι PGs

μέσω των παραπάνω αλληλεπιδράσεων συμμετέχουν στη ρύθμιση βασικών κυτταρικών λειτουργιών των καρκινικών και των φυσιολογικών κυττάρων (Fjeldstad & Kolset, 2005).

Το πρώτο βήμα της διατριβής ήταν ο χαρακτηρισμός του τύπου των GAGs που παράγονται από τις μετρίου διαφοροποίησης HT29 και SW1116 καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου του ανθρώπου. Αμφότερες οι κυτταρικές σειρές συνθέτουν HA, μεμβρανικές και εκκρινόμενες γαλακτοζαμινογλυκάνες (GalAGs) και HS σε διαφορετικές ποσότητες. Το βιοσυνθετικό προφίλ των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών διαφέρει, με τα HT29 κύτταρα να παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες HA και μεμβρανικών GalAGs σε σύγκριση με τα SW1116 κύτταρα. Οι αλυσίδες HS εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη των HT29 κυττάρων, ενώ τα SW1116 κύτταρα εκκρίνουν και διατηρούν στο κύτταρο περίπου ίσες ποσότητες.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της γενιστεΐνης στην παραγωγή και την κατανομή των GAGs/PGs, καθώς και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η γενιστεΐνη είναι ένα ισοφλαβονοειδές της σόγιας για το οποίο έχουν προταθεί πολλοί πιθανοί μηχανισμοί δράσης στα καρκινικά κύτταρα, όπως η αναστολή της δράσης της κινάσης της τυροσίνης (PTKs), η αλληλεπίδρασή της με οιστρογονικούς υποδοχείς (ERs) και η αναστολή της DNA τοποϊσομεράσης II (Peterson, 1995; Polkowski & Mazurek, 2000). Η γενιστεΐνη ανέστειλε με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την σύνθεση των εκκρινόμενων και των μεμβρανικά συνδεδεμένων GAGs/PGs από τα SW1116 κύτταρα, καθώς και το βασικό επίπεδο πολλαπλασιασμού τους, πιθανότατα μέσω ενός PTK μηχανισμού. Η ανασταλτική επίδραση της γενιστεΐνης στη σύνθεση των GAGs/PGs μέσω της PTK είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που αφορούν κυτταρικές σειρές ανθρώπινου κακοήθους μεσοθηλιώματος επιθηλιακής και σαρκωμάτωσης διαφοροποίησης, καρκίνου του μαστού και κυττάρων οστεοσαρκώματος (Tzanakakis *et al.*, 1997; Syrokou *et al.*, 1999; Nikitovic *et al.*, 2003). Επίσης, μελέτες έχουν δείξει τον ανασταλτικό ρόλο της γενιστεΐνης στην ανάπτυξη πολλών κακοήθων νεοπλασιών, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Messina & Bennik, 1998). Στα HT29 κύτταρα, η γενιστεΐνη οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκκρισης των HS, έντονη μείωση των παραγόμενων

μεμβρανικών HS και μέτρια ενεργοποίηση της σύνθεσης των GalAGs. Τα αποτελέσματα έδειξαν μία εκλεκτική ενεργοποίηση της σύνθεσης των GAGs από τα HT29 κύτταρα παρουσία της γενιστεΐνης, με τρόπο εξαρτώμενο από τον τύπο των GAGs και την κατανομή τους, γεγονός που υποδεικνύει την πιθανή συμμετοχή των οιστρογονικών υποδοχέων. Η γενιστεΐνη αναφέρεται και ως φυτοοιστρογόνο που ασκεί την οιστρογονική της επίδραση κυρίως μέσω του υποδοχέα ERβ (Sarkar & Li, 2002). Τα οιστρογόνα έχειδειχθεί ότι επηρεάζουν το ρυθμό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Biglia *et al.*, 2004; Di Leo *et al.*, 2001). Η πιθανότητα τα HT29 κύτταρα, που εκφράζουν τον ERβ, να αποκρίνονται ειδικά σε ένα ανάλογο του οιστρογόνου ενισχύεται από τα αποτελέσματα των πειραμάτων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όπου η γενιστεΐνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις δρώντας πιθανά ως οιστρογονικός ενεργοποιητής διεγείρει τον πολλαπλασιασμό τους. Μελέτες έχουν επίσης παρουσιάσει τη διεγερτική επίδραση της γενιστεΐνης στη σύνθεση των GAGs/PGs και στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του μαστού (MCF-7), που εκφράζουν ERs (Mitropoulou *et al.*, 2002). Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα δείχνουν το διαφορετικό βιοσυνθετικό προφίλ των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου σε GAGs, τη διαφορετική επίδραση της γενιστεΐνης στον τύπο και την κατανομή των παραγόμενων GAGs/PGs και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω ενός PTK μηχανισμού και/ή των οιστρογονικών υποδοχέων.

Επόμενος στόχος της διατριβής υπήρξε η μελέτη της επίδρασης των αλυσίδων GAGs στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι εξωγενώς προστιθέμενες GAGs επηρεάζουν την ανάπτυξη φυσιολογικών και/ή μετασχηματισμένων κυττάρων σε καλλιέργεια (Nikitovic *et al.*, 2008; Fthenou *et al.*, 2007; Maurer *et al.*, 1994; Volpi *et al.*, 1994). Η χορήγηση της ηπαρίνης είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού των HT29, SW1116 και HCT116 (χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης) καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, σε αντίθεση με τις αλυσίδες CS, DS και HA που δεν είχαν καμία επίδραση. Είναι γνωστό ότι η ηπαρίνη έχει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη ποικίλων κυτταρικών τύπων (Au *et al.*, 1993; Flint *et al.*, 1994; Hausser & Brenner, 2004), όμως υπάρχουν μελέτες που επισημαίνουν τη διεγερτική της δράση στον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών

κυττάρων (Flint *et al.*, 1994), των κυττάρων λευχαιμίας (Maurer *et al.*, 1994) και των καρκινικών κυττάρων του στομάχου (Wu *et al.*, 2006). Επίσης, έχει δειχθεί ότι η εξωγενώς προστιθέμενη ηπαρίνη και οι αλυσίδες HS που παράγονται από τα ηπατοκύτταρα επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Znibel *et al.*, 1998). Στη συνέχεια μελετήθηκε ο ρόλος των ενδογενών και των μεμβρανικών GAGs/PGs στον ρυθμό ανάπτυξης των HT29, SW1116 και HCT116 κυττάρων. Το βασικό επίπεδο πολλαπλασιασμού των κυττάρων δεν επηρεάστηκε από την ενζυμική επεξεργασία των κυττάρων με ειδικές λύσεις που απομακρύνουν τις αλυσίδες CS/DS και HS, ούτε από την εξωγενή χορήγηση ενός αναστολέα της θείωσης των αλυσίδων των GAGs, υποδεικνύοντας ότι οι αλλαγές των μεμβρανικών GAGs/PGs και οι ενδογενείς θειωμένες GAGs/PGs δεν επηρεάζουν και δεν είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου.

Μελέτες συνδέουν την επίδραση των GAGs στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με τη δομή, τη συγκέντρωση και το βαθμό θείωσης των GAG αλυσίδων, τον κυτταρικό τύπο και τη σύνθεση της ECM (Aguilar *et al.*, 2005; Nikitovic *et al.*, 2005; Sygokou *et al.*, 1999). Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των αλυσίδων HS που παράγονται από τα HT29, SW1116 και HCT116 κύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι κυτταρικές σειρές παράγουν HS αλυσίδες με χαμηλό ολικό φορτίο και θείωση, και συγκεκριμένα αλυσίδες HS αποτελούμενες από μη θειωμένους και/ή μονο-θειωμένους δισακχαρίτες. Η βιοχημική ανάλυση του παρασκευάσματος της ηπαρίνης, σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, έδειξε ότι έχει υψηλά επίπεδα θείωσης και μεγάλη ποσότητα τρις-θειωμένων δισακχαριτών (Nikitovic *et al.*, 2005). Παρατηρήθηκε λοιπόν μία αύξηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου από την ηπαρίνη που είναι πλούσια σε τρις-θειωμένους δισακχαρίτες, ενώ οι φτωγά θειωμένες αλυσίδες των HS που παράγονται από τις κυτταρικές σειρές δεν επηρέασαν τον ρυθμό ανάπτυξής τους. Τρις-θειωμένοι δισακχαρίτες, οι οποίοι εντοπίζονται σε μεγάλες ποσότητες στις αλυσίδες των HS που παράγονται από το ήπαρ έχει δειχθεί ότι διεγείρουν την *in vitro* ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου με χαμηλό μεταστατικό δυναμικό, ενώ HS δισακχαρίτης με δύο θειϊκές ομάδες έχει ανασταλτική επίδραση

στον πολλαπλασιασμό κυτταρικών σειρών με υψηλό μεταστατικό δυναμικό (Fishman *et al.*, 2002). Σημαντικό συμπέρασμα της συγκεκριμένης φάσης της μελέτης είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου που μελετήσαμε δεν επηρεάζονται από τη δράση των ενδογενών GAGs, γεγονός που πιθανά καθιστά την ανάπτυξη των κυττάρων αυτών πιο ευαίσθητη σε σήματα προερχόμενα από τις εκκρινόμενες GAGs των κυττάρων των γύρω ιστών και/ή από κύτταρα των οργάνων-στόχων της μετάστασης.

Στη συνέχεια της ερευνητικής αυτής προσπάθειας εξετάστηκαν ορισμένοι μηχανισμοί που πιθανώς να χρησιμοποιεί η εξωκυττάρια γλυκοζαμινογλυκάνη, ηπαρίνη, για να ρυθμίσει τον πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Η ηπαρίνη είναι γνωστό ότι μπορεί να αλληλεπιδράσει με ποικίλους αυξητικούς παράγοντες, όπως οι FGF-2, EGF, VEGF, HGF/SF, και μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων να συμμετέχει στη ρύθμιση των σηματοδοτικών τους μονοπατιών. Ένας από τους πιο καλά τεκμηριωμένους ρόλους της ηπαρίνης/HSPGs είναι η αύξηση της ικανότητας πρόσδεσης του FGF-2 στους υποδοχείς του, FGFR1-4 (Nugent & Iozzo, 2000). Μελετήθηκε λοιπόν η πιθανή συμμετοχή των σηματοδοτικών μονοπατιών του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF-2) και του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) στον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Η χορήγηση αντισώματος ενάντια στη δράση του FGF-2, που εμποδίζει τη δέσμευση του αυξητικού παράγοντα στους υψηλής συγγένειας υποδοχείς του, αλλά δεν αποτρέπει την ικανότητά του να αλληλεπιδράσει με την ηπαρίνη (Kurokawa *et al.*, 1989), έδειξε ότι η δράση της ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, που παρουσιάζουν διαφορετικό προφίλ έκφρασης του FGF-2 και των υποδοχέων του, δεν εξαρτάται από το FGF-2 σηματοδοτικό μονοπάτι (Εικόνα 4.1). Μελέτες έχουν προτείνει την ενεργή συμμετοχή των σηματοδοτικών μονοπατιών του FGF-2 στα αρχικά στάδια της ογκογένεσης του παχέος εντέρου, καθώς και στην μετάστασή του (Netzer *et al.*, 2001). Η συνδυασμένη χορήγηση ηπαρίνης και gefitinib, ενός αναστολέα της κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα του EGF (EGFR), στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου έδειξε ότι η επίδραση της ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό των

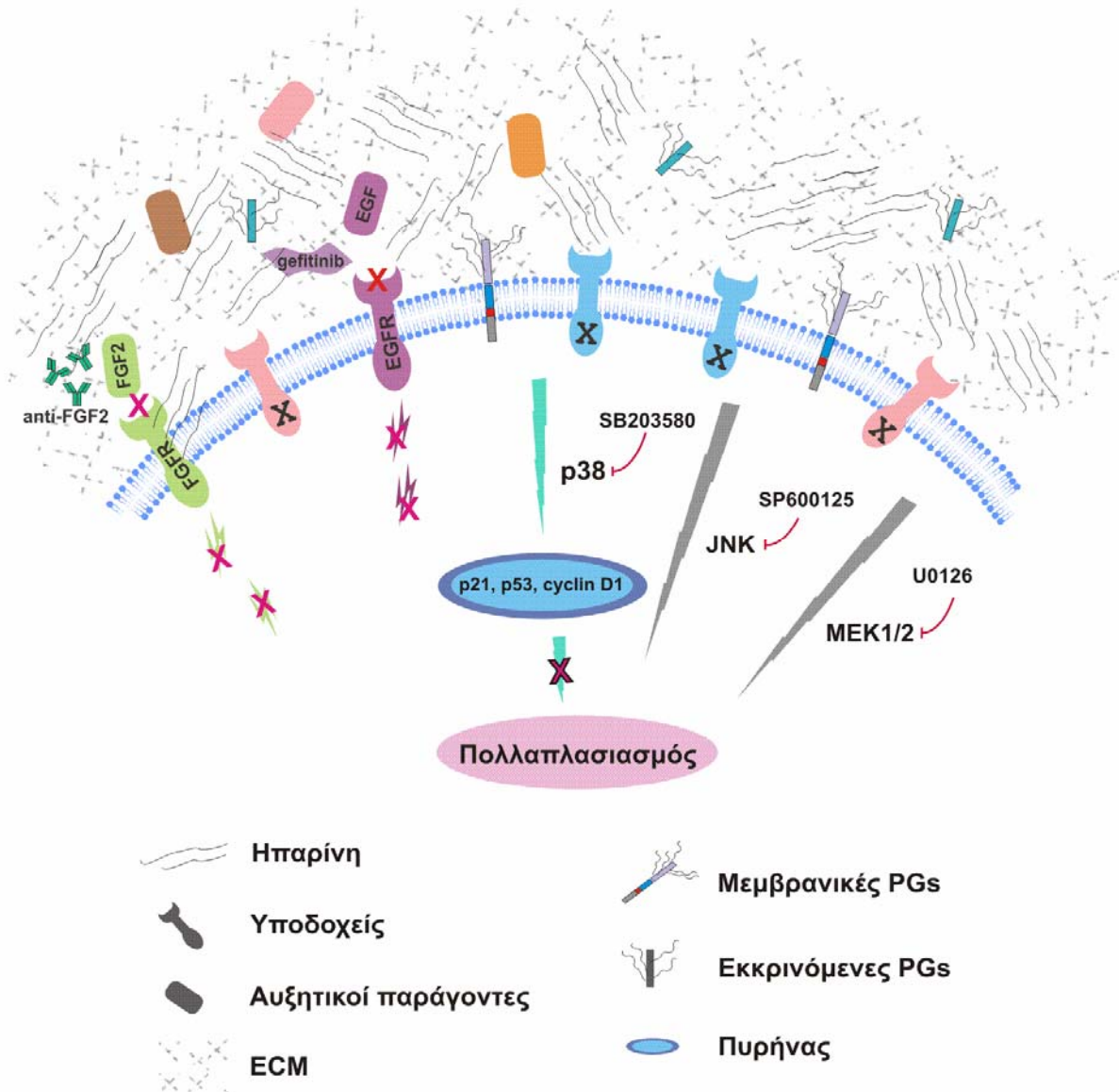
κυττάρων αυτών δεν εξαρτάται από τη σηματοδότηση του EGFR (Εικόνα 4.1). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι αλυσίδες HS που εκκρίνονται από τα κύτταρα του ήπατος και είναι δομικά παρόμοιες με την έντονα θειωμένη ηπαρίνη, καθώς και οι εξωγενώς προστιθέμενοι δισακχαρίτες HS αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει την αυξημένη έκφραση των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης της οικογένειας του EGF (Zvibel *et al.*, 1998; Zvibel *et al.*, 1998; Fishman *et al.*, 2002). Η έλλειψη της συμμετοχής του EGFR στη δράση της ηπαρίνης, όπως παρατηρήθηκε στη μελέτη αυτή, πιθανώς να σχετίζεται με την αλληλουχία και τη θείωση των δισακχαριτών του παρασκευάσματος της ηπαρίνης που χρησιμοποιήθηκε.

Λαμβάνοντας υπόψιν τους πολυάριθμους μηχανισμούς που έχουν προταθεί για τη δράση της ηπαρίνης (Schlessinger 2000; Lyon *et al.*, 1994; Ottlinger *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 2006), μελετήθηκε η συμμετοχή των μονοπατιών των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPKs) στον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Η οικογένεια των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης, MAPKs, που εμπλέκεται στη μετάδοση ποικίλων σημάτων από τον εξωκυττάριο χώρο στον πυρήνα των κυττάρων, αποτελείται από τρεις κύριες ομάδες κινασών, ERKs (extracellular-regulating kinases), JNK (c-Jun amino-terminal kinases) και p38 MAPKs, οι οποίες διαφέρουν όσον αφορά το υπόστρωμά τους και τις αποκρίσεις τους στα εξωκυτταρικά ερεθίσματα (Kim *et al.*, 2007; Nebreda & Porras, 2000; Zhai *et al.*, 2004). Μελέτες επισημαίνουν τη συμμετοχή των μονοπατιών σηματοδότησης των MAPKs σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες (Ding & Adrian, 2001; Hecquet *et al.*, 2003; McMullen *et al.*, 2005), καθώς και στον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Balmanno & Cook, 2008; Tong *et al.*, 2007). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ηπαρίνη ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της p38 MAP κινάσης (Εικόνα 4.1). Η κινάση p38 είχε αρχικά προταθεί ως μία MAP κινάση που συμμετέχει στην διαδικασία της απόπτωσης και στην κυτταρική απόκριση στο στρες, όμως στοιχεία από πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η ενεργοποίηση της p38 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την εξέλιξη του

καρκίνου του παχέος εντέρου (Comes *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2006; Sun & Sinicrope, 2005).

Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα αυτής της φάσης της μελέτης έδειξαν ότι η ηπαρίνη ενεργοποιεί την p38 κινάση, αυξάνοντας με δόσοεξαρτώμενο τρόπο τη φωσφορυλίωσή της, στα HT29, SW1116 και HCT116 καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. Ο επαγόμενος από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμός των κυττάρων μειώθηκε από την αναστολή της κινάσης p38, ενώ δεν επηρεάστηκε από τη δράση των αναστολέων των JNK και MEK1/2 κινασών, γεγονός που δείχνει ότι η μιτογονική δράση της ηπαρίνης πραγματοποιείται μέσω της σηματοδότησης της p38 MAPK (Εικόνα 4.1). Προηγούμενες μελέτες αναδεικνύουν τη σύνθετη σχέση του p38 μονοπατιού και της αναστολής του κυτταρικού κύκλου, του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, με τρόπο που πιθανά να εξαρτάται από το κυτταρικό περιεχόμενο, τον κυτταρικό τύπο και τα ερεθίσματα (Welsh *et al.*, 2006; Thamilselvan *et al.*, 2002; Comes *et al.*, 2007; Cheung *et al.*, 2008; Corona *et al.*, 2007).

Ακολούθως, για να χαρακτηριστούν οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκουν το μονοπάτι του p38 στον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, μελετήθηκε η έκφραση των p21WAF/cip1, p53 και κυκλίνης D1, που αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και συμμετέχουν στην εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου (Liao *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2008; Damia & Broggini, 2004). Η ηπαρίνη μέσω ενός p38-εξαρτώμενου μηχανισμού τροποποιεί την έκφραση των p21WAF/cip1, p53 και κυκλίνης D1, σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, καθώς προάγει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου αυξάνοντας τον αριθμό των κυττάρων στη φάση S. Επομένως, είναι πιθανή η ύπαρξη ενός μηχανισμού που συνδέει την εξωκυττάρια GAG ηπαρίνη με τη ρύθμιση του κύκλου των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Δεδομένου ότι η p38 MAP κινάση σχετίζεται με την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Comes *et al.*, 2007), μελετήθηκε η επίδραση της ηπαρίνης που όμως δεν μετέβαλε το ποσοστό της απόπτωσης στα



Εικόνα 4.1. Δράση της ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό των HT29, SW1116 και HCT116 καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Η επαγωγική επίδραση της ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων φαίνεται να είναι ανεξάρτητη των σηματοδοτικών μονοπατιών του FGF-2 και του EGFR. Στο σχήμα απεικονίζεται, επίσης, η πιθανή συνεργασία της μιτογονικής δράσης της ηπαρίνης και της σηματοδότησης των MAPKs. Το p38 σηματοδοτικό μονοπάτι φαίνεται να εμπλέκεται στον επαγόμενο από την ηπαρίνη πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, τροποποιώντας την έκφραση γονιδίων σημαντικών για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

HT29, SW1116 και HCT116 κύτταρα. Συνεπώς, η επίδραση της ηπαρίνης στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου πιθανώς να γίνεται μέσω της παρατηρούμενης μεταβολής στην έκφραση των ρυθμιστών-γονιδίων του κυτταρικού κύκλου.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτής της φάσης της μελέτης έδειξαν ότι μία εξωκυττάρια γλυκοζαμινογλυκάνη, η ηπαρίνη, μπορεί να τροποποιήσει την έκφραση γονιδίων σημαντικών για τη ρύθμιση του κύκλου των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω της ενεργοποίησης της p38 κινάσης.

Συμπερασματικά, τα συνολικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αφορούν το λεπτομερή βιοχημικό και μοριακό χαρακτηρισμό των ενδογενώς παραγόμενων GAGs, την επίδραση των εξωγενώς προστιθέμενων GAGs και ιδιαίτερα της ηπαρίνης που αποτέλεσε το πλέον δραστικό μόριο, στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου του ανθρώπου μέσω της τροποποίησης της έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Το γεγονός ότι η ηπαρίνη μέσω του p38 μονοπατιού ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου την καθιστά πιθανό στόχο για μελλοντικές αποτελεσματικές θεραπείες.

5 Βιβλιογραφία

- Adany, R., Heimer, R., Caterson, B., Sorrell, J.M., & Iozzo, R.V. (1990) Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma. Hypomethylation of PG-40 gene correlates with increased PG-40 content and mRNA levels. *J Biol Chem*, 265, 11389-96.
- Aguiar, C.B., Lobao-Soares, B., Alvarez-Silva, M., & Trentin, A.G. (2005) Glycosaminoglycans modulate C6 glioma cell adhesion to extracellular matrix components and alter cell proliferation and cell migration. *BMC Cell Biol*, 6, 31.
- Ahmed, F.E. (2003) Colon cancer: prevalence, screening, gene expression and mutation, and risk factors and assessment. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 21, 65-131.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., & Fukami, Y. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, 262, 5592-5.
- Alvarez-Silva, M. & Trentin, A.G. (1996) Undersulfation of glycosaminoglycans reduces the proliferation of a leukemia cell line in vitro. *Braz J Med Biol Res*, 29, 1239-42.
- Ameys, L. & Young, M.F. (2002) Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology*, 12, 107R-16R.
- Arai, N., Strom, A., Rafter, J.J., & Gustafsson, J.A. (2000) Estrogen receptor beta mRNA in colon cancer cells: growth effects of estrogen and genistein. *Biochem Biophys Res Commun*, 270, 425-31.
- Asimakopoulou, A.P., Theocharis, A.D., Tzanakakis, G.N., & Karamanos, N.K. (2008) The biological role of chondroitin sulfate in cancer and chondroitin-based anticancer agents. *In Vivo*, 22, 385-9.
- Au, Y.P., Kenagy, R.D., Clowes, M.M., & Clowes, A.W. (1993) Mechanisms of inhibition by heparin of vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Haemostasis*, 23 Suppl 1, 177-82.

- Augoff, K., Rabczynski, J., Tabola, R., Czapla, L., Ratajczak, K., & Grabowski, K. (2008) Immunohistochemical study of decorin expression in polyps and carcinomas of the colon. *Med Sci Monit*, 14, CR530-5.
- Aumailley, M. & Gayraud, B. (1998) Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med*, 76, 253-65.
- Aviezer, D., Iozzo, R.V., Noonan, D.M., & Yayon, A. (1997) Suppression of autocrine and paracrine functions of basic fibroblast growth factor by stable expression of perlecan antisense cDNA. *Mol Cell Biol*, 17, 1938-46.
- Aviezer, D., Levy, E., Safran, M., Svahn, C., Buddecke, E., Schmidt, A., David, G., Vlodavsky, I., & Yayon, A. (1994) Differential structural requirements of heparin and heparan sulfate proteoglycans that promote binding of basic fibroblast growth factor to its receptor. *J Biol Chem*, 269, 114-21.
- Aviezer, D. & Yayon, A. (1994) Heparin-dependent binding and autophosphorylation of epidermal growth factor (EGF) receptor by heparin-binding EGF-like growth factor but not by EGF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 12173-7.
- Bach, L.A. (1999) The insulin-like growth factor system: basic and clinical aspects. *Aust N Z J Med*, 29, 355-61.
- Baker, K., Raut, P., & Jass, J.R. (2008) Colorectal cancer cells express functional cell surface-bound TGFbeta. *Int J Cancer*, 122, 1695-700.
- Balmano, K. & Cook, S.J. (2008) Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ*.
- Bar-Shavit, R., Sabbah, V., Lampugnani, M.G., Marchisio, P.C., Fenton, J.W., 2nd, Vlodavsky, I., & Dejana, E. (1991) An Arg-Gly-Asp sequence within thrombin promotes endothelial cell adhesion. *J Cell Biol*, 112, 335-44.
- Baselga, J. & Averbuch, S.D. (2000) ZD1839 ('Iressa') as an anticancer agent. *Drugs*, 60 Suppl 1, 33-40; discussion 41-2.
- Bauer, T.W., Fan, F., Liu, W., Johnson, M., Parikh, N.U., Parry, G.C., Callahan, J., Mazar, A.P., Gallick, G.E., & Ellis, L.M. (2005) Insulinlike growth factor-I-mediated migration and invasion of human colon carcinoma cells requires activation of c-Met and urokinase plasminogen activator receptor. *Ann Surg*, 241, 748-56; discussion 756-8.

- Beauvais, D.M., Burbach, B.J., & Rapraeger, A.C. (2004) The syndecan-1 ectodomain regulates alphavbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells. *J Cell Biol*, 167, 171-81.
- Beerli, R.R. & Hynes, N.E. (1996) Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem*, 271, 6071-6.
- Bellone, G., Carbone, A., Tibaudi, D., Mauri, F., Ferrero, I., Smirne, C., Suman, F., Rivetti, C., Migliaretti, G., Camandona, M., Palestro, G., Emanuelli, G., & Rodeck, U. (2001) Differential expression of transforming growth factors-beta1, -beta2 and -beta3 in human colon carcinoma. *Eur J Cancer*, 37, 224-33.
- Bengtsson, E., Neame, P.J., Heinegard, D., & Sommarin, Y. (1995) The primary structure of a basic leucine-rich repeat protein, PRELP, found in connective tissues. *J Biol Chem*, 270, 25639-44.
- Berezcki, E. & Santha, M. (2008) The role of biglycan in the heart. *Connect Tissue Res*, 49, 129-32.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., & Zako, M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*, 68, 729-77.
- Berry, D., Shriver, Z., Natke, B., Kwan, C.P., Venkataraman, G., & Sasisekharan, R. (2003) Heparan sulphate glycosaminoglycans derived from endothelial cells and smooth muscle cells differentially modulate fibroblast growth factor-2 biological activity through fibroblast growth factor receptor-1. *Biochem J*, 373, 241-9.
- Biglia, N., Gadducci, A., Ponzzone, R., Roagna, R., & Sismondi, P. (2004) Hormone replacement therapy in cancer survivors. *Maturitas*, 48, 333-46.
- Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., & Rifkin, D.B. (1997) Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev*, 18, 26-45.
- Blobe, G.C., Liu, X., Fang, S.J., How, T., & Lodish, H.F. (2001) A novel mechanism for regulating transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC. *J Biol Chem*, 276, 39608-17.

- Blochberger, T.C., Vergnes, J.P., Hempel, J., & Hassell, J.R. (1992) cDNA to chick lumican (corneal keratan sulfate proteoglycan) reveals homology to the small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine. *J Biol Chem*, 267, 347-52.
- Bobek, V. & Kovarik, J. (2004) Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins. *Biomed Pharmacother*, 58, 213-9.
- Bosman, F.T., de Bruine, A., Flohil, C., van der Wurff, A., ten Kate, J., & Dinjens, W.W. (1993) Epithelial-stromal interactions in colon cancer. *Int J Dev Biol*, 37, 203-11.
- Campbell-Thompson, M., Lynch, I.J., & Bhardwaj, B. (2001) Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res*, 61, 632-40.
- Carey, D.J. (1997) Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*, 327 (Pt 1), 1-16.
- Castellot, J.J., Jr., Cochran, D.L., & Karnovsky, M.J. (1985) Effect of heparin on vascular smooth muscle cells. I. Cell metabolism. *J Cell Physiol*, 124, 21-8.
- Cetta, F. & Dharmo, A. (2007) Inherited multitumoral syndromes including colorectal carcinoma. *Surg Oncol*, 16 Suppl 1, S17-23.
- Chan, A.T., Ogino, S., & Fuchs, C.S. (2007) Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Engl J Med*, 356, 2131-42.
- Chatzinikolaou, G., Nikitovic, D., Asimakopoulou, A., Tsatsakis, A., Karamanos, N.K., & Tzanakakis, G.N. (2008) Heparin--a unique stimulator of human colon cancer cells' growth. *IUBMB Life*, 60, 333-40.
- Chen, R.L. & Lander, A.D. (2001) Mechanisms underlying preferential assembly of heparan sulfate on glypican-1. *J Biol Chem*, 276, 7507-17.
- Cheng, W., Tseng, C.J., Lin, T.T., Cheng, I., Pan, H.W., Hsu, H.C., & Lee, Y.M. (2008) Glypican-3-mediated oncogenesis involves the Insulin-like growth factor-signaling pathway. *Carcinogenesis*, 29, 1319-26.

- Cheung, K.L., Khor, T.O., Yu, S., & Kong, A.N. (2008) PEITC induces G1 cell cycle arrest on HT-29 cells through the activation of p38 MAPK signaling pathway. *Aaps J*, 10, 277-81.
- Chiacchiera, F. & Simone, C. (2008) Signal-dependent regulation of gene expression as a target for cancer treatment: inhibiting p38alpha in colorectal tumors. *Cancer Lett*, 265, 16-26.
- Choi, H.U., Johnson, T.L., Pal, S., Tang, L.H., Rosenberg, L., & Neame, P.J. (1989) Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. *J Biol Chem*, 264, 2876-84.
- Choi, H.U. & Meyer, K. (1975) The structure of keratan sulphates from various sources. *Biochem J*, 151, 543-53.
- Chua, C.C., Rahimi, N., Forsten-Williams, K., & Nugent, M.A. (2004) Heparan sulfate proteoglycans function as receptors for fibroblast growth factor-2 activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Circ Res*, 94, 316-23.
- Collins, P.D., Mpofo, C., Watson, A.J., & Rhodes, J.M. (2006) Strategies for detecting colon cancer and/or dysplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000279.
- Comes, F., Matrone, A., Lastella, P., Nico, B., Susca, F.C., Bagnulo, R., Ingravallo, G., Modica, S., Lo Sasso, G., Moschetta, A., Guanti, G., & Simone, C. (2007) A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ*, 14, 693-702.
- Comper, W.D. & Laurent, T.C. (1978) Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev*, 58, 255-315.
- Conery, A.R., Cao, Y., Thompson, E.A., Townsend, C.M., Jr., Ko, T.C., & Luo, K. (2004) Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol*, 6, 366-72.
- Corona, G., Deiana, M., Incani, A., Vauzour, D., Dessi, M.A., & Spencer, J.P. (2007) Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem Biophys Res Commun*, 362, 606-11.

- Corsi, A., Xu, T., Chen, X.D., Boyde, A., Liang, J., Mankani, M., Sommer, B., Iozzo, R.V., Eichstetter, I., Robey, P.G., Bianco, P., & Young, M.F. (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, 1180-9.
- Couchman, J.R., Kapoor, R., Sthanam, M., & Wu, R.R. (1996) Perlecan and basement membrane-chondroitin sulfate proteoglycan (bamacan) are two basement membrane chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans in the Engelbreth-Holm-Swarm tumor matrix. *J Biol Chem*, 271, 9595-602.
- Daidouji, K., Takagaki, K., Yoshihara, S., Matsuya, H., Sasaki, M., & Endo, M. (2002) Neoplastic changes in saccharide sequence of dermatan sulfate chains derived from human colon cancer. *Dig Dis Sci*, 47, 331-7.
- Damia, G. & Brogгинi, M. (2004) Cell cycle checkpoint proteins and cellular response to treatment by anticancer agents. *Cell Cycle*, 3, 46-50.
- Davidson, S. (2001) Editors: Haslett, C., Chilvers, E., Boon, N.A., Colledge, N.R., Hunter J.A. Davidson's Γενικές αρχές και κλινική πράξη της ιατρικής παθολογίας. 19^η έκδοση, *Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιανού*, 855-861.
- Davies, M., Gupta, S., Goldspink, G., & Winslet, M. (2006) The insulin-like growth factor system and colorectal cancer: clinical and experimental evidence. *Int J Colorectal Dis*, 21, 201-8.
- Day, R., Ilyas, M., Daszak, P., Talbot, I., & Forbes, A. (1999) Expression of syndecan-1 in inflammatory bowel disease and a possible mechanism of heparin therapy. *Dig Dis Sci*, 44, 2508-15.
- Δελίδης, Γ. (2001) Σύνοψη παθολογικής ανατομικής. *Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιανού*, 280-285.
- Delrieu, I. (2000) The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism. *FEBS Lett*, 468, 6-10.
- DeLuca, S., Richmond, M.E., & Silbert, J.E. (1973) Biosynthesis of chondroitin sulfate. Sulfation of the polysaccharide chain. *Biochemistry*, 12, 3911-5.

- Denholm, E.M., Cauchon, E., Poulin, C., & Silver, P.J. (2000) Inhibition of human dermal fibroblast proliferation by removal of dermatan sulfate. *Eur J Pharmacol*, 400, 145-53.
- Derynck, R., Akhurst, R.J., & Balmain, A. (2001) TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*, 29, 117-29.
- Derynck, R. & Feng, X.H. (1997) TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1333, F105-50.
- Di Leo, A., Messa, C., Cavallini, A., & Linsalata, M. (2001) Estrogens and colorectal cancer. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 1, 1-12.
- Dietel, M., Lewis, M.A., & Shapiro, S. (2005) Hormone replacement therapy: pathobiological aspects of hormone-sensitive cancers in women relevant to epidemiological studies on HRT: a mini-review. *Hum Reprod*, 20, 2052-60.
- Dignass, A.U., Tsunekawa, S., & Podolsky, D.K. (1994) Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration. *Gastroenterology*, 106, 1254-62.
- Ding, X.Z. & Adrian, T.E. (2001) MEK/ERK-mediated proliferation is negatively regulated by P38 map kinase in the human pancreatic cancer cell line, PANC-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 282, 447-53.
- Doerr, R., Zvibel, I., Chiuten, D., D'Olimpio, J., & Reid, L.M. (1989) Clonal growth of tumors on tissue-specific biomatrices and correlation with organ site specificity of metastases. *Cancer Res*, 49, 384-92.
- Elenius, K., Vainio, S., Laato, M., Salmivirta, M., Thesleff, I., & Jalkanen, M. (1991) Induced expression of syndecan in healing wounds. *J Cell Biol*, 114, 585-95.
- Engelberg, H. (1999) Actions of heparin that may affect the malignant process. *Cancer*, 85, 257-72.
- Esko, J.D. & Selleck, S.B. (2002) Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem*, 71, 435-71.
- Fannon, M., Forsten, K.E., & Nugent, M.A. (2000) Potentiation and inhibition of bFGF binding by heparin: a model for regulation of cellular response. *Biochemistry*, 39, 1434-45.

- Fannon, M. & Nugent, M.A. (1996) Basic fibroblast growth factor binds its receptors, is internalized, and stimulates DNA synthesis in Balb/c3T3 cells in the absence of heparan sulfate. *J Biol Chem*, 271, 17949-56.
- Farach-Carson, M.C. & Carson, D.D. (2007) Perlecan--a multifunctional extracellular proteoglycan scaffold. *Glycobiology*, 17, 897-905.
- Fenoglio-Preiser, C.M., Lantz, P.E., Listrom, M.B., Davis, M. & Rilke, F.O. (1989) Gastrointestinal pathology An atlas and text. *Raven press*, 383-401 & 727-790.
- Ferrao, A.V. & Mason, R.M. (1993) The effect of heparin on cell proliferation and type-I collagen synthesis by adult human dermal fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1180, 225-30.
- Filmus, J. & Selleck, S.B. (2001) Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest*, 108, 497-501.
- Fisher, L.W., Termine, J.D., & Young, M.F. (1989) Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem*, 264, 4571-6.
- Fishman, S., Brill, S., Papa, M., Halpern, Z., & Zvibel, I. (2002) Heparin-derived disaccharides modulate proliferation and Erb-B2-mediated signal transduction in colon cancer cell lines. *Int J Cancer*, 99, 179-84.
- Fjeldstad, K. & Kolset, S.O. (2005) Decreasing the metastatic potential in cancers--targeting the heparan sulfate proteoglycans. *Curr Drug Targets*, 6, 665-82.
- Flint, N., Cove, F.L., & Evans, G.S. (1994) Heparin stimulates the proliferation of intestinal epithelial cells in primary culture. *J Cell Sci*, 107 (Pt 2), 401-11.
- Forsten, K.E., Fannon, M., & Nugent, M.A. (2000) Potential mechanisms for the regulation of growth factor binding by heparin. *J Theor Biol*, 205, 215-30.
- Forte, A., De Sanctis, R., Leonetti, G., Manfredelli, S., Urbano, V., & Bezzi, M. (2008) Dietary chemoprevention of colorectal cancer. *Ann Ital Chir*, 79, 261-7.

- Fransson, L.A. (2003) Glypicans. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 125-9.
- Friedman, J.S., Ducharme, R., Raymond, V., & Walter, M.A. (2000) Isolation of a novel iris-specific and leucine-rich repeat protein (oculoglycan) using differential selection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 2059-66.
- Fthenou, E., Zafiropoulos, A., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N.K., & Tzanakakis, G.N. (2007) Chondroitin sulfate prevents platelet derived growth factor-mediated phosphorylation of PDGF-Rbeta in normal human fibroblasts severely impairing mitogenic responses. *J Cell Biochem*.
- Fthenou, E., Zafiropoulos, A., Tsatsakis, A., Stathopoulos, A., Karamanos, N.K., & Tzanakakis, G.N. (2006) Chondroitin sulfate A chains enhance platelet derived growth factor-mediated signalling in fibrosarcoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 38, 2141-50.
- Fu, P., Thompson, J.A., Leeding, K.S., & Bach, L.A. (2007) Insulin-like growth factors induce apoptosis as well as proliferation in LIM 1215 colon cancer cells. *J Cell Biochem*, 100, 58-68.
- Fujimori, T., Fujii, S., Saito, N., & Sugihara, K. (2009) Pathological diagnosis of early colorectal carcinoma and its clinical implications. *Digestion*, 79 Suppl 1, 40-51.
- Funderburgh, J.L. (2000) Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology*, 10, 951-8.
- Funderburgh, J.L. (2002) Keratan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life*, 54, 187-94.
- Galzie, Z., Fernig, D.G., Smith, J.A., Poston, G.J., & Kinsella, A.R. (1997) Invasion of human colorectal carcinoma cells is promoted by endogenous basic fibroblast growth factor. *Int J Cancer*, 71, 390-5.
- Gandhi, N.S. & Mancera, R.L. (2008) The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des*, 72, 455-82.
- Georgolios, A., Batistatou, A., Charalabopoulos, A., Manolopoulos, L., & Charalabopoulos, K. (2006) The role of CD44 adhesion molecule in oral cavity cancer. *Exp Oncol*, 28, 94-8.

- Gersemann, M., Wehkamp, J., Fellermann, K., & Stange, E.F. (2008) Crohn's disease-defect in innate defence. *World J Gastroenterol*, 14, 5499-503.
- Giovannucci, E. (2001) Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J Nutr*, 131, 3109S-20S.
- Giovannucci, E. (2003) Diet, body weight, and colorectal cancer: a summary of the epidemiologic evidence. *J Womens Health (Larchmt)*, 12, 173-82.
- Girish, K.S. & Kemparaju, K. (2007) The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci*, 80, 1921-43.
- Grebner, E.E., Hall, C.W., & Neufeld, E.F. (1966) Glycosylation of serine residues by a uridine diphosphate-xylose: protein xylosyltransferase from mouse mastocytoma. *Arch Biochem Biophys*, 116, 391-8.
- Gu, Y., Zhu, C.F., Iwamoto, H., & Chen, J.S. (2005) Genistein inhibits invasive potential of human hepatocellular carcinoma by altering cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. *World J Gastroenterol*, 11, 6512-7.
- Harmer, N.J. (2006) Insights into the role of heparan sulphate in fibroblast growth factor signalling. *Biochem Soc Trans*, 34, 442-5.
- Harris, R.C., Chung, E., & Coffey, R.J. (2003) EGF receptor ligands. *Exp Cell Res*, 284, 2-13.
- Hascall, V.C. & Riolo, R.L. (1972) Characteristics of the protein-keratan sulfate core and of keratan sulfate prepared from bovine nasal cartilage proteoglycan. *J Biol Chem*, 247, 4529-38.
- Hausser, H.J. & Brenner, R.E. (2004) Low doses and high doses of heparin have different effects on osteoblast-like Saos-2 cells in vitro. *J Cell Biochem*, 91, 1062-73.
- Hecquet, C., Lefevre, G., Valtink, M., Engelmann, K., & Mascarelli, F. (2003) Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelium cells: JNK1, P38 kinase, and cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 1320-9.
- Hegde, S.R., Sun, W., & Lynch, J.P. (2008) Systemic and targeted therapy for advanced colon cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2, 135-49.

- Heldin, C.H., Miyazono, K., & ten Dijke, P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390, 465-71.
- Heldin, P. (2003) Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation. *Braz J Med Biol Res*, 36, 967-73.
- Hocking, A.M., Shinomura, T., & McQuillan, D.J. (1998) Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol*, 17, 1-19.
- Hoffman, P., Mashburn, T.A., Jr., & Meyer, K. (1967) Proteinpolysaccharide of bovine cartilage. II. The relation of keratan sulfate and chondroitin sulfate. *J Biol Chem*, 242, 3805-9.
- Hook, M., Lindahl, U., Backstrom, G., Malmstrom, A., & Fransson, L. (1974) Biosynthesis of heparin. 3. Formation of iduronic acid residues. *J Biol Chem*, 249, 3908-15.
- Igarashi, M., Yamaguchi, H., Hirata, A., Daimon, M., Tominaga, M., & Kato, T. (2000) Insulin activates p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase via a MAP kinase kinase (MKK) 3/MKK 6 pathway in vascular smooth muscle cells. *Eur J Clin Invest*, 30, 668-77.
- Inoue, A., Saijo, Y., Maemondo, M., Gomi, K., Tokue, Y., Kimura, Y., Ebina, M., Kikuchi, T., Moriya, T., & Nukiwa, T. (2003) Severe acute interstitial pneumonia and gefitinib. *Lancet*, 361, 137-9.
- Iozzo, R.V. (1994) Perlecan: a gem of a proteoglycan. *Matrix Biol*, 14, 203-8.
- Iozzo, R.V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*, 67, 609-52.
- Iozzo, R.V. (1999) The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem*, 274, 18843-6.
- Itano, N. & Kimata, K. (2002) Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life*, 54, 195-9.
- Iwama, T. (2009) NSAIDs and colorectal cancer prevention. *J Gastroenterol*, 44 Suppl 19, 72-6.

- Jaiswal, A.S., Balusu, R., & Narayan, S. (2005) Involvement of adenomatous polyposis coli in colorectal tumorigenesis. *Front Biosci*, 10, 1118-34.
- Jayson, G.C. & Gallagher, J.T. (1997) Heparin oligosaccharides: inhibitors of the biological activity of bFGF on Caco-2 cells. *Br J Cancer*, 75, 9-16.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., & Thun, M.J. (2008) Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, 58, 71-96.
- Jiang, X. & Couchman, J.R. (2003) Perlecan and tumor angiogenesis. *J Histochem Cytochem*, 51, 1393-410.
- Jo, W.S. & Chung, D.C. (2005) Genetics of hereditary colorectal cancer. *Semin Oncol*, 32, 11-23.
- Johnson, I.T. & Lund, E.K. (2007) Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, 26, 161-81.
- Joyce, T. & Pintzas, A. (2007) Microarray analysis to reveal genes involved in colon carcinogenesis. *Expert Opin Pharmacother*, 8, 895-900.
- Juretic, N., Santibanez, J.F., Hurtado, C., & Martinez, J. (2001) ERK 1,2 and p38 pathways are involved in the proliferative stimuli mediated by urokinase in osteoblastic SaOS-2 cell line. *J Cell Biochem*, 83, 92-8.
- Kanayama, M., Takahara, T., Yata, Y., Xue, F., Shinno, E., Nonome, K., Kudo, H., Kawai, K., Kudo, T., Tabuchi, Y., Watanabe, A., & Sugiyama, T. (2007) Hepatocyte growth factor promotes colonic epithelial regeneration via Akt signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, G230-9.
- Kanwar, Y.S., Linker, A., & Farquhar, M.G. (1980) Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. *J Cell Biol*, 86, 688-93.
- Kapitanovic, S., Radosevic, S., Kapitanovic, M., Andelinovic, S., Ferencic, Z., Tavassoli, M., Primorac, D., Sonicki, Z., Spaventi, S., Pavelic, K., & Spaventi, R. (1997) The expression of p185(HER-2/neu) correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 112, 1103-13.

- Khoury, J. & Langleben, D. (2000) Heparin-like molecules inhibit pulmonary vascular pericyte proliferation in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, L252-61.
- Kiani, C., Chen, L., Wu, Y.J., Yee, A.J., & Yang, B.B. (2002) Structure and function of aggrecan. *Cell Res*, 12, 19-32.
- Kim, C.S., Kim, J.M., Nam, S.Y., Yang, K.H., Jeong, M., Kim, H.S., Lim, Y.K., Kim, C.S., Jin, Y.W., & Kim, J. (2007) Low-dose of ionizing radiation enhances cell proliferation via transient ERK1/2 and p38 activation in normal human lung fibroblasts. *J Radiat Res (Tokyo)*, 48, 407-15.
- Kim, H., Peterson, T.G., & Barnes, S. (1998) Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. *Am J Clin Nutr*, 68, 1418S-1425S.
- Kim, H.R., Wheeler, M.A., Wilson, C.M., Iida, J., Eng, D., Simpson, M.A., McCarthy, J.B., & Bullard, K.M. (2004) Hyaluronan facilitates invasion of colon carcinoma cells in vitro via interaction with CD44. *Cancer Res*, 64, 4569-76.
- Kjellen, L. & Lindahl, U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem*, 60, 443-75.
- Knox, S.M. & Whitelock, J.M. (2006) Perlecan: how does one molecule do so many things? *Cell Mol Life Sci*, 63, 2435-45.
- Ko, T.C., Beauchamp, R.D., Townsend, C.M., Jr., Thompson, E.A., & Thompson, J.C. (1994) Transforming growth factor-beta inhibits rat intestinal cell growth by regulating cell cycle specific gene expression. *Am J Surg*, 167, 14-9; discussion 19-20.
- Kogan, G., Soltes, L., Stern, R., & Gemeiner, P. (2007) Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*, 29, 17-25.
- Kojima, T., Inazawa, J., Takamatsu, J., Rosenberg, R.D., & Saito, H. (1993) Human ryudocan core protein: molecular cloning and characterization of the cDNA, and chromosomal localization of the gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 190, 814-22.

- Kokenyesi, R. & Silbert, J.E. (1995) Formation of heparan sulfate or chondroitin/dermatan sulfate on recombinant domain I of mouse perlecan expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 211, 262-7.
- Kolset, S.O., Prydz, K., & Pejler, G. (2004) Intracellular proteoglycans. *Biochem J*, 379, 217-27.
- Kouniavsky, G., Khaikin, M., Zvibel, I., Zippel, D., Brill, S., Halpern, Z., & Papa, M. (2002) Stromal extracellular matrix reduces chemotherapy-induced apoptosis in colon cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis*, 19, 55-60.
- Kresse, H. & Schonherr, E. (2001) Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J Cell Physiol*, 189, 266-74.
- Kurokawa, M., Doctrow, S.R., & Klagsbrun, M. (1989) Neutralizing antibodies inhibit the binding of basic fibroblast growth factor to its receptor but not to heparin. *J Biol Chem*, 264, 7686-91.
- Kuzumaki, T., Kobayashi, T., & Ishikawa, K. (1998) Genistein induces p21(Cip1/WAF1) expression and blocks the G1 to S phase transition in mouse fibroblast and melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 251, 291-5.
- Lahm, H., Amstad, P., Wyniger, J., Yilmaz, A., Fischer, J.R., Schreyer, M., & Givel, J.C. (1994) Blockade of the insulin-like growth-factor-I receptor inhibits growth of human colorectal cancer cells: evidence of a functional IGF-II-mediated autocrine loop. *Int J Cancer*, 58, 452-9.
- Lai, M.Y., Huang, J.A., Liang, Z.H., Jiang, H.X., & Tang, G.D. (2008) Mechanisms underlying aspirin-mediated growth inhibition and apoptosis induction of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cell line SW480. *World J Gastroenterol*, 14, 4227-33.
- Lali, F.V., Hunt, A.E., Turner, S.J., & Foxwell, B.M. (2000) The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 275, 7395-402.
- Lamari, F.N. & Karamanos, N.K. (2006) Structure of chondroitin sulfate. *Adv Pharmacol*, 53, 33-48.

- Lauder, R.M. (2009) Chondroitin sulphate: a complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems. *Complement Ther Med*, 17, 56-62.
- Laurent, T.C. & Fraser, J.R. (1992) Hyaluronan. *Faseb J*, 6, 2397-404.
- LeRoith, D. & Roberts, C.T., Jr. (2003) The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett*, 195, 127-37.
- Lewis, S., Crossman, M., Flannelly, J., Belcher, C., Doherty, M., Bayliss, M.T., & Mason, R.M. (1999) Chondroitin sulphation patterns in synovial fluid in osteoarthritis subsets. *Ann Rheum Dis*, 58, 441-5.
- Li, H.L., Ye, K.H., Zhang, H.W., Luo, Y.R., Ren, X.D., Xiong, A.H., & Situ, R. (2001) Effect of heparin on apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells. *Cell Res*, 11, 311-5.
- Li, F., Cao, Y., Townsend, C.M., Jr., & Ko, T.C. (2005) TGF-beta signaling in colon cancer cells. *World J Surg*, 29, 306-11.
- Li, F.Y. & Lai, M.D. (2009) Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B*, 10, 219-29.
- Li, H., Fan, X., & Houghton, J. (2007) Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem*, 101, 805-15.
- Liao, D.J., Thakur, A., Wu, J., Biliran, H., & Sarkar, F.H. (2007) Perspectives on c-Myc, Cyclin D1, and their interaction in cancer formation, progression, and response to chemotherapy. *Crit Rev Oncog*, 13, 93-158.
- Lim, S.J., Lee, Y.J., & Lee, E. (2006) p38MAPK inhibitor SB203580 sensitizes human SNU-C4 colon cancer cells to exisulind-induced apoptosis. *Oncol Rep*, 16, 1131-5.
- Lin, C.Q. & Bissell, M.J. (1993) Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *Faseb J*, 7, 737-43.
- Lin, H.M., Chatterjee, A., Lin, Y.H., Anjomshoaa, A., Fukuzawa, R., McCall, J.L., & Reeve, A.E. (2007) Genome wide expression profiling identifies genes associated with colorectal liver metastasis. *Oncol Rep*, 17, 1541-9.

- Lonardo, F., Di Marco, E., King, C.R., Pierce, J.H., Segatto, O., Aaronson, S.A., & Di Fiore, P.P. (1990) The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biol*, 2, 992-1003.
- Lopes, C.C., Dietrich, C.P., & Nader, H.B. (2006) Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz J Med Biol Res*, 39, 157-67.
- Lorenzo, P., Aspberg, A., Onnerfjord, P., Bayliss, M.T., Neame, P.J., & Heinegard, D. (2001) Identification and characterization of asporin, a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *J Biol Chem*, 276, 12201-11.
- Lu, Y.P., Ishiwata, T., Kawahara, K., Watanabe, M., Naito, Z., Moriyama, Y., Sugisaki, Y., & Asano, G. (2002) Expression of lumican in human colorectal cancer cells. *Pathol Int*, 52, 519-26.
- Luo, W., Guo, C., Zheng, J., Chen, T.L., Wang, P.Y., Vertel, B.M., & Tanzer, M.L. (2000) Aggrecan from start to finish. *J Bone Miner Metab*, 18, 51-6.
- Lynch, J.P. & Hoops, T.C. (2002) The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 16, 775-810.
- Lyon, M., Deakin, J.A., & Gallagher, J.T. (1994) Liver heparan sulfate structure. A novel molecular design. *J Biol Chem*, 269, 11208-15.
- Lyon, M., Deakin, J.A., Mizuno, K., Nakamura, T., & Gallagher, J.T. (1994) Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate. Elucidation of the major heparan sulfate structural determinants. *J Biol Chem*, 269, 11216-23.
- Lyon, M., Rushton, G., & Gallagher, J.T. (1997) The interaction of the transforming growth factor-betas with heparin/heparan sulfate is isoform-specific. *J Biol Chem*, 272, 18000-6.
- Maeda, N., Nishiwaki, T., Shintani, T., Hamanaka, H., & Noda, M. (1996) 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Biol Chem*, 271, 21446-52.

- Μακρής, Π.Ε. (1999) Ηπαρίνες, 2^η έκδοση, *Ζανδές*, 13-19.
- Malmstrom, A. & Fransson, L.A. (1975) Biosynthesis of dermatan sulfate. I. Formation of L-iduronic acid residues. *J Biol Chem*, 250, 3419-25.
- Mankin, H.J. & Lippiello, L. (1971) The glycosaminoglycans of normal and arthritic cartilage. *J Clin Invest*, 50, 1712-9.
- Maras-Simunic, M., Druzijanic, N., Simunic, M., Roglic, J., Tomic, S., & Perko, Z. (2009) Use of modified multidetector CT colonography for the evaluation of acute and subacute colon obstruction caused by colorectal cancer: a feasibility study. *Dis Colon Rectum*, 52, 489-95.
- Marhaba, R. & Zoller, M. (2004) CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol*, 35, 211-31.
- Massague, J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67, 753-91.
- Massarrat, S. (2008) Smoking and gut. *Arch Iran Med*, 11, 293-305.
- Matsushime, H., Roussel, M.F., Ashmun, R.A., & Sherr, C.J. (1991) Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*, 65, 701-13.
- Matsuzaki, K., Seki, T., & Okazaki, K. (2006) TGF-beta during human colorectal carcinogenesis: the shift from epithelial to mesenchymal signaling. *Inflammopharmacology*, 14, 198-203.
- Maurer, A.M., Han, Z.C., Dhermy, D., & Briere, J. (1994) Glycosaminoglycans enhance human leukemic cell growth in vitro. *Leuk Res*, 18, 837-42.
- McEwan, P.A., Scott, P.G., Bishop, P.N., & Bella, J. (2006) Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. *J Struct Biol*, 155, 294-305.
- McMullen, M.E., Bryant, P.W., Glembotski, C.C., Vincent, P.A., & Pumiglia, K.M. (2005) Activation of p38 has opposing effects on the proliferation and migration of endothelial cells. *J Biol Chem*, 280, 20995-1003.
- Mendes de Aguiar, C.B., Garcez, R.C., Alvarez-Silva, M., & Trentin, A.G. (2002) Undersulfation of proteoglycans and proteins alter C6 glioma cells

- proliferation, adhesion and extracellular matrix organization. *Int J Dev Neurosci*, 20, 563-71.
- Messina, M. & Bennink, M. (1998) Soyfoods, isoflavones and risk of colonic cancer: a review of the in vitro and in vivo data. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 12, 707-28.
- Middeldorp, S. (2008) Heparin: from animal organ extract to designer drug. *Thromb Res*, 122, 753-62.
- Milev, P., Monnerie, H., Popp, S., Margolis, R.K., & Margolis, R.U. (1998) The core protein of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan is a high-affinity ligand of fibroblast growth factor-2 and potentiates its mitogenic activity. *J Biol Chem*, 273, 21439-42.
- Misra, S., Hascall, V.C., Berger, F.G., Markwald, R.R., & Ghatak, S. (2008) Hyaluronan, CD44, and cyclooxygenase-2 in colon cancer. *Connect Tissue Res*, 49, 219-24.
- Mitropoulou, T.N., Tzanakakis, G.N., Nikitovic, D., Tsatsakis, A., & Karamanos, N.K. (2002) In vitro effects of genistein on the synthesis and distribution of glycosaminoglycans/proteoglycans by estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer epithelial cells. *Anticancer Res*, 22, 2841-6.
- Molist, A., Romaris, M., Lindahl, U., Villena, J., Touab, M., & Bassols, A. (1998) Changes in glycosaminoglycan structure and composition of the main heparan sulphate proteoglycan from human colon carcinoma cells (perlecan) during cell differentiation. *Eur J Biochem*, 254, 371-7.
- Molist, A., Romaris, M., Villena, J., & Bassols, A. (1997) Enterocytic differentiation correlates with changes in the fine structure and sulfation of perlecan in HT29 human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 238, 874-9.
- Morikawa, K., Walker, S.M., Nakajima, M., Pathak, S., Jessup, J.M., & Fidler, I.J. (1988) Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res*, 48, 6863-71.
- Mulloy, B. & Forster, M.J. (2000) Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. *Glycobiology*, 10, 1147-56.

- Munger, J.S., Harpel, J.G., Gleizes, P.E., Mazzieri, R., Nunes, I., & Rifkin, D.B. (1997) Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int*, 51, 1376-82.
- Murata, K. & Yokoyama, Y. (1987) Dermatan sulfate isomers in human articular cartilage characterized by high-performance liquid chromatography. *Biochem Int*, 15, 87-94.
- Murgue, B., Tsunekawa, S., Rosenberg, I., deBeaumont, M., & Podolsky, D.K. (1994) Identification of a novel variant form of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3 IIIb) in human colonic epithelium. *Cancer Res*, 54, 5206-11.
- Nagano, O. & Saya, H. (2004) Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci*, 95, 930-5.
- Naito, Z. (2005) Role of the small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family in pathological lesions and cancer cell growth. *J Nippon Med Sch*, 72, 137-45.
- Nakajima, M. & Chop, A.M. (1991) Tumor invasion and extracellular matrix degradative enzymes: regulation of activity by organ factors. *Semin Cancer Biol*, 2, 115-27.
- Naomoto, Y., Takaoka, M., Okawa, T., Nobuhisa, T., Gunduz, M., & Tanaka, N. (2005) The role of heparanase in gastrointestinal cancer (Review). *Oncol Rep*, 14, 3-8.
- Neame, P.J., Choi, H.U., & Rosenberg, L.C. (1989) The primary structure of the core protein of the small, leucine-rich proteoglycan (PG I) from bovine articular cartilage. *J Biol Chem*, 264, 8653-61.
- Nebreda, A.R. & Porras, A. (2000) p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci*, 25, 257-60.
- Netzer, P., Domek, M., Pai, R., Halter, F., & Tarnawski, A. (2001) Inhibition of human colon cancer cell growth by antisense oligodeoxynucleotides targeted at basic fibroblast growth factor. *Aliment Pharmacol Ther*, 15, 1673-9.
- New, B.A. & Yeoman, L.C. (1992) Identification of basic fibroblast growth factor sensitivity and receptor and ligand expression in human colon tumor cell lines. *J Cell Physiol*, 150, 320-6.

- Niers, T.M., Klerk, C.P., DiNisio, M., Van Noorden, C.J., Buller, H.R., Reitsma, P.H., & Richel, D.J. (2007) Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. *Crit Rev Oncol Hematol*, 61, 195-207.
- Nikitovic, D., Assouti, M., Sifaki, M., Katonis, P., Krasagakis, K., Karamanos, N.K., & Tzanakakis, G.N. (2007) Chondroitin sulfate and heparan sulfate-containing proteoglycans are both partners and targets of basic fibroblast growth factor-mediated proliferation in human metastatic melanoma cell lines. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Nikitovic, D., Assouti, M., Sifaki, M., Katonis, P., Krasagakis, K., Karamanos, N.K., & Tzanakakis, G.N. (2008) Chondroitin sulfate and heparan sulfate-containing proteoglycans are both partners and targets of basic fibroblast growth factor-mediated proliferation in human metastatic melanoma cell lines. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 72-83.
- Nikitovic, D., Berdiaki, K., Chalkiadaki, G., Karamanos, N., & Tzanakakis, G. (2008) The role of SLRP-proteoglycans in osteosarcoma pathogenesis. *Connect Tissue Res*, 49, 235-8.
- Nikitovic, D., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N.K., & Tzanakakis, G.N. (2008) Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *IUBMB Life*, 60, 818-23.
- Nikitovic, D., Tsatsakis, A.M., Karamanos, N.K., & 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. *Anticancer Res*, 23, 459-64.
- Nikitovic, D., Zafiropoulos, A., Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K., & Tsatsakis, A.M. (2005) Effects of glycosaminoglycans on cell proliferation of normal osteoblasts and human osteosarcoma cells depend on their type and fine chemical compositions. *Anticancer Res*, 25, 2851-6.
- Ninomiya, K., Miyamoto, T., Imai, J., Fujita, N., Suzuki, T., Iwasaki, R., Yagi, M., Watanabe, S., Toyama, Y., & Suda, T. (2007) Osteoclastic activity induces osteomodulin expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 362, 460-6.
- Nishikawa, A., Mori, Y., Lee, I.S., Tanaka, T., & Hirose, M. (2004) Cigarette smoking, metabolic activation and carcinogenesis. *Curr Drug Metab*, 5, 363-73.

- Nobuhisa, T., Naomoto, Y., Ohkawa, T., Takaoka, M., Ono, R., Murata, T., Gunduz, M., Shirakawa, Y., Yamatsuji, T., Haisa, M., Matsuoka, J., Tsujigiwa, H., Nagatsuka, H., Nakajima, M., & Tanaka, N. (2005) Heparanase expression correlates with malignant potential in human colon cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131, 229-37.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., & Salomon, D.S. (2006) Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366, 2-16.
- Nugent, M.A. & Iozzo, R.V. (2000) Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol*, 32, 115-20.
- Ohtaka, K., Watanabe, S., Iwazaki, R., Hirose, M., & Sato, N. (1996) Role of extracellular matrix on colonic cancer cell migration and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 220, 346-52.
- Oldberg, A., Antonsson, P., Lindblom, K., & Heinegard, D. (1989) A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *Embo J*, 8, 2601-4.
- Ottlinger, M.E., Pukac, L.A., & Karnovsky, M.J. (1993) Heparin inhibits mitogen-activated protein kinase activation in intact rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 268, 19173-6.
- Pagliacci, M.C., Smacchia, M., Migliorati, G., Grignani, F., Riccardi, C., & Nicoletti, I. (1994) Growth-inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer*, 30A, 1675-82.
- Pan, S.Y. & DesMeules, M. (2009) Energy intake, physical activity, energy balance, and cancer: epidemiologic evidence. *Methods Mol Biol*, 472, 191-215.
- Παπαδημητρίου, Ι. (2001) Σύγχρονη γενική χειρουργική. 2^{ος} τόμος, 2^η έκδοση, *Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιανού*, 1017-1052.
- Papapolychroniadis, C. (2004) Environmental and other risk factors for colorectal carcinogenesis. *Tech Coloproctol*, 8 Suppl 1, s7-9.
- Pellegrini, L. (2001) Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view. *Curr Opin Struct Biol*, 11, 629-34.

- Pelosi, P., Rocco, P.R., Negrini, D., & Passi, A. (2007) The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation. *An Acad Bras Cienc*, 79, 285-97.
- Peretti, T., Waisberg, J., Mader, A.M., de Matos, L.L., da Costa, R.B., Conceicao, G.M., Lopes, A.C., Nader, H.B., & Pinhal, M.A. (2008) Heparanase-2, syndecan-1, and extracellular matrix remodeling in colorectal carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 20, 756-65.
- Perona, R. (2006) Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol*, 8, 77-82.
- Peterson, G. (1995) Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J Nutr*, 125, 784S-789S.
- Plaas, A.H., West, L.A., Wong-Palms, S., & Nelson, F.R. (1998) Glycosaminoglycan sulfation in human osteoarthritis. Disease-related alterations at the non-reducing termini of chondroitin and dermatan sulfate. *J Biol Chem*, 273, 12642-9.
- Polkowski, K. & Mazurek, A.P. (2000) Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol Pharm*, 57, 135-55.
- Powell, A.K., Yates, E.A., Fernig, D.G., & Turnbull, J.E. (2004) Interactions of heparin/heparan sulfate with proteins: appraisal of structural factors and experimental approaches. *Glycobiology*, 14, 17R-30R.
- Pupa, S.M., Menard, S., Forti, S., & Tagliabue, E. (2002) New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J Cell Physiol*, 192, 259-67.
- Rabenstein, D.L. (2002) Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep*, 19, 312-31.
- Rada, J.A., Achen, V.R., Penugonda, S., Schmidt, R.W., & Mount, B.A. (2000) Proteoglycan composition in the human sclera during growth and aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 1639-48.
- Radinsky, R. (1995) Molecular mechanisms for organ-specific colon carcinoma metastasis. *Eur J Cancer*, 31A, 1091-5.

- Radisky, D., Hagios, C., & Bissell, M.J. (2001) Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin Cancer Biol*, 11, 87-95.
- Raff, M.C. (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 356, 397-400.
- Rahmani, M., Wong, B.W., Ang, L., Cheung, C.C., Carthy, J.M., Walinski, H., & McManus, B.M. (2006) Versican: signaling to transcriptional control pathways. *Can J Physiol Pharmacol*, 84, 77-92.
- Raouf, A., Ganss, B., McMahon, C., Vary, C., Roughley, P.J., & Seth, A. (2002) Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix. *Matrix Biol*, 21, 361-7.
- Rapraeger, A., Jalkanen, M., Endo, E., Koda, J., & Bernfield, M. (1985) The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J Biol Chem*, 260, 11046-52.
- Rapraeger, A. & Yeaman, C. (1989) A quantitative solid-phase assay for identifying radiolabeled glycosaminoglycans in crude cell extracts. *Anal Biochem*, 179, 361-5.
- Reardon, A.J., Le Goff, M., Briggs, M.D., McLeod, D., Sheehan, J.K., Thornton, D.J., & Bishop, P.N. (2000) Identification in vitreous and molecular cloning of opticin, a novel member of the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 275, 2123-9.
- Reinmuth, N., Fan, F., Liu, W., Parikh, A.A., Stoeltzing, O., Jung, Y.D., Bucana, C.D., Radinsky, R., Gallick, G.E., & Ellis, L.M. (2002) Impact of insulin-like growth factor receptor-I function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon cancer. *Lab Invest*, 82, 1377-89.
- Ricciardelli, C. & Rodgers, R.J. (2006) Extracellular matrix of ovarian tumors. *Semin Reprod Med*, 24, 270-82.
- Rosenberg, L.C., Choi, H.U., Tang, L.H., Johnson, T.L., Pal, S., Webber, C., Reiner, A., & Poole, A.R. (1985) Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *J Biol Chem*, 260, 6304-13.
- Rougier, P. & Mitry, E. (2003) Epidemiology, treatment and chemoprevention in colorectal cancer. *Ann Oncol*, 14 Suppl 2, ii3-5.

- Roux, P.P. & Blenis, J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 320-44.
- Rustgi, A.K. (2007) The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*, 21, 2525-38.
- Saeki, T., Salomon, D.S., Johnson, G.R., Gullick, W.J., Mandai, K., Yamagami, K., Moriwaki, S., Tanada, M., Takashima, S., & Tahara, E. (1995) Association of epidermal growth factor-related peptides and type I receptor tyrosine kinase receptors with prognosis of human colorectal carcinomas. *Jpn J Clin Oncol*, 25, 240-9.
- Saksela, O., Moscatelli, D., Sommer, A., & Rifkin, D.B. (1988) Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol*, 107, 743-51.
- Salmivirta, M. & Jalkanen, M. (1995) Syndecan family of cell surface proteoglycans: developmentally regulated receptors for extracellular effector molecules. *Experientia*, 51, 863-72.
- Salmivirta, M., Lidholt, K., & Lindahl, U. (1996) Heparan sulfate: a piece of information. *Faseb J*, 10, 1270-9.
- Salti, G.I., Grewal, S., Mehta, R.R., Das Gupta, T.K., Boddie, A.W., Jr., & Constantinou, A.I. (2000) Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells. *Eur J Cancer*, 36, 796-802.
- Sanderson, P.N., Huckerby, T.N., & Nieduszynski, I.A. (1987) Conformational equilibria of alpha-L-iduronate residues in disaccharides derived from heparin. *Biochem J*, 243, 175-81.
- Sanderson, R.D. (2001) Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin Cell Dev Biol*, 12, 89-98.
- Sarkar, F.H. & Li, Y. (2002) Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev*, 21, 265-80.
- Sarkar, F.H. & Li, Y. (2004) The role of isoflavones in cancer chemoprevention. *Front Biosci*, 9, 2714-24.

- Sasaki, M., Kashima, M., Ito, T., Watanabe, A., Sano, M., Kagaya, M., Shioya, T., & Miura, M. (2000) Effect of heparin and related glycosaminoglycan on PDGF-induced lung fibroblast proliferation, chemotactic response and matrix metalloproteinases activity. *Mediators Inflamm*, 9, 85-91.
- Sasisekharan, R. & Venkataraman, G. (2000) Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr Opin Chem Biol*, 4, 626-31.
- Saunders, M. & Iveson, T. (2006) Management of advanced colorectal cancer: state of the art. *Br J Cancer*, 95, 131-8.
- Schindler, A.E. (2007) Long-term use of progestogens: colon adenoma and colon carcinoma. *Gynecol Endocrinol*, 23 Suppl 1, 42-4.
- Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103, 211-25.
- Schmalfeldt, M., Dours-Zimmermann, M.T., Winterhalter, K.H., & Zimmermann, D.R. (1998) Versican V2 is a major extracellular matrix component of the mature bovine brain. *J Biol Chem*, 273, 15758-64.
- Schneider, M.R. & Wolf, E. (2009) The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol*, 218, 460-6.
- Schuger, L., Johnson, G.R., Gilbride, K., Plowman, G.D., & Mandel, R. (1996) Amphiregulin in lung branching morphogenesis: interaction with heparan sulfate proteoglycan modulates cell proliferation. *Development*, 122, 1759-67.
- Seidler, D.G. & Dreier, R. (2008) Decorin and its galactosaminoglycan chain: extracellular regulator of cellular function? *IUBMB Life*, 60, 729-33.
- Serrano, D., Lazzeroni, M., & Decensi, A. (2004) Chemoprevention of colorectal cancer: an update. *Tech Coloproctol*, 8 Suppl 2, s248-52.
- Seya, T., Tanaka, N., Shinji, S., Yokoi, K., Koizumi, M., Teranishi, N., Yamashita, K., Tajiri, T., Ishiwata, T., & Naito, Z. (2006) Lumican expression in advanced colorectal cancer with nodal metastasis correlates with poor prognosis. *Oncol Rep*, 16, 1225-30.
- Shworak, N.W., Shirakawa, M., Mulligan, R.C., & Rosenberg, R.D. (1994) Characterization of ryudocan glycosaminoglycan acceptor sites. *J Biol Chem*, 269, 21204-14.

- Siegel, P.M. & Massague, J. (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*, 3, 807-21.
- Sirko, S., von Holst, A., Wizenmann, A., Gotz, M., & Faissner, A. (2007) Chondroitin sulfate glycosaminoglycans control proliferation, radial glia cell differentiation and neurogenesis in neural stem/progenitor cells. *Development*, 134, 2727-38.
- Skidmore, M.A., Guimond, S.E., Rudd, T.R., Fernig, D.G., Turnbull, J.E., & Yates, E.A. (2008) The activities of heparan sulfate and its analogue heparin are dictated by biosynthesis, sequence, and conformation. *Connect Tissue Res*, 49, 140-4.
- Sommarin, Y., Wendel, M., Shen, Z., Hellman, U., & Heinegard, D. (1998) Osteoadherin, a cell-binding keratan sulfate proteoglycan in bone, belongs to the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 273, 16723-9.
- Sridhar, S.S. & Goodwin, P.J. (2009) Insulin-insulin-like growth factor axis and colon cancer. *J Clin Oncol*, 27, 165-7.
- Stern, R., Asari, A.A., & Sugahara, K.N. (2006) Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol*, 85, 699-715.
- Stuhlmeier, K.M. (2006) Aspects of the biology of hyaluronan, a largely neglected but extremely versatile molecule. *Wien Med Wochenschr*, 156, 563-8.
- Su, G., Meyer, K., Nandini, C.D., Qiao, D., Salamat, S., & Friedl, A. (2006) Glypican-1 is frequently overexpressed in human gliomas and enhances FGF-2 signaling in glioma cells. *Am J Pathol*, 168, 2014-26.
- Sugahara, K. & Kitagawa, H. (2000) Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr Opin Struct Biol*, 10, 518-27.
- Sugahara, K. & Kitagawa, H. (2002) Heparin and heparan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life*, 54, 163-75.
- Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K., & Kitagawa, H. (2003) Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol*, 13, 612-20.

- Sun, Y. & Sinicropo, F.A. (2005) Selective inhibitors of MEK1/ERK44/42 and p38 mitogen-activated protein kinases potentiate apoptosis induction by sulindac sulfide in human colon carcinoma cells. *Mol Cancer Ther*, 4, 51-9.
- Syrokou, A., Tzanakakis, G., Tsegenidis, T., Hjerpe, A., & Karamanos, N.K. (1999) Effects of glycosaminoglycans on proliferation of epithelial and fibroblast human malignant mesothelioma cells: a structure-function relationship. *Cell Prolif*, 32, 85-99.
- Tammi, R.H., Kultti, A., Kosma, V.M., Pirinen, R., Auvinen, P., & Tammi, M.I. (2008) Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin Cancer Biol*, 18, 288-95.
- Tanaka, T. (2009) Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog*, 8, 5.
- Taylor, K.R. & Gallo, R.L. (2006) Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *Faseb J*, 20, 9-22.
- Thamilselvan, V., Li, W., Sumpio, B.E., & Basson, M.D. (2002) Sphingosine-1-phosphate stimulates human Caco-2 intestinal epithelial proliferation via p38 activation and activates ERK by an independent mechanism. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 38, 246-53.
- Theocharis, A.D. (2002) Human colon adenocarcinoma is associated with specific post-translational modifications of versican and decorin. *Biochim Biophys Acta*, 1588, 165-72.
- Tong, C., Yin, Z., Song, Z., Dockendorff, A., Huang, C., Mariadason, J., Flavell, R.A., Davis, R.J., Augenlicht, L.H., & Yang, W. (2007) c-Jun NH2-terminal kinase 1 plays a critical role in intestinal homeostasis and tumor suppression. *Am J Pathol*, 171, 297-303.
- Tong, W.G., Ding, X.Z., Talamonti, M.S., Bell, R.H., & Adrian, T.E. (2005) LTB4 stimulates growth of human pancreatic cancer cells via MAPK and PI-3 kinase pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 335, 949-56.
- Toole, B.P. (2002) Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology*, 12, 37R-42R.

- Trowbridge, J.M. & Gallo, R.L. (2002) Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology*, 12, 117R-25R.
- Turnbull, J., Powell, A., & Guimond, S. (2001) Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol*, 11, 75-82.
- Turnbull, J.E. & Gallagher, J.T. (1991) Distribution of iduronate 2-sulphate residues in heparan sulphate. Evidence for an ordered polymeric structure. *Biochem J*, 273 (Pt 3), 553-9.
- Tzanakakis, G.N., Hjerpe, A., & Karamanos, N.K. (1997) Proteoglycan synthesis induced by transforming and basic fibroblast growth factors in human malignant mesothelioma is mediated through specific receptors and the tyrosine kinase intracellular pathway. *Biochimie*, 79, 323-32.
- Ullman, T.A. (2005) Preventing neoplastic progression in ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol*, 39, S66-9.
- Varki, A. & Varki, N.M. (2001) P-selectin, carcinoma metastasis and heparin: novel mechanistic connections with therapeutic implications. *Braz J Med Biol Res*, 34, 711-7.
- Volpi, N., Bolognani, L., Conte, A., & Petrini, M. (1993) Effects of chondroitin sulfates with different structures on leukemia cells: U-937 cell proliferation and differentiation. *Leuk Res*, 17, 789-98.
- Volpi, N., Petrini, M., Conte, A., Valentini, P., Venturelli, T., Bolognani, L., & Ronca, G. (1994) Effects of glycosaminoglycans on U-937 leukemia cell proliferation and differentiation: structure-function relationship. *Exp Cell Res*, 215, 119-30.
- Vongchan, P., Warda, M., Toyoda, H., Toida, T., Marks, R.M., & Linhardt, R.J. (2005) Structural characterization of human liver heparan sulfate. *Biochim Biophys Acta*, 1721, 1-8.
- Wadhwa, S., Embree, M.C., Bi, Y., & Young, M.F. (2004) Regulation, regulatory activities, and function of biglycan. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 14, 301-15.

- Warren, R.S., Yuan, H., Matli, M.R., Ferrara, N., & Donner, D.B. (1996) Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem*, 271, 29483-8.
- Wegrowski, Y. & Maquart, F.X. (2004) Involvement of stromal proteoglycans in tumour progression. *Crit Rev Oncol Hematol*, 49, 259-68.
- Welsh, D.J., Scott, P.H., & Peacock, A.J. (2006) p38 MAP kinase isoform activity and cell cycle regulators in the proliferative response of pulmonary and systemic artery fibroblasts to acute hypoxia. *Pulm Pharmacol Ther*, 19, 128-38.
- Westergren-Thorsson, G., Persson, S., Isaksson, A., Onnervik, P.O., Malmstrom, A., & Fransson, L.A. (1993) L-iduronate-rich glycosaminoglycans inhibit growth of normal fibroblasts independently of serum or added growth factors. *Exp Cell Res*, 206, 93-9.
- Whitelock, J.M., Melrose, J., & Iozzo, R.V. (2008) Diverse cell signaling events modulated by perlecan. *Biochemistry*, 47, 11174-83.
- Wight, T.N. (2002) Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 617-23.
- Wight, T.N., Kinsella, M.G., & Qwarnstrom, E.E. (1992) The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr Opin Cell Biol*, 4, 793-801.
- Wilkinson, N. & Scott-Conner, C.E. (2008) Surgical therapy for colorectal adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am*, 37, 253-67, ix.
- Wilkinson, M.C., Gardner, M.J., Gould, P.W., Taylor, B.A. and Fernig, D.G. (1993) Normal and malignant human colonic mucosa contain acidic and basic fibroblast growth factors. *Int J Oncol*, 3, 933-936.
- Wilson, A.J., Byun, D.S., Nasser, S., Murray, L.B., Ayyanar, K., Arango, D., Figueroa, M., Melnick, A., Kao, G.D., Augenlicht, L.H., & Mariadason, J.M. (2008) HDAC4 promotes growth of colon cancer cells via repression of p21. *Mol Biol Cell*, 19, 4062-75.
- Wolpin, B.M. & Mayer, R.J. (2008) Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 134, 1296-310.

- Woods, A. (2001) Syndecans: transmembrane modulators of adhesion and matrix assembly. *J Clin Invest*, 107, 935-41.
- Wrana, J.L. (2000) Crossing Smads. *Sci STKE*, 2000, RE1.
- Wright, T.C., Jr., Castellot, J.J., Jr., Petitou, M., Lormeau, J.C., Choay, J., & Karnovsky, M.J. (1989) Structural determinants of heparin's growth inhibitory activity. Interdependence of oligosaccharide size and charge. *J Biol Chem*, 264, 1534-42.
- Wu, W.K., Shin, V.Y., Ye, Y.N., Wong, H.P., Huang, F.Y., Hui, M.K., Lam, E.K., & Cho, C.H. (2006) Heparin increases human gastric carcinoma cell growth. *Anticancer Res*, 26, 439-43.
- Wu, Y.J., La Pierre, D.P., Wu, J., Yee, A.J., & Yang, B.B. (2005) The interaction of versican with its binding partners. *Cell Res*, 15, 483-94.
- Xiao, G.H., Jeffers, M., Bellacosa, A., Mitsuuchi, Y., Vande Woude, G.F., & Testa, J.R. (2001) Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 247-52.
- Xie, L.Q., Yu, J.P., & Luo, H.S. (2004) Expression of estrogen receptor beta in human colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 10, 214-7.
- Xu, R., Zhou, B., Fung, P.C., & Li, X. (2006) Recent advances in the treatment of colon cancer. *Histol Histopathol*, 21, 867-72.
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., & Ornitz, D.M. (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*, 64, 841-8.
- Yip, G.W., Ferretti, P., & Copp, A.J. (2002) Heparan sulphate proteoglycans and spinal neurulation in the mouse embryo. *Development*, 129, 2109-19.
- Yu, L., Quinn, D.A., Garg, H.G., & Hales, C.A. (2006) Gene expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and effect of heparin on their expression in mice with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*, 345, 1565-72.

- Zafiroopoulos, A. & Tzanakakis, G.N. (2008) Decorin-mediated effects in cancer cell biology. *Connect Tissue Res*, 49, 244-8.
- Zhai, W., Eynott, P.R., Oltmanns, U., Leung, S.Y., & Chung, K.F. (2004) Mitogen-activated protein kinase signalling pathways in IL-1 beta-dependent rat airway smooth muscle proliferation. *Br J Pharmacol*, 143, 1042-9.
- Zigrino, P., Loffek, S., & Mauch, C. (2005) Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochimie*, 87, 321-8.
- Zimbalist, E.H. & Plumer, A.R. (1995) Genetic and environmental factors in colorectal carcinogenesis. *Dig Dis*, 13, 365-78.
- Zou, X.H., Foong, W.C., Cao, T., Bay, B.H., Ouyang, H.W., & Yip, G.W. (2004) Chondroitin sulfate in palatal wound healing. *J Dent Res*, 83, 880-5.
- Zvibel, I., Brill, S., Halpern, Z., Moskovitz, S., Yayon, A., & Papa, M. (2001) Soluble and matrix-associated heparan sulfate proteoglycans increase expression of erb-B2 and erb-B3 in colon cancer cell lines. *Int J Cancer*, 91, 316-21.
- Zvibel, I., Brill, S., Halpern, Z., & Papa, M. (1998) Hepatocyte extracellular matrix modulates expression of growth factors and growth factor receptors in human colon cancer cells. *Exp Cell Res*, 245, 123-31.
- Zvibel, I., Brill, S., Halpern, Z., & Papa, M. (1999) Amphiregulin and hepatocyte-derived extracellular matrix regulate proliferation and autocrine growth factor expression in colon cancer cell lines of varying liver-colonizing capability. *J Cell Biochem*, 76, 332-40.
- Zvibel, I., Halpern, Z., & Papa, M. (1998) Extracellular matrix modulates expression of growth factors and growth-factor receptors in liver-colonizing colon-cancer cell lines. *Int J Cancer*, 77, 295-301.

Παράρτημα

Βιογραφικό Σημείωμα

Προσωπικά Στοιχεία

Όνοματεπώνυμο: Χατζηνικολάου Γεωργία

Ημερομηνία Γέννησης: 5 Ιανουαρίου 1980
Εθνικότητα: Ελληνική

Διεύθυνση Κατοικίας: Σκαλάνι
Ηράκλειο Κρήτης
Ελλάδα
71500

Τηλέφωνο Κατοικίας: 2810731437
Κινητό: 6947278780
Ηλεκτρονική διεύθυνση: xatz.georgia@hotmail.com

Σπουδές

2006 - σήμερα Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής, Ιατρική σχολή,
Πανεπιστήμιο Κρήτης

2000 - 2005 Πτυχίο Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Βαθμός πτυχίου: 7,98/ 10

Εργαστηριακή Εμπειρία

2004 – 2005 Εργαστήριο Ανοσοβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών
Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Εκπόνηση Πτυχιακής Εργασίας
Θέμα: Ρόλος της α1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP) στο μηχανισμό
επαγωγής πειραματικής αρθρίτιδας- Θεραπεία γονιδίου

Ιούνιος-Αύγουστος 2004 Εργαστήριο Μοριακής Τοξικολογίας, Τομέας Μορφολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εκπόνηση Πρακτικής Άσκησης (Πρόγραμμα ΕΠΕΑΕΚ)
Θέμα: Μελέτη του ρόλου του γονιδίου αποτοξίνωσης του κυττάρου,
παραοξονάση/αρυλεστεράση1 (PON1) στην ανάπτυξη της νόσου
του Parkinson και του καρκίνου του πνεύμονα σε πληθυσμό
εκτεθειμένο ή μη σε φυτοφάρμακα

Παρουσιάσεις σε συνέδρια & Poster

- Καραναστάση Σ., Χατζηνικολάου Γ., Αρσενάκης Μ., Σκούρας Ζ., Γιάγκου Μ. Ρόλος του γονιδίου της α1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP) στο μηχανισμό επαγωγής αρθρίτιδας στους αρουραίους- Θεραπεία γονιδίου. 27^ο Επιστημονικό Συνέδριο, Ελληνική Εταιρία Βιολογικών Επιστημών, Μάιος 2005, Ναύπλιο, Ελλάδα.
- Chatzinikolaou G., Nikitovic D., Tzanakakis G.N. *In vitro* effects of genistein on synthesis and distribution of GAGs by colon carcinoma cell lines. FECTS XXth & ISMB meeting, Oulu, Finland, July 1-5, 2006 (Abstract B3338).
- Χατζηνικολάου Γ., Νικίτοβιτς Ν., Ζαφειρόπουλος Α., Τζανακάκης Γ. Επίδραση της γενιστεΐνης στην σύνθεση και την κατανομή των γλυκοζαμινογλυκανών/ πρωτεογλυκανών σε δύο κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέως εντέρου. 3^ο Πανελλήνιο Διαιτητικό Αντικαρκινικό Συνέδριο, Αθήνα 26-29 Απριλίου 2007.
- Chatzinikolaou G., Nikitovic D., Tzanakakis G.N. Effects of glycosaminoglycans/ proteoglycans on the mitogenic function of FGF-2 in HT-29 and HCT116 human colon cancer cell lines. 9 Annual Meeting of the Hellenic Research Club for Connective Tissue & Matrix Biology, Athens 10-12 May 2007.
- Chatzinikolaou G., Nikitovic D., Berdiaki A., Karamanos N.K., Tzanakakis G.N. Protein tyrosine kinase and estrogen receptor dependent pathways regulate the synthesis and distribution of glycosaminoglycans/proteoglycans produced by two human colon cancer cell lines. FEBS Advanced Lecture Course, Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets, Patras, Greece, May 21-26, 2007. P 69
- Chatzinikolaou G., Nikitovic D., Tzanakakis G.N. The effects of glycosaminoglycans/ proteoglycans on FGF-2 induced growth on two human colon cancer cell lines. 32nd FEBS Congress Molecular Machines, Vienna, Austria, July 7-12, 2007. F1-65
- Chatzinikolaou G., Nikitovic D., Tzanakakis GN. Heparin exogenously added enhances human colon cancer cell growth. 59th National Conference of Biochemistry and Molecular Biology Athens 7-9 December 2007. (Περίληψη PP125)
- Chalkiadaki G., Nikitovic D., Fthenou E., Chatzinikolaou G., Tzanakakis GN. Basic-FGF mediates M5 melanoma cells adhesion by regulating syndecan expression. 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, Athens, Greece, June 28-July 3, 2008
- Zafiroopoulos A., Chatzinikolaou G., Nikitovic D., Katonis P., Tsatsakis A., Karamanos NK and Tzanakakis GN. Decorin-induced growth inhibition is overcome through protracted expression and activation of EGFRs in osteosarcoma cells. XXIst FECTS Meeting, Marseille, France, July 9-13, 2008.

- Chatzinikolaou G., Nikitovic D., Frebus M., Karamanos NK., Tzanakakis GN. Heparin induces human colon cancer cell proliferation via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. XXIst FECTS Meeting, Marseille, France, July 9-13, 2008.
- Chalkiadaki G., Nikitovic D., Berdiaki A., Fthenou E., Chatzinikolaou G., Tzanakakis GN. FGF-2 mediates melanoma cell adhesion and migration through a FAK dependent mechanism. 34nd FEBS Congress Life's Molecular Interactions, Prague, Czech Republic, July 4-9, 2009.
- Chatzinikolaou G., Nikitovic D., Berdiaki A., Zafiropoulos A., Tzanakakis GN. Heparin-induced proliferation on human colon cancer cell lines is mediated through p38 mitogen-activated protein kinase. 34nd FEBS Congress Life's Molecular Interactions, Prague, Czech Republic, July 4-9, 2009.
- Chatzinikolaou G., Nikitovic D., Berdiaki A., Zafiropoulos A., Chalkiadaki G., Tzanakakis GN. Heparin affects colon cancer cell distribution through p38 mitogen-activated protein kinase. FEBS Advanced Lecture Course, Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets, Patras, Greece, July 11-16, 2009.

Δημοσιεύσεις

- Chatzinikolaou G., Nikitovic D., Stathopoulos EN., Velegrakis GA., Karamanos NK., Tzanakakis GN. Protein tyrosine kinase and estrogen receptor dependent pathways regulate the synthesis and distribution of glycosaminoglycans / proteoglycans produced by two human colon cancer cell lines. *Anticancer Res* 27: 4101-4106, 2007.
- Zafiropoulos A., Fthenou E., Chatzinikolaou G., Tzanakakis GN. Glycosaminoglycans and PDGF signaling in mesenchymal cells. *Connective Tissue Research* 49: 153-156, 2008.
- Chatzinikolaou G., Nikitovic D., Asimakopoulou A., Tsatsakis A., Karamanos NK., Tzanakakis GN. Heparin a unique stimulator of human colon cancer cells' growth. *IUBMB Life* 60: 333-340, 2008.
- Chatzinikolaou G., Nikitovic D., Berdiaki A., Zafiropoulos A., Katonis P., Karamanos NK., Tzanakakis GN. Heparin regulates colon cancer cell growth through p38 mitogen activated protein kinase signalling. *Cell Prolif* (In press).

Λοιπά Προσόντα

- Μέλος της οργανωτικής επιτροπής στο 8^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ομάδας Έρευνας Συνδετικού Ιστού και Εξωκυττάριου Χώρου, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο-Κρήτης (14-15 Απριλίου 2006).
- Πτυχίο αγγλικών: Lower Certificate in English, University of Cambridge.
- Πτυχίο γαλλικών: Certificat de Langue Francaise, Palso.
- Άριστη γνώση ιταλικών λόγω τετραετούς φοίτησης στο Πανεπιστήμιο «La Sapienza», Ρώμη.

Δημοσιεύσεις

Protein Tyrosine Kinase and Estrogen Receptor-dependent Pathways Regulate the Synthesis and Distribution of Glycosaminoglycans/Proteoglycans Produced by Two Human Colon Cancer Cell Lines

G. CHATZINIKOLAOU¹, D. NIKITOVIC¹, E.N. STATHOPOULOS¹,
G.A. VELEGRAKIS², N.K. KARAMANOS³ and G.N. TZANAKAKIS¹

¹Department of Histology, Division of Morphology, School of Medicine, University of Crete, 71110 and

²Department of Otolaryngology, University Hospital of Crete, 71110 Heraklion,

³Department of Chemistry, University of Patras, 26110 Patras, Greece

Abstract. *The soy isoflavone genistein can affect cell metabolism by specifically inhibiting protein tyrosine kinase (PTK) and/or interacting with the estrogen receptors (ERs). Glycosaminoglycans (GAG)/proteoglycans (PG) may participate in tumor development and progression. The synthesis of GAG by two human colon cancer cell lines, HT-29 and SW-1116, and the effects of genistein on their production and distribution between culture medium and cell membrane were studied. The mitogenic activity of genistein on both cell lines growth was also examined. Metabolic labeling, sensitive high pressure liquid chromatography (HPLC) techniques and fluorometric cell proliferation assays were utilized. The results demonstrate that both estrogen receptor β -positive (ER β +) cancer cell lines produced hyaluronan (HA), both extracellular and membrane-associated galactosaminoglycans (GalAG) and heparan sulfate (HS), with the HT-29 cells producing all GAG fractions at significantly higher rates. The observed dose-dependent inhibitory effect of genistein on the synthesis of both secreted and cell-associated GAG/PG by the SW-1116 cells, as well as on their growth, was suggestive of a PTK mechanism. On the other hand, the synthesis of GAGs/PGs by HT-29 cells in the presence of genistein was dependent on their type and localization which implies the active participation of the ERs, which was further supported by the observed growth stimulation at low concentrations of genistein.*

Abbreviations: (GAGs) glycosaminoglycans; (PGs) proteoglycans.

Correspondence to: G.N. Tzanakakis, Department of Histology, Division of Morphology, School of Medicine, University of Crete, 71110 Heraklion, Greece. Tel/Fax: +302810394719, e-mail: tzanakak@med.uoc.gr

Key Words: Genistein, glycosaminoglycans, proteoglycans, colon cancer cell lines.

Colorectal carcinoma is one of the leading causes of cancer death in both sexes in Western countries (1) and the third most common type of cancer in the U.S.A. (2). Previous studies have shown that genomic instability (3), as well as environmental factors such as diet and hormones, can be correlated to the risk of colon cancer (4). The prognosis for colonic malignancies is usually poor, if not diagnosed at an early stage, as this cancer type is characterized by a high metastatic potential and recurrence rate (5). Tumor invasion and metastasis formation are a major cause of treatment failure and death in cancer patients (6) and are correlated with the ability of cancer cells to degrade the surrounding extracellular matrix (ECM) and basal membrane (7, 8). The ECM is a complex network mainly consisting of fibrillar collagen, fibronectin, laminin, vitronectin and proteoglycans (PG), the content of which affects various cellular functions (9).

Proteoglycans (PGs) are macromolecules composed of linear sulfated glycosaminoglycan (GAG) chains covalently attached to a protein core and they can be located in the ECM, associated with the cell membrane or in intracellular granules (10). GAG/PG are able to interact with growth factors and/or growth factor receptors and through these interactions may affect various cellular functions such as proliferation, differentiation or migration (11). Furthermore, quantitative and qualitative changes in GAGs/PGs production have been suggested to have a role in the development of some types of cancer, such as osteosarcoma, melanoma, breast carcinoma and colon adenocarcinoma (9).

The major soy isoflavone genistein is an active growth inhibitor for many tumor types including colon cancer, as has been previously demonstrated in both *in vitro* and *in vivo* studies (12, 13). Generally, its actions have been associated with a G2/M cell cycle arrest (14), although genistein has also

been suggested to induce arrest at the G0/G1 phase in some cell lines (15). On the other hand, at low concentrations (1-2 μ M) genistein may also increase colon cancer cell proliferation (16). Moreover, previous reports have demonstrated that, in addition to proliferation, genistein affects the biosynthesis of GAG/PG in various human cancer cell lines (17, 18) and that changes in PG/GAG levels may be correlated to cell proliferation rates (19).

Several possible mechanisms of genistein action in tumor cells have been proposed. Thus it has been demonstrated that genistein specifically inhibits protein tyrosine kinases (PTKs) (20), interacts with the estrogen receptors (ERs), (21), has antioxidant activities and inhibits DNA topoisomerase II (16).

The possible effects of genistein on the synthesis of GAGs/PGs by human colon cancer cell lines have not, to our knowledge, been examined. The purpose of this study therefore was to characterize the types of GAG synthesized by the two colon carcinoma cell lines, to examine the effects of genistein on the synthesis and distribution of GAG/PG between the culture medium and the cell membrane as well as to investigate the effects of genistein on their proliferation.

Materials and Methods

Materials. Fetal bovine serum (FBS) and RPMI-1640 medium were from Gibco-Invitrogen (Paisley, UK) whereas penicillin, streptomycin, gentamycin, amphotericin B and L-glutamine were all obtained from Biochrom KG (Berlin, Germany). D-glucosamine hydrochloride-[6-³H (N)] was provided by DuPont de Nemours (Dreieich, Germany). Genistein, bovine insulin, CS-4-sulfated (CSA) whale cartilage (grade I), heparin lyase II (heparinase II, no EC number) from *Flavobacterium heparinum*, chondroitinase ABC from *Proteus vulgaris* (EC4.2.2.4), chondroitinase AC II from *Athrobacter aurescens* (EC4.2.2.5), chondro-4-(EC 3.16/9) and -6-sulfatases (EC3.1.6.10) from *Proteus vulgaris* and 2 x crystallised papain (EC3.4.22.2) were supplied from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Heparin lyases III and I from *Flavobacterium heparinum* (EC 4.2.2.7 and EC 4.2.2.8, respectively) and keratanase II was obtained by Seikagaku Kogyo Co. (Tokyo, Japan). The fluorometric CyQUANT cell proliferation Assay Kit was obtained from Molecular Probes (Eugene, USA). Other chemicals used were of the best available grade.

Cell cultures. The HT-29 and SW-1116 human colon adenocarcinoma and MCF-7 breast cancer cell lines were obtained from ATCC. The HT-29 and SW-1116 cells were grown in a humidified atmosphere at 37°C, 5% (v/v) CO₂ in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and 0.5% gentamicin. The MCF-7 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 4 mM L-glutamine, 2 g/l sodium bicarbonate, 100 IU/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 0.01 mg/ml bovine insulin. The cells were cultured in 75 mm² tissue culture flasks and the culture medium was changed every other day. Confluent cultures were first washed with phosphate-buffered saline (PBS) and then harvested by trypsinisation with 0.23% (w/v) trypsin in PBS containing 0.1% (w/v) Na₂ EDTA for

15 minutes at 37°C and 1 vol. of medium was added to terminate enzymic activity. Centrifugation at 200 xg for 15 min was used for the collection of the cells and they were counted utilizing Hank's balance solution, using a Coulter particle counter (Hialeah, FL, USA). Prior to RNA and protein extraction the cells were serum deprived for 24 and 48 hours, respectively.

The effects of genistein on GAG synthesis were examined by treating the cells for 48 hours with 10 or 30 μ g/ml of genistein in serum free medium. The metabolic labeling of GAGs was performed by supplementing the cultures with D-glucosamine hydrochloride-[6-³H(N)] (10 μ Ci/ml) for 16 hours before the end point of the experiment (22).

Fractionation and determination of GAGs. Cell-associated PGs were extracted with 50mM Tris-HCl pH 8.0 containing 1% (v/v) Triton X-100 and 0.1% (w/v) NaCl and phenylmethanesulphonyl fluoride proteinase inhibitor, benzamidine hydrochloride and hexanoic acid at a final concentration of 2, 5 and 50 mM, respectively (23). The extraction was carried out for 2 h under mild shaking at 4°C, using 1 ml of the extraction solution per 10⁶ cells. The culture medium was concentrated to 1:100 of its original volume on a YM-10 Amicon membrane, Millipore (Billirica, USA). The precipitation of PGs was achieved by the addition of 4 vol of 95 % (v/v) ethanol containing 2.5 % (w/v) sodium acetate. To ensure complete precipitation of the PGs, 40 μ l CSA (0.2 mg/L) was added as a carrier. The solutions were left for 30 minutes at 4°C and centrifuged in a Beckman microfuge (10,000 xg for 10 minutes). The precipitates of PGs were digested with the proteolytic enzyme papain at 65°C for 60 minutes using 2 units/ml in 100 mM phosphate buffer pH 7.0 containing 5 mM Na₂ EDTA and 5 mM L-cysteine hydrochloride (22). The liberated GAG were precipitated by the addition of 10 vol 1 % (w/v) cetylpyridium chloride (CPC) and the solution was left for 60 minutes at room temperature. Following centrifugation at 10,000 xg for 10 minutes, the pellets obtained were dissolved in 500 μ l of 60 (v/v) propanol-1 containing 4% (w/v) CPC (24). Re-precipitation of the liberated GAGs was carried out by the addition of 6 vol. of 95 % (v/v) ethanol containing 2.5% (w/v) sodium acetate. The precipitates were then washed with ethanol and left to dry.

In order to identify the HA and GalAGs (chondroitin sulfate, dermatan sulfate), the GAG preparation was dissolved in water and digested with an equi-unit mixture (0.2 units/mL) of chondroitinases ABC, AC II and chondro-4- and -6-sulfatases (25). The removal of the chondroitinase-resistant GAGs (heparan sulphate (HS), keratan sulphate (KS) was carried out by ethanol precipitation, and aliquots from the supernatant were analysed by ion-suppression high-pressure liquid chromatography (HPLC) for hyaluronan (HA)- and galactosaminoglycan (GalAG)-derived Δ -disaccharides using radiochemical detection (26) as well as by reversed polarity high pressure capillary electrophoresis (HPCE) (23).

HS was determined in the chondroitinase-resistant GAGs recovered by the ethanol precipitate after treatment with chondroitinases and chondro-sulfatases. This was achieved by removing KS by digestion with keratanase II (27) followed by ethanol precipitation. Another digestion step was performed with all heparin lyases I, II and III in combination in 20 mM acetate buffer pH 7.0, containing 1 μ mol calcium acetate at 37°C for 90 min (28). In all cases, the amount of GAGs was determined from the integrated peak area of the GAG-derived Δ -disaccharides.

RNA isolation and polymerase chain reactions (PCR). Total ribonucleic acid was isolated with the TRIzol method Gibco-Invitrogen (Paisley, UK) according to the manufacturer's instructions. One μg of total RNA was used for cDNA synthesis using the ThermoScript™ reverse transcription-PCR (RT-PCR) System (Invitrogen, Paisley, UK). Specific oligonucleotide primer pairs were designed for ER α (F: AATTCAGATAATCGACGCCAG, R: GTGTTTCAACATTCTCCCTCCTC), ER β (F: GTCCATCGCCA GTTATCACATC, R: GCCTTACATCCTTACACAGA) and GAPDH (F: GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA, R: GTCATT GATGGCAACAATATCCACT) using published literature or sequence information contained in the National Center for Biotechnology Information GenBank database with OLIGO 4.0 software. Reactions were performed in 20 μl aliquots using the Platinum Taq DNA polymerase ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Proliferation assays. Exponentially growing cells from non-confluent cultures were harvested and seeded in a flat-bottom 96-well black plate (Corning, USA) at a density of 10×10^3 HT-29 or SW-1116 cells per well in 0.2 ml of RPMI (10% FCS). Prior to all growth assays, the cells were serum starved for 24 h and the treatment was performed in 0% FCS medium. Genistein was added at concentrations of 1, 10 and 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of culture medium and the cells were incubated for 48 h. After treatment, the number of living cells was determined using the fluorometric CyQUANT cell proliferation Assay Kit (Molecular Probes-Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

Statistical analysis. The grade of dependence of GAG synthesis on genistein was evaluated by the use of the *t*-test and the one-way completely randomized variance analysis (ANOVA) using the Microcal Origin (version 5.0) software. The independence/dependence between characteristics was regarded as significant at $p \leq 0.05$.

Results

Synthesis and distribution of GAG. The analyses of the metabolically [^3H]-labelled GAG/PG synthesized by the colon HT-29 and SW-1116 cell lines demonstrated that they produce HA, GalAG and HS (Figure 1A-E). As presented in Table I, HT-29 cells produced 34% higher amounts of total GAG as compared to SW-1116 cells indicating that the two colon cancer cell lines had different biosynthetic patterns. Specifically the HT-29 cells synthesized up to 300% more HA and at the cell membrane retained 250% higher amounts of GalAG as compared to the SW-1116 cells (Table I). Furthermore, major differences were noted in the distribution pattern of the HS fraction between the HT-29 and SW-1116 cells. HS was mainly retained membrane by the HT-29 cells (57%) whereas the SW-1116 cells secreted and retained approximately equal amounts of this GAG type in the cell. On the other hand, GalAG were mainly secretory products in both the HT-29 (62%) and SW-1116 (84%) cells, whereas both cell lines secreted into the medium more than 93% of the HA produced.

Table I. Levels and distribution of GAGs between the culture medium and the cell layer in the human colon cancer HT-29 and SW-1116 cells^a.

| Cell line | Fraction | HA | GalAGs | HS |
|-----------|---------------|--------------------------|------------|-------------|
| HT-29 | Medium | 14373 (>93) ^b | 11330 (62) | 80950 (43) |
| | Cell fraction | - | 4383 (38) | 106610 (57) |
| SW-1116 | Medium | 4494 (>93) | 11090 (84) | 61790 (49) |
| | Cell fraction | - | 1766 (16) | 64641 (51) |

^aLevels are expressed as [^3H]-incorporated radioactivity in GAGs;

^bThe percent distribution of GAG is given in parenthesis.

Effects of genistein on the synthesis of secreted and cell-associated GAG/PG. Genistein affected the GAGs/PG synthesis of the HT-29 cells in a manner specific to the GAG type and distribution. Thus, when genistein was present at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the HT-29 cells significantly increased the synthesis of exported HS, whereas the synthesis of HA and GalAG secreted to the medium was not affected (Figure 1A-E). The cell-associated HS production was down-regulated at the same concentration of genistein. Interestingly, when genistein was present at 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the synthesis of secreted HS was significantly suppressed in comparison to that with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ genistein (Figure 1D), whereas the synthesis of total GalAG was increased (Figure 1B and C).

The GAG production of the SW-1116 cells was affected in a different manner by genistein. The synthetic rates of HA as well as of both extracellularly-secreted and cell-associated HS were dose-dependently suppressed (Figure 1A, D and E). The production of GalAG destined for export was suppressed only at the higher concentration of genistein (Figure 1B) whereas the synthesis of cell-associated GalAG was not significantly affected (Figure 1C).

Estrogen receptor (ER α and β) expression by HT-29 and SW-1116 cells at the mRNA level. SW1116 and HT-29 cells were negative for ER α mRNA (Figure 2A). MCF-7 cells were used as a positive control (Figure 2A). Both the HT-29 and SW-1116 colon carcinoma cells were found to express ER β at the mRNA level (Figure 2A).

Effects of genistein on the proliferation of the HT-29 and SW-1116 cells. Treatment of the HT-29 cells with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ genistein caused a statistically significant increase in cell growth (Figure 3A). At 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ genistein did not affect their proliferation rates, whereas the higher concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ caused a marginal suppression (16%) (Figure 3A). In contrast, treatment with all tested concentrations of genistein significantly inhibited SW-1116 cell proliferation (Figure 2B).

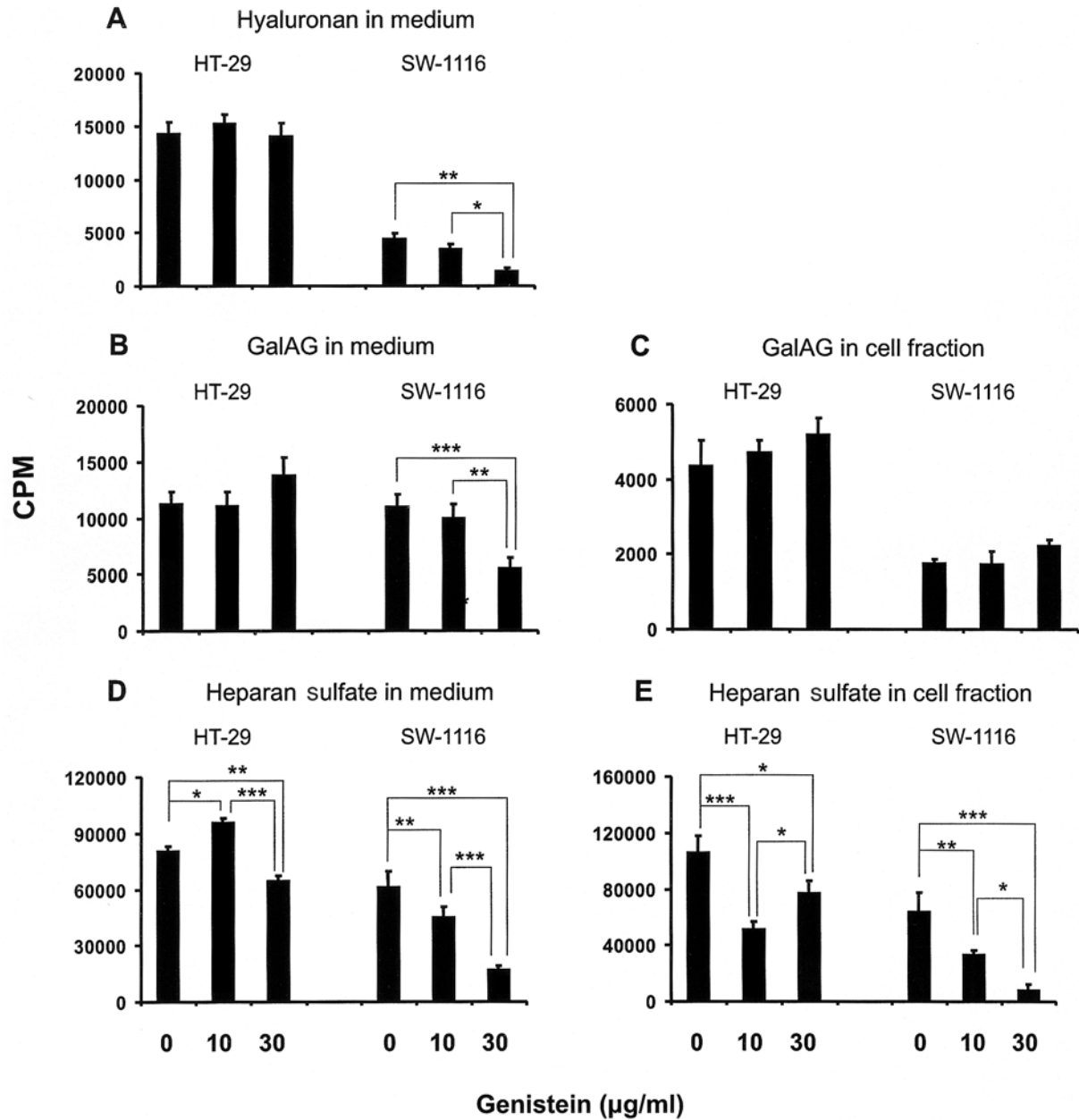


Figure 1. Effects of genistein on the synthesis of secreted and cell-associated, HA, GalAG and HS by the HT-29 and SW-1116 cell lines, measured at the level of 10^6 cells. The results were expressed as [^3H]-labeled radioactivity incorporated as [^3H]-glucosamine in HA and HS, and as [^3H]-galactosamine in GalAG. The results are expressed as the average of three experiments in triplicate. Statistically significant differences between control cells and the two genistein-treated groups (10 and 30 $\mu\text{g/ml}$) are shown by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Discussion

The ability of both colon cancer cell lines to synthesize GAG/PG was significantly affected by the addition of genistein to the cultures. This isoflavonoid has been shown to specifically inhibit protein tyrosine kinases (PTK) with little effect on threonine/serine phosphorylation (20, 29). Therefore, the dose-dependent inhibitory effect of genistein

on the synthesis of both secreted and cell-associated GAGs/PGs by the SW-1116 cells may well be attributed to its action on PTK. The PTK-mediated inhibitory effect of genistein on the production of GAG/PG by the SW-1116 cells is in accordance with previous results obtained for both epithelially-differentiated and sarcomatous human malignant mesothelioma (18) as well as for SAOS-2 osteosarcoma cell GAG/PG production (30).

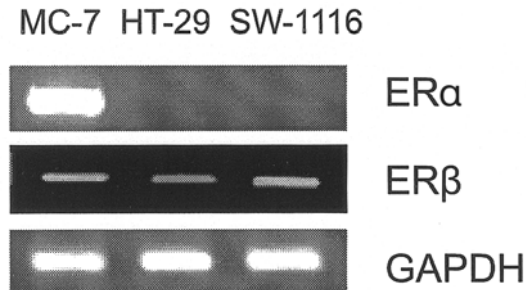


Figure 2. mRNA expression of *ERα*, *ERβ* and *GAPDH* in MCF-7 (lane 1), HT-29 (lane 2) and SW-1116 (lane 3) cell lines as determined by RT-PCR analysis. The MCF-7 cells were used as positive control.

The synthesis of GAG/PG by the HT-29 cells in the presence of genistein, appeared to be dependent on their type and localization. Thus the secretion of HS was significantly stimulated whereas cell-associated HS production was strongly suppressed. GalAG synthesis was modestly stimulated whereas HA production did not appear to be affected by the presence of genistein. The selective effect of genistein on respective GAG fractions may be partially accounted by specific inhibitory effects of genistein on distinct PTK. It has been demonstrated that genistein specifically inhibits insulin-like growth factor receptor, but not epidermal growth factor signaling in the HT-29 colon cancer cell line (31).

Genistein is one of the major phytoestrogens that are structurally similar to estradiol and possesses estrogenic effects (32) mainly perpetrated through binding with *ERβ*, for which the affinity of genistein is similar (94%) to that of estrogen (29). Different roles for estrogens in colon carcinogenesis have been suggested (33, 34) and estrogen has been reported to both stimulate and suppress colon cancer cell growth (33, 35). Both the HT-29 and SW-1116 colon cell lines express the *ERβ* mRNA subtype and are negative for *ERα* mRNA expression (36). Previous reports have shown a stimulation of GAG synthesis by genistein in the ER-positive MCF-7 breast cancer cell line (17). Therefore, the observed selective stimulation of the HT-29 cell GAG/PG synthesis suggests that these cells *in vitro* specifically respond to an estrogen analog, an effect not duplicated in the SW-1116 cells and possibly reflecting differential *in vivo* effects of estrogens on heterogeneous colonic cell populations in a tumor lesion. The activation of ER by genistein in HT-29 cells is supported by data obtained in proliferation experiments where it was shown that genistein at low concentrations, and presumably acting as an estrogen agonist, stimulates the growth of these cells, in contrast to the SW-1116 cells which were constantly growth-suppressed at all genistein concentrations.

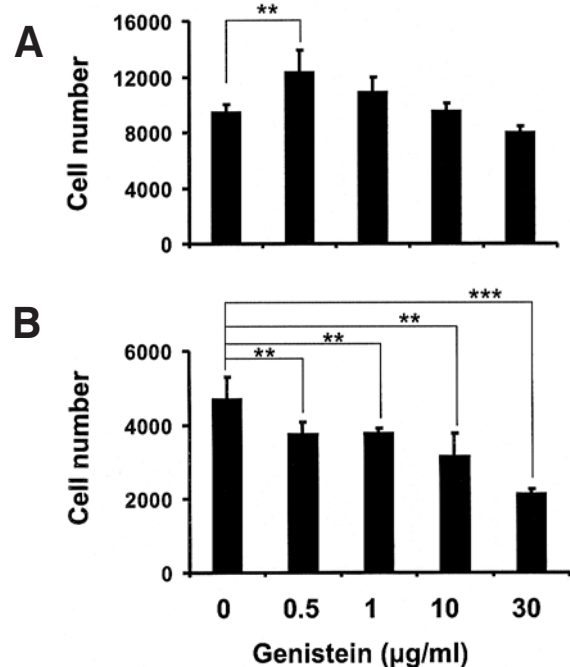


Figure 3. Effects of genistein on human colon adenocarcinoma cell proliferation. Effects of exogenously added genistein (0.5, 1, 10 and 30 µg/ml) on HT-29 (A) and SW-1116 (B) colon cancer cells. Statistical significance: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Conclusion

The results of this study suggest that genistein affects the synthesis of HA, GalAG and HS by the two estrogen receptor positive colon cancer cell lines. In the SW-1116 cell line, genistein had a dose-dependent inhibitory effect on the synthesis of both secreted and cell-associated GAG/PG as well as on cell growth, mediated probably through a PTK pathway. The synthesis of GAGs/PGs by HT-29 cells in the presence of genistein was demonstrated to be dependent on their type and localization, which may partly be explained by an ER-mediated mechanism. ER function in these cells is further supported by the observed stimulation of their growth at low genistein concentrations.

Acknowledgements

This research project (PENED) is co-financed by E.U.-European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%).

References

- Serrano D, Lazzaroni M and Decensi A: Chemoprevention of colorectal cancer: an update. *Tech Coloproctol* 8: S248-S252, 2004.
- American Cancer Society: *Colorectal Cancer Facts and Figures Special Edition 2005* (www.cancer.org). Atlanta, American Cancer Society, 2005.

- 3 Grady WM: Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metast Rev* 23: 11-27, 2004.
- 4 Papapolychroniadis C: Environmental and other risk factors for colorectal carcinogenesis. *Tech Coloproctol* 8: S7-S9, 2004.
- 5 Saunders M and Iveson T: Management of advanced colorectal cancer: state of the art. *Bri J Cancer* 95: 131-138, 2006.
- 6 Gu Y, Zhu CF, Iwamoto H and Chen JH: Genistein inhibits invasive potential of human hepatocellular carcinoma by altering cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. *World J Gastroenterol* 11(41): 6512-6517, 2005.
- 7 Aumailley M and Gayraud B: Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 76(3-4): 253-265, 1998.
- 8 Nakajima M and Chop AM: Tumor invasion and extracellular matrix degradative enzymes: regulation of activity by organ factors. *Semin Cancer Biol* 2(2): 115-127, 1991.
- 9 Wegrowski Y, Maquart FX: Involvement of stromal proteoglycans in tumour progression. *Criti Rev in Oncol/Hematol* 49: 259-268, 2004.
- 10 Kolset SO, Prydz K and Pejler G: Intracellular proteoglycans. *Biochem J* 379: 217-227, 2004.
- 11 Fjeldstad K and Kolset SO: Decreasing the metastatic potential in cancers – targeting the heparan sulfate proteoglycans. *Curr Drug Targets* 6(6): 665-682, 2005.
- 12 Sarkar FH and Li Y: The role of isoflavones in cancer chemoprevention. *Front Biosci* 9: 2714-2724, 2004.
- 13 Messina M and Bennis M: Soyfoods, isoflavones and risk of colonic cancer: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12(4): 707-728, 1998.
- 14 Pagliacci MC, Smacchia M, Migliorati G *et al*: Growth-inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer* 30A: 1675-1682, 1994.
- 15 Kuzumaki T, Kobayashi T and Ishikawa K: Genistein induces p21(Cip1/WAF1) expression and blocks the G1 to S phase transition in mouse fibroblast and melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 291-295, 1998.
- 16 Salti GI, Grewal S, Mehta RR *et al*: Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells. *Eur J Cancer* 36: 796-802, 2000.
- 17 Mitropoulou TN, Tzanakakis GN, Nikitovic D, Tsatsakis A and Karamanos NK: *In vitro* effects of genistein on synthesis and distribution of glycosaminoglycans/proteoglycans by estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer epithelial cells. *Anticancer Res* 22(5): 2841-2846, 2002.
- 18 Tzanakakis GN, Hjerpe A and Karamanos NK: Proteoglycan synthesis induced by transforming and basic fibroblast growth factors in human malignant mesothelioma is mediated through specific receptors and the tyrosine kinase intracellular pathway. *Biochimie* 79: 323-332, 1997.
- 19 Nikitovic D, Zafiroopoulos A, Tzanakakis GN, Karamanos NK and Tsatsakis AM: Effects of glycosaminoglycans on cell proliferation of normal osteoblasts and human osteosarcoma cells depend on their type and fine chemical compositions. *Anticancer Res* 25(4): 2851-2856, 2005.
- 20 Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S *et al*: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262(12): 5592-5595, 1987.
- 21 Polkowski K and Mazurek AP: Biological properties of genistein. A review of *in vitro* and *in vivo* data. *Acta Pol Pharm* 57(2): 135-155, 2000.
- 22 Karamanos NK: Proteoglycans: biological roles and strategies for isolation and determination of their glycan constituents. *In: Proteome and Protein Analysis*. Kamp RM, Kyriakidis DA and Choli-Papadopoulou T (eds.). Heidelberg, Springer-Verlag Inc, pp. 341-363, 1999.
- 23 Karamanos NK, Axelsson S, Vanky P, Tzanakakis GN and Hjerpe A: Determination of hyaluronan and galactosaminoglycan disaccharides by high performance capillary electrophoresis at the attomole level. Applications to analyses of tissue and cell culture proteoglycans. *J Chromatogr A* 696: 295-305, 1995.
- 24 Antonopoulos CA, Borelous E, Hamnstrom B and Scott JE: The precipitation of polyanions by long-chain aliphatic ammonium compounds. Elution in salt solutions of mucopolysaccharide ammonium complexes absorbed on a support. *Biochim Biophys Acta* 54: 213-226, 1961.
- 25 Yamagata T, Saito H, Habuchi O and Suzuki S: Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *J Biol Chem* 243: 1523-1535, 1968.
- 26 Karamanos NK, Syrokou A, Vanky P, Nurminen M and Hjerpe A: Determination of twenty-four variously sulfated galactosaminoglycans and hyaluronan-derived disaccharides by high performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 221: 189-199, 1994.
- 27 Hashimoto N, Morikawa K, Kikuchi M, Yoshida K and Tokuyasu K: Purification and properties of a new keratin sulfate degrading enzyme. *Seikagaku* 60: 935-938, 1988.
- 28 Karamanos NK, Vanky P, Tzanakakis GN, Tsegenidis T and Hjerpe A: Ion-pair high-performance liquid chromatography for detecting disaccharide composition in heparin and heparan sulfate. *J Chromatogr A* 765: 169-179, 1997.
- 29 Sarkar FH and Li Y: Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metast Rev* 21: 265-280, 2002.
- 30 Nikitovic D, Tsatsakis AM, Karamanos NK and Tzanakakis GN: 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. *Anticancer Res* 23: 459-464, 2003.
- 31 Kim EJ, Shin HK and Park JH: Genistein inhibits insulin-like growth factor-I receptor signaling in HT-29 human colon cancer cells: a possible mechanism of the growth inhibitory effect of genistein. *J Med Food* 8(4): 431-438, 2005.
- 32 Arai N, Strom A, Rafter J and Gustafsson JA: Estrogen receptor b mRNA in colon cancer cells: growth effects of estrogen and genistein. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 425-431, 2000.
- 33 Biglia N, Gadducci A, Ponzone R *et al*: Hormone replacement therapy in cancer survivors. *Maturitas* 48: 333-346, 2004.
- 34 Xie LQ, Yu JP and Luo HS: Expression of estrogen receptor b in human colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 10(2): 214-217, 2004.
- 35 Di Leo A, Messa C, Cavallini A and Linsalata M: Estrogens and colorectal cancer. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 1(1): 1-12, 2001.
- 36 Campbell-Thompson M, Lynch J and Bhardwaj B: Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERb isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 61: 632-640, 2001.

Received March 29, 2007

Revised May 25, 2007

Accepted May 29, 2007

Research Communication

Heparin—A Unique Stimulator of Human Colon Cancer Cells' Growth

Georgia Chatzinikolaou¹, Dragana Nikitovic¹, Athanasia Asimakopoulou², Aristidis Tsatsakis¹, Nikos K. Karamanos¹ and George N. Tzanakakis¹

¹Department of Histology, Division of Morphology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece

²Department of Chemistry, University of Patras, Patras, Greece

Summary

The cancer microenvironment and the interactions between cancer and surrounding tissue cells are thought to play a pivotal role in tumor development and progression. Glycosaminoglycans (GAGs)/proteoglycans (PGs) are major constituents of the extracellular matrix, the composition of which may affect various cellular functions. In the present study, the effects of GAGs on the proliferation of HT29, SW1116, and HCT116 human colon cancer cell lines were examined using exogenously added GAGs, an inhibitor of endogenous GAG sulfation and specific glycosidase digestions. Our results demonstrate that colon cancer cell growth was exclusively stimulated by exogenously added heparin and insensitive to endogenous GAGs/PGs production, in a sulfation pattern-related manner. Treatment of the tested cell lines with the FGF-2 neutralizing antibody showed that the stimulatory effect of heparin on the cells' growth was not FGF-2-dependent. Responsiveness of colon cancer cell lines to exogenous heparin/heparan sulfate may play a role in their growth and metastasis. © 2008 IUBMB

IUBMB Life, 60(5): 333–340, 2008

Keywords glycosaminoglycans; proteoglycans; heparin; colon cancer cell lines.

Abbreviations GAGs, glycosaminoglycans; PGs, proteoglycans; CS, chondroitin sulfate; DS, dermatan sulfate; HA, hyaluronan; SC, sodium chlorate

INTRODUCTION

Colorectal cancer remains one of the leading causes of cancer-associated death worldwide in spite of the major advances

in treatment (1). The extracellular matrix (ECM) surrounding the cells is a complex network consisting mainly of collagens, glycoproteins, and proteoglycans (PGs). The signals originating from the ECM can actively affect many aspects of cell behavior including differentiation, proliferation, migration, and adhesion (2, 3). Tumor cells interfere with the normal ECM biosynthesis to promote their progression and malignance (3, 4). PGs are macromolecules that can be located to the ECM, cell membrane-associated or in the intracellular granules. Through their core proteins or via their glycosaminoglycan chains (GAG), *i.e.*, chondroitin/keratan/dermatan sulfate (CS/KS/DS) or heparan sulfate (HS), PGs are able to interact with collagens, growth factors, growth factor receptors, and adhesion molecules (5). Experimental evidence suggests that the effects of GAGs/PGs on various cellular functions are defined by their protein core, the structure and the sulfation pattern of their GAG chains, the cell type, as well as the surrounding ECM composition (3, 6, 7).

Exogenously added GAGs can exert growth-regulatory effects on cultured normal or transformed cells. DS, CS, and heparin have been found to inhibit the proliferation of human melanoma cells (8). DS suppresses the growth of human lung fibroblasts, whereas CS exhibits significant proliferative activity on human lung fibroblasts (9). Similarly, several studies have shown that heparin inhibits the *in vitro* proliferation of vascular smooth muscle cells (10), normal osteoblasts, and human osteosarcoma cells (7), or that it promotes the proliferation of epithelial cells (11).

In the present study, treatment with exogenous GAGs and inhibition of endogenous GAGs/PGs synthesis and specific enzymatic digestions to cleave cell-associated GAGs were utilized, in order to examine the effects of the main types of GAGs, *i.e.*, CS, DS, HA, and heparin on the proliferation of three human colon cancer cell lines (HT29, SW1116 and HCT116).

Received 16 November 2007; accepted 10 February 2008

Address correspondence to: G.N. Tzanakakis, Department of Histology, Division of Morphology, School of Medicine, University of Crete, 71110 Heraklion, Greece. Tel/Fax: +00302810394719.

E-mail: tzanakak@med.uoc.gr

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

CS (C-9819), DS (C-3788), heparin (H3933), sodium chloride (SC), heparinase I, II, III (H2519, H6512, H8891) and the monoclonal anti-mouse CSA primary antibody were obtained from Sigma (St. Louis, MO). HA (Healon) was from Pharmacia AB (Uppsala, Sweden). Chondroitinase ABC (100330), heparitinase (100703), and the anti-heparitinase stubs antibody clone (3G10) were purchased from Seikagaku (Tokyo, Japan). Polyclonal antibody against the protein core of actin as well as the anti-mouse and anti-goat HRP-conjugated secondary antibodies were purchased from Santa Cruz Biochemicals (Santa Cruz, CA). The fluorometric CyQUANT cell proliferation Assay Kit was obtained from Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, CA). Recombinant FGF-2 and the FGF basic neutralizing antibody were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN).

Cell Cultures

HCT116, HT29, and SW1116 human colon adenocarcinoma cell lines obtained from ATCC were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, 0.5% gentamycin, or 100 IU/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin.

RNA Isolation and RT-PCR

Prior to RNA extraction the cells were serum-deprived for 48 h. Total RNA was isolated with the TRIzol method (Gibco). Five micrograms of total RNA was used for cDNA synthesis using the ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen). Specific oligonucleotide primer pairs were designed for FGF-2 (F:GAAGAGCGACCCTC ACATCAAG, R:CTGCCAGTTC GTTTCAGTG), FGFR1 (F:ACAACCTGCCTT ATGTCCAGATC, R:TGCGTCTCAAAGGAGACATT), FGFR2 (F:GGTCA CCA TGGCAACCTTGT, R:TCTGGTTGAGAGATTTGGTAT TTGG), FGFR3 (F:GGG CAATTCTATTGGGTTTTCTC, R:G AAGCCACCCCGTAGCT), FGFR4 (F:TCA TCAACGGCA GCAGCTT, R:CAGGACCTCCACCTCTGAGCTA), and GAP DH (F:GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA, R:GTCATTGATGG CAACAATATCCACT). Reactions were performed in 20 μ L aliquots using the *Platinum* Taq DNA polymerase ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen).

Western Blot

The assay conditions for the chondroitinase/heparitinase treatments have been performed as previously described (8, 12). In short, cells seeded in 24-well plates were serum-starved for 24 h and then treated with heparitinase (0.001 U/mL) or chondroitinase ABC (0.1 U/mL) for 2, 24, and 48 h in 0% FBS medium. The cell extracts treated with heparitinase were electrophoresed on 8% polyacrylamide Tris/glycine gels and transferred to nitrocellulose membranes. Cell extracts (40 μ L) treated with chondroitinase ABC and a standard curve using dilutions (10 μ L) of purified CSA chains (0.15 up to 2.5 mg/mL) were spotted on a positively charged PVDF membrane (Biotrace HP

0.45 μ m, Gelman Sciences) using a dot blot device (Bio-Dot apparatus, BIO-RAD). After blocking, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with primary antibodies [mouse anti-heparitinase stubs antibody (clone 3G10), 1:500; goat anti-actin, 1:200; and mouse anti-CSA, 1:200]. The immune complexes were detected after incubation with peroxidase-conjugated anti-goat or anti-mouse antibody, 1:4,000 or 1:2,000, respectively, with the Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce).

Proliferation Assay

Cells were seeded in a flat-bottom 96-well black plate (Corning) at a density of 3×10^3 cells (HT29 and HCT116) or 7×10^3 cells (SW1116). Prior to all growth assays, the cells were serum-starved for 24 h and the treatment was performed during 48 h in 0% FBS medium supplemented with heparin, CSA, DS, or HA at concentrations of 1, 10, 50, and 100 μ g/mL or SC (25 mM), chondroitinase ABC (0.1 U/mL) or heparitinase (0.001 U/mL) or these enzymes' combination. In some experiments, the effect of exogenous FGF-2 (10 ng/mL) as well as of the anti-FGF-2 antibody (0.1 μ g/mL) on cell growth was examined. After treatment, the number of living cells was determined using the fluorometric CyQUANT cell proliferation Assay Kit, which measures the DNA content using fluorescent dye binding. For converting sample fluorescence values into cell numbers, a reference standard curve was created using serial dilutions of known cell number of each cell line.

Determination of HS Disaccharide Composition

HT29, SW1116, and HCT116 cells were cultured in 0% FBS RPMI during 48 h. The harvested cells were centrifuged and the pellet was treated with a mixture of heparinases I, II, and III. The disaccharide content was characterized and quantified by reversed polarity high-performance capillary electrophoresis (HPCE), which is able to distinguish disaccharide *N*, 2-*O*, 4-*O*, and 6-*O* sulfation variants, with the exception of the rare and in heparin virtually nonexistent 3-*O* variant (13).

Statistical Analysis

The statistical significance was evaluated using the *t*-test and the one way completely randomized variance analysis, using the Microcal Origin (version 5.0) software. The independence/dependence between characteristics was tested at a significant level of $P < 0.01$.

RESULTS

The Role of Endogenous GAGs/PGs on Colon Cancer Cell Growth

One poorly and two moderately differentiated human colon cancer cell lines, HCT116, SW1116, and HT29 respectively, were utilized in this study. The specific digestion of cell-associated CS/DS with chondroitinase ABC (Fig. 1A) or cell-associated HS with heparitinase (Fig. 1B) or both CS/DS/HS chains

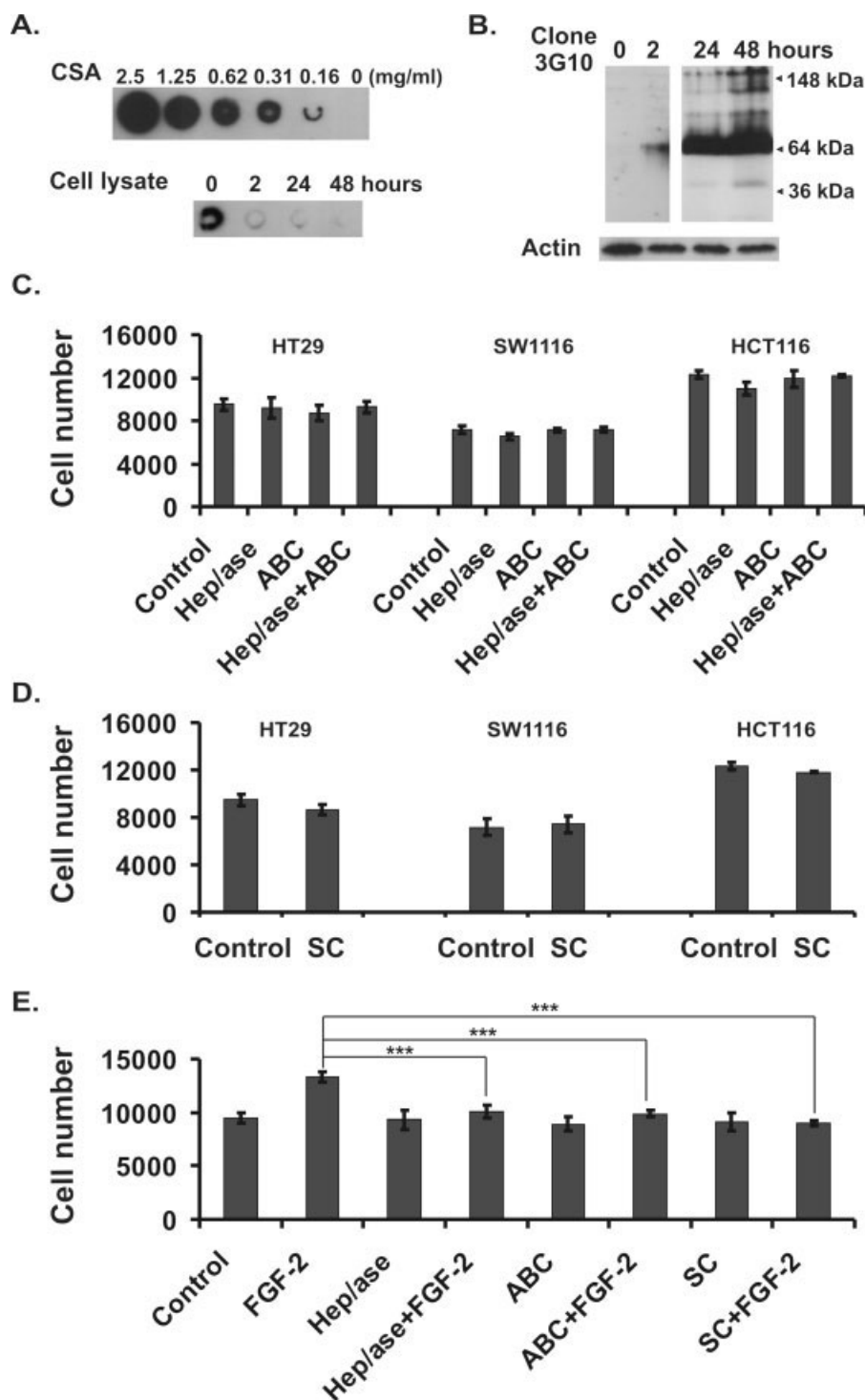


Figure 1. Effects of chondroitinase ABC, heparitinase, FGF-2 and sodium chlorate treatment on human colon cancer cell proliferation. A: Detection of chondroitin sulfate A chains by a dot Western blot analysis. Increasing concentrations of CSA (0.15 up to 2.5 mg/mL) and 40 μ L of HT29 cell lysate of cells treated with chondroitinase ABC (0.1 U/mL) for 0, 2, 24 and 48 h were spotted on a PVDF membrane. B: HT29 cell extracts, treated with heparitinase (0.001 U/mL) for 0, 2, 24 and 48 h, were immunoblotted with the monoclonal antibody 3G10 which recognizes a neoepitope generated by heparitinase digestion (lane 1: non treated; lane 2: 2 h heparitinase-treated; lane 3: 24 h heparitinase-treated; lane 4: 48 h heparitinase-treated cells). C, D: Effects of GAG lyases and SC (25 mM/well) treatment on HT29, SW1116, and HCT116 cells' growth and E: on FGF-2 treated HT29 cells. The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm SEM plotted; statistical significance: *** P < 0.001.

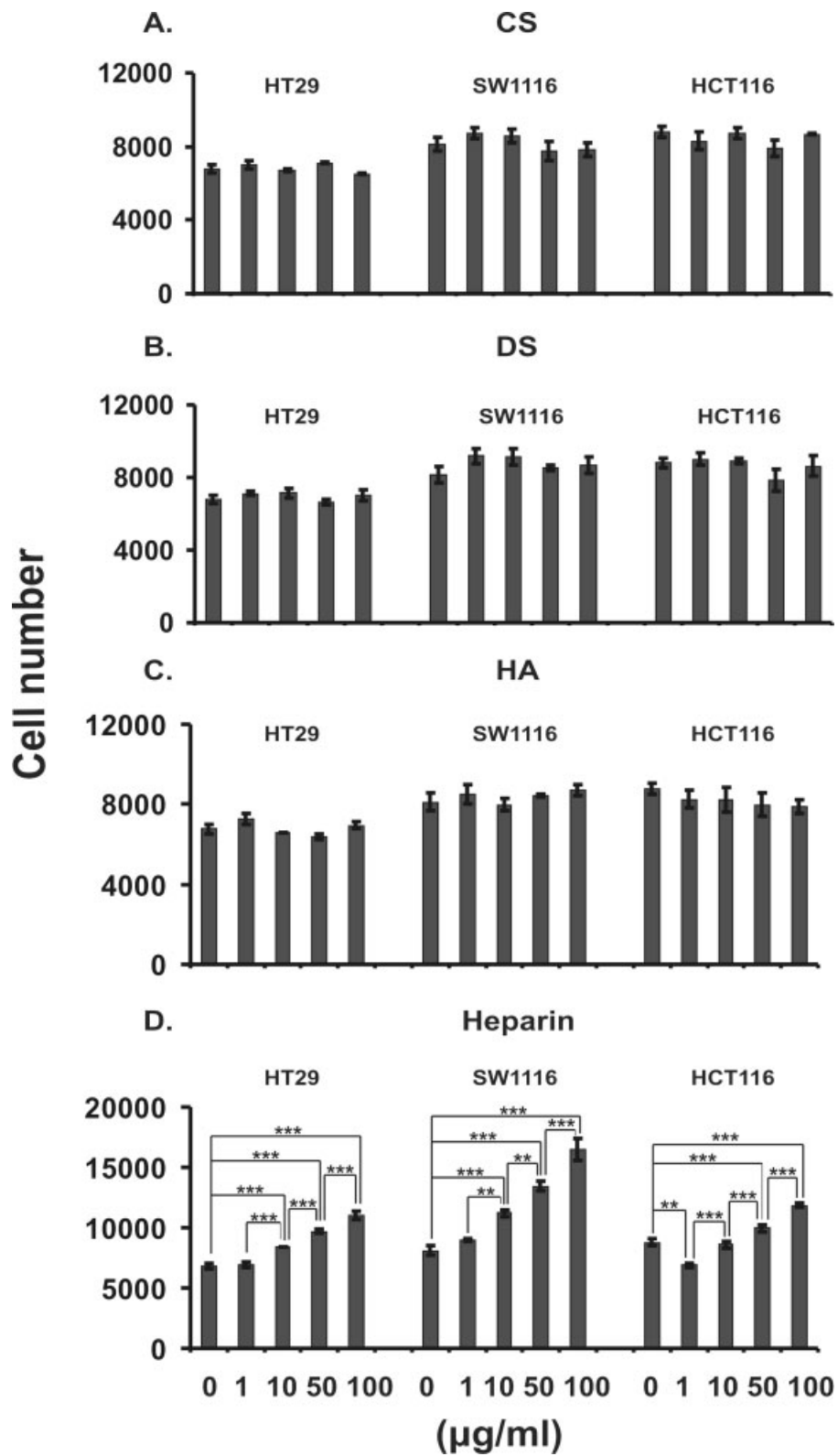


Figure 2. Effects of (A) CSA, (B) DS, (C) HA, and (D) heparin on the proliferation of HT29, SW1116, and HCT116 cell lines. The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm SEM plotted; statistical significance: $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

Table 1
Sulfation pattern of HS estimated after specific enzymatic degradation and HPCE analyses

| Disaccharides | HT29 | SW1116 | HCT116 |
|--------------------|------|--------|--------|
| Δ di-nonS | 38* | 37 | >90 |
| Δ di-mono2S | 26 | — | Traces |
| Δ di-mono6S | 36 | 63 | Traces |

*The results are expressed as a percentage of total Δ -disaccharides recovered by HPCE analysis.

with the enzyme combination did not affect their proliferation (Fig. 1C), suggesting that these cells' growth is independent of their cell-associated GAGs content. In continuation, SC, a known inhibitor of GAG chain sulfation, was used. As presented in Fig. 1D, SC treatment likewise did not affect the basal proliferation level of any of the three cell lines, thus demonstrating that sulfated PGs are not essential for the growth of these human colon cancer cell lines. In some experiments, HT29 cells were treated with GAG-degrading lyases or SC, followed by FGF-2 stimulation, to assure the functionality of the endogenous GAG inhibition experiments (Fig. 1E).

Effects of Exogenously Added GAGs on Human Colon Cancer Cell Proliferation

Incubations with CS, DS, and HA revealed that these GAGs had no significant effect on HT29, SW1116, and HCT116 cells' proliferation at any of the concentrations tested (Figs. 2A–2C). In contrast, treatment of HT29 and SW1116 cells with heparin at the concentrations of 10 μ g/mL and higher caused a significant dose-dependent stimulation of their growth rates (Fig. 2D). HCT116 cells' proliferation was upregulated in the presence of 50 and 100 μ g/mL of heparin, whereas this effect was not observed at the lower concentration. In order to exclude the possibility that the utilized heparin preparation contained active heparin-binding growth factors, a heat treatment was applied. Heat treatment did not affect the activity of heparin on the cells' growth (data not shown).

Sulfation Pattern of Colon Cell-Derived HS (GlcAGs) Disaccharides

HPCE analysis after specific enzymatic digestions revealed that the chemical composition of the tested HS significantly differed among the cell lines (Table 1). Thus, the nonsulfated disaccharide (Δ di-nonS) was the major disaccharide unit of the cell-associated HS produced by HCT116 cells. On the other hand, up to 62% of the cell-associated HS synthesized by HT29 cells were found to be monosulfated Δ di-mono6S and Δ di-mono2S disaccharides. The main disaccharide unit of SW1116 cell membrane HS (up to 63%) was the Δ di-mono6S. Differences were also observed in the amounts of HS retained at the cell membrane, as HT29 cells produced 0.8 μ g per 10^6 cells,

whereas 0.4 and 0.5 μ g per 10^6 cells were detected at the HCT116 and SW1116 cell membrane.

FGF-2 and FGF Receptors Profiles—Effect of Anti-FGF Neutralizing Antibody

In order to examine the possible involvement of the FGF-signaling on the heparin effect, the expression profile of FGF-2 and its respective receptors in these human colon cancer lines were examined by RT-PCR. As shown in Fig. 3A, SW1116 and HCT116 cells were found to express FGF-2 mRNA, whereas the HT29 cell line was negative for this growth factor at both the mRNA and the protein level. No change in the expression levels of FGF-2 mRNA was observed after the addition of heparin (50 μ g/mL) in HT29 cells (data not shown). All colon cancer cell lines were found to express FGFR-2 mRNA, whereas none of them expressed detectable mRNA for FGFR-4, FGFR-1 and 3 expression pattern was cell line-specific.

The addition of FGF-2 (10 ng/mL) significantly stimulated the growth of just HT29 cells (Fig. 3B). To establish the working concentration range for the anti-FGF-2 antibody, pilot experiments with HT29 cells demonstrated that the simultaneous addition of the anti-FGF antibody at the concentration of 0.1 μ g/mL and higher completely inhibited FGF-2-stimulated HT29 cell growth. To address the possibility that heparin may act through the FGF-2 signaling pathway, the three human colon cancer cell lines were treated with the combination of heparin (50 μ g/mL) and the FGF-2 neutralizing antibody at 0.1 μ g/mL. The addition of heparin in the presence of anti-FGF-2 antibody stimulated the growth of the anti-FGF-2-treated cells to the level of the heparin-treated controls, thus demonstrating that the heparin-induced effect on HT29, SW1116, and HCT116 cells' growth is not FGF-2-dependent.

DISCUSSION

The complex interactions among the cancer cells, their ECM, and the surrounding normal cells are thought to play a pivotal role in tumor development and progression (14). GAGs/PGs are major constituents of the ECM and have been shown to participate in tumor pathogenesis through both their protein core and GAG chain components (5).

SC specifically inhibits the sulfation of the GAG chains, resulting in the production of undersulfated PGs, whose secretion is partially prevented by the quality control mechanisms of the cell. In this study, we have used a specific inhibitor of GAG chain sulfation, SC (15), to assess the necessity of endogenous GAGs/PGs on human colon cancer cells growth. Upon SC treatment, the basal proliferation level of HT29, SW1116, and HCT116 cells was not affected, suggesting that endogenous sulfated GAGs/PGs are not essential for their growth.

Specific GAG-degrading lyases have been widely used to examine the activities of cell-associated CS/HSPGs (8, 12, 16). Degradation of membrane-bound CS/DS/HS chains by treatment with either heparitinase, chondroitinase ABC, or their combina-

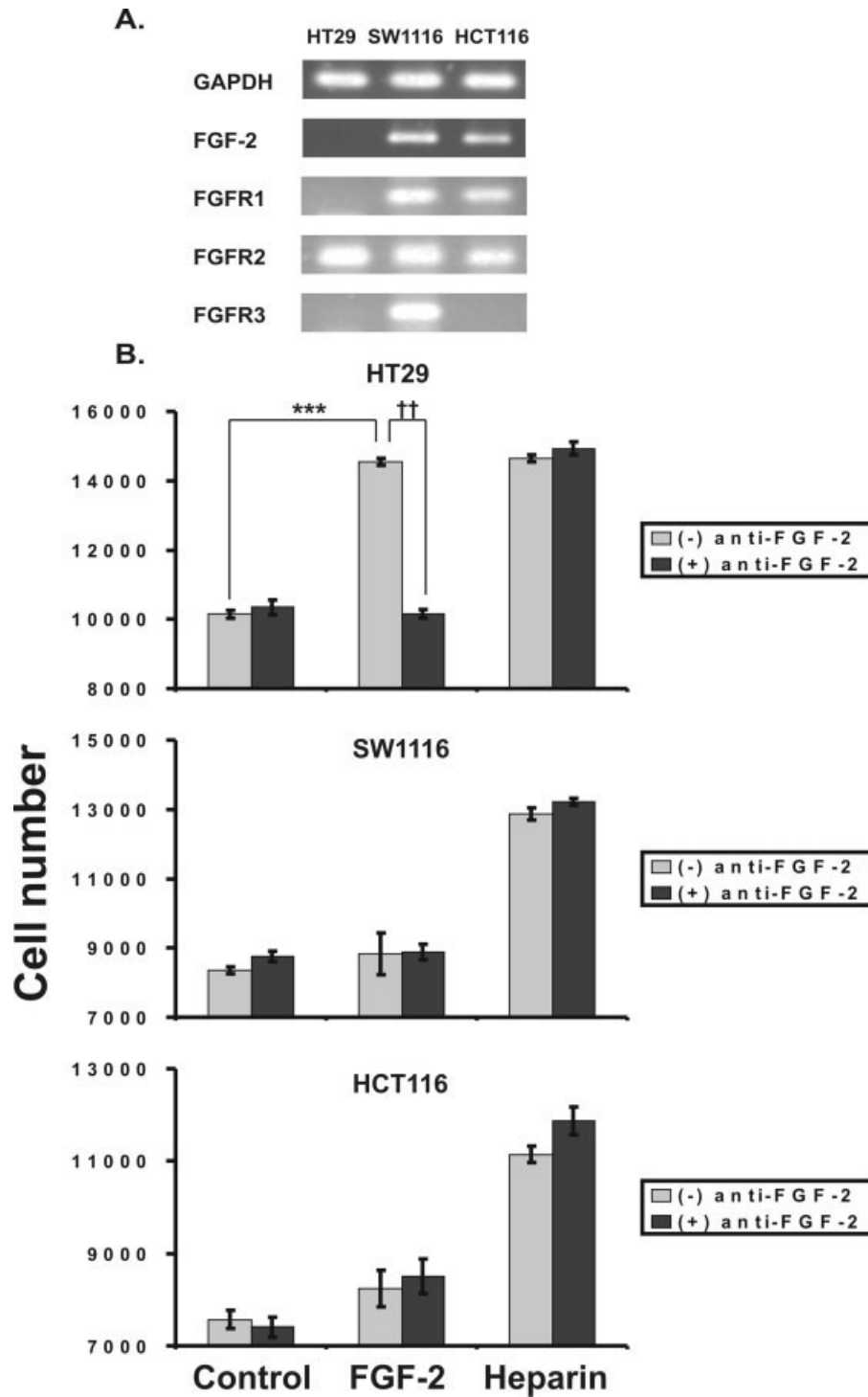


Figure 3. (A) mRNA expression of FGF-2 and its respective receptors (FGFR1-4) in HT29, SW1116, and HCT116 cell lines as determined by RT-PCR analysis. GAPDH was used as a reference gene. (B) The effects of exogenous heparin in the presence of the anti-FGF-2 antibody. Serum-starved HT29, SW1116, and HCT116 cells were treated with heparin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of the anti-FGF-2 antibody (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The results represent the average of four separate experiments in triplicate. Means \pm SE plotted; statistical significance: $***P < 0.001$ control vs. FGF-2 treated cells; $\dagger\dagger P < 0.001$ FGF-2 as compared to anti-FGF-2/FGF-2 treated cells.

tion, in order to eliminate possible additive effects, had no effect on the basal level of proliferation of HT29, SW1116, and HCT116 cells, demonstrating that they are not sensitive to changes in cell-associated GAGs/PGs.

CS, DS, HA, and heparin preparations, which had previously been biochemically characterized (7), were exogenously applied to the three studied colon cancer cell lines. Heparin stimulated HT29, SW1116, and HCT116 cells' growth, in contrast to the other GAG preparations which had no effect. Previous studies have reported both stimulatory and inhibitory effects of heparin on the growth of different cell types (6, 7, 9, 10, 17). Moreover, exogenous heparin and HS-chains secreted by liver cells were found to affect colon cancer cell proliferation through a mechanism involving increased expression of tyrosine kinase receptors of the erb-B family (18, 19). It is noteworthy that liver cells produce significant amounts of HS *in vivo* (~0.08 mg per gram of wet liver tissue) (20). These earlier studies therefore suggest that heparin/HS may have a critical role in colon cancer growth and metastasis.

The effects of GAGs on cell proliferation are closely related to the fine structure of the GAG chain and the sulfation type (6, 7). It has been reported that a low metastatic colon cancer cell line was stimulated by a three-sulfated disaccharide, whereas a highly metastatic cell lines' growth was inhibited by a HS-disaccharide with two sulfate groups (18). In this study, the HS chains associated to HCT116 cell membrane were abundant in nonsulfated disaccharides, while HT29 and SW1116 cells appear to have a high content of Δ di-mono6S and Δ di-mono2S as well as nonsulfated HS disaccharides. This is noteworthy, as it defines the respective HS chains of the tested cell lines to be of low total charge and sulfation content. It has earlier been described that transformed/undifferentiated HT29 cells show a lower HS sulfation degree as compared to their differentiated counterparts (21). The utilized heparin preparation was characterized to be highly sulfated (7), with a high content of three-sulfated disaccharides. Three-sulfated disaccharides, previously reported to be abundant in the liver HS chains (18), have been shown *in vitro* to stimulate colon cancer cell growth. Therefore, the growth of colon cancer cell lines was stimulated by three-sulfated disaccharide rich heparin; whereas the low sulfate content HS chains produced by the colon cancer cell lines did not affect their growth. The nonsensitivity of colon cancer cells to endogenous GAGs may make them more susceptible to growth signals originating from GAGs secreted by surrounding tissue cells and/or metastasis target organs such as liver.

An important and well-defined role of HSPGs/heparin is to increase the affinity of FGF-2 to its respective, FGFR1-4 receptors (22). The active role of FGF-pathways has been suggested in the early stages of colorectal tumorigenesis as well as in organ metastasis (23). Initially, the growth response of the cells to exogenously added FGF-2 was examined. The addition of exogenous FGF-2 significantly stimulated the growth of HT29 cells, whereas the SW1116 and HCT116 cell lines were not responsive to FGF-2 treatment. However, Day et al. have previ-

ously shown that HCT116 cell line responded to FGF-2 treatment with increased cell proliferation and that heparitinase treatment of FGF-2 treated cells resulted in a significant reduction of their growth (24). This discrepancy may be explained by the fact that Day et al. utilized both different cell culture conditions for the assay (5% FBS), as well as a different method to assess cell number (MTT). In order to examine the possible cooperation between the stimulatory effect of heparin and the FGF-signaling, we utilized FGF-2-neutralizing antibody that blocks the ability of FGF-2 to stimulate cellular responses (25). Treatment of HT29, SW1116, and HCT116 human colon cancer cells that exhibit different FGF-2/FGFRs expression profiles with the specific FGF-2 antibody demonstrated that the heparin-induced effect on these cells' growth is independent of the FGF-2 pathway.

Heparin is known to bind several other growth factors, such as HGF/SF, VEGF, and EGF, and by utilizing this ability may participate in the regulation of the respective growth factors' signaling cascades. Even though heparin and HS have been shown to bind to and influence the activities of many proteins, including enzymes, cytokines, adhesion molecules, and ECM components, data on the prospective mechanisms by which heparin regulates cell proliferation are up to date, lacking (26, 27).

In conclusion, our results demonstrate that colon cancer cell growth was exclusively stimulated by exogenously added heparin and not sensitive to endogenous GAGs/PGs production, which may be explained by their respective sulfation patterns. The stimulatory effect of heparin was not perpetrated through the FGF-2 pathway. Currently, experiments are performed in our laboratory in order to examine whether the effect of heparin is related to the EGFR signaling pathway or is mediated by other target proteins.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research project (PENED) is cofinanced by E.U.-European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%). Grant Number: KA2337.

REFERENCES

1. Xu, R., Zhou, B., Fung, P. C., and Li, X. (2006) Recent advances in the treatment of colon cancer. *Histol. Histopathol.* **21**, 867–872.
2. Lin, C. Q. and Bissell, M. J. (1993) Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *Faseb J.* **7**, 737–743.
3. Aguiar, C. B., Lobao-Soares, B., Alvarez-Silva, M., and Trentin, A. G. (2005) Glycosaminoglycans modulate C6 glioma cell adhesion to extracellular matrix components and alter cell proliferation and cell migration. *BMC Cell Biol.* **6**, 31–39.
4. Pupa, S. M., Menard, S., Forti, S., and Tagliabue, E. (2002) New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J. Cell Physiol.* **192**, 259–267.
5. Fjeldstad, K. and Kolset, S. O. (2005) Decreasing the metastatic potential in cancers—targeting the heparan sulfate proteoglycans. *Curr. Drug Targets* **6**, 665–682.
6. Syrokou, A., Tzanakakis, G., Tsegenidis, T., Hjerpe, A., and Karamanos, N. K. (1999) Effects of glycosaminoglycans on proliferation of

- epithelial and fibroblast human malignant mesothelioma cells: a structure–function relationship. *Cell Prolif.* **32**, 85–99.
7. Nikitovic, D., Zafiroopoulos, A., Tzanakakis, G. N., Karamanos, N. K., and Tsatsakis, A. M. (2005) Effects of glycosaminoglycans on cell proliferation of normal osteoblasts and human osteosarcoma cells depend on their type and fine chemical compositions. *Anticancer Res.* **25**, 2851–2856.
 8. Nikitovic, D., Assouti, M., Sifaki, M., Katonis, P., Krasagakis, K., Karamanos, N. K., and Tzanakakis, G. N. (2008) Chondroitin sulfate and heparan sulfate-containing proteoglycans are both partners and targets of basic fibroblast growth factor-mediated proliferation in human metastatic melanoma cell lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 72–83.
 9. Fthenou, E., Zafiroopoulos, A., Tsatsakis, A., Stathopoulos, A., Karamanos, N. K., and Tzanakakis, G. N. (2006) Chondroitin sulfate A chains enhance platelet-derived growth factor-mediated signalling in fibrosarcoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 2141–2150.
 10. Au, Y. P., Kenagy, R. D., Clowes, M. M., and Clowes, A. W. (1993) Mechanisms of inhibition by heparin of vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Haemostasis* **23**(Suppl 1), 177–182.
 11. Flint, N., Cove, F. L., and Evans, G. S. (1994) Heparin stimulates the proliferation of intestinal epithelial cells in primary culture. *J. Cell Sci.* **107**(Pt 2), 401–411.
 12. Fthenou, E., Zafiroopoulos, A., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N. K., and Tzanakakis, G. N. (2007) Chondroitin sulfate prevents platelet derived growth factor-mediated phosphorylation of PDGF-R β in normal human fibroblasts severely impairing mitogenic responses. *J. Cell. Biochem.*, in press.
 13. Karamanos, N. K., Vanky, P., Tzanakakis, G. N., Tsegenidis, T., and Hjerpe, A. (1997) Ion-pair high-performance liquid chromatography for determining disaccharide composition in heparin and heparan sulphate. *J. Chromatogr. A* **765**, 169–179.
 14. Zigrino, P., Loffek, S., and Mauch, C. (2005) Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochimie* **87**, 321–328.
 15. Fannon, M. and Nugent, M.A. (1996) Basic fibroblast growth factor binds its receptors, is internalized, and stimulates DNA synthesis in Balb/c3T3 cells in the absence of heparin sulphate. *J. Biol. Chem.* **271**, 17949–17956.
 16. Denholm, E. M., Cauchon, E., Poulin, C., and Silver, P. J. (2000) Inhibition of human dermal fibroblast proliferation by removal of dermatan sulfate. *Eur. J. Pharmacol.* **400**, 145–153.
 17. Maurer, A. M., Han, Z. C., Dherny, D., and Briere, J. (1994) Glycosaminoglycans enhance human leukemic cell growth in vitro. *Leuk. Res.* **18**, 837–842.
 18. Fishman, S., Brill, S., Papa, M., Halpern, Z., and Zvibel, I. (2002) Heparin-derived disaccharides modulate proliferation and Erb-B2-mediated signal transduction in colon cancer cell lines. *Int. J. Cancer* **99**, 179–184.
 19. Zvibel, I., Halpern, Z., and Papa, M. (1998) Extracellular matrix modulates expression of growth factors and growth-factor receptors in liver-colonizing colon-cancer cell lines. *Int. J. Cancer* **77**, 295–301.
 20. Vongchan, P., Warda, M., Toyoda, H., Toida, T., Marks, R. M., and Linhardt, R. J. (2005) Structural characterization of human liver heparan sulphate. *Biochim. Biophys. Acta* **1721**, 1–8.
 21. Molist, A., Romaris, M., Villena, J., and Bassols, A. (1997) Enterocytic differentiation correlates with changes in the fine structure and sulfation of perlecan in HT29 human colon carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 874–879.
 22. Nugent, M. A. and Iozzo, R. V. (2000) Fibroblast growth factor-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 115–120.
 23. Netzer, P., Domek, M., Pai, R., Halter, F., and Tarnawski, A. (2001) Inhibition of human colon cancer cell growth by antisense oligodeoxynucleotides targeted at basic fibroblast growth factor. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **15**, 1673–1679.
 24. Day, R., Ilyas, M., Daszak, P., Talbot, I., and Forbes, A. (1999) Expression of syndecan-1 in inflammatory bowel disease and a possible mechanism of heparin therapy. *Dig. Dis. Sci.* **44**, 2508–2515.
 25. Kurokawa, M., Doctrow, S. R., and Klagsbrun, M. (1989) Neutralizing antibodies inhibit the binding of basic fibroblast growth factor to its receptor but not to heparin. *J. Biol. Chem.* **264**, 7686–7691.
 26. Powell, A. K., Yates, E. A., Fernig, D. G., and Turnbull, J. E. (2004) Interactions of heparin/heparan sulfate with proteins: appraisal of structural factors and experimental approaches. *Glycobiology* **14**, 17R–30R.
 27. Taylor, K. R., and Gallo, R. L. (2006) Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *Faseb J.* **20**, 9–22.



Heparin regulates colon cancer cell growth through p38 mitogen activated protein kinase signaling

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>Cell Proliferation</i> |
| Manuscript ID: | Cellprol-0610-09.R2 |
| Manuscript Type: | Original Manuscript |
| Date Submitted by the Author: | |
| Complete List of Authors: | Tzanakakis, George; School of Medicine, University of Crete, Dept. of Histology Chatzinikolaou, Georgia; School of Medicine, University of Crete, Dept. of Histology Nikitovic, Dragana; School of Medicine, University of Crete, Dept. of Histology Berdiaki, Aikaterini; School of Medicine, University of Crete, Dept. of Histology Zafiropoulos, Alexandros; School of Medicine, University of Crete, Dept. of Histology Katonis, Pavlos; School of Medicine, University of Crete, Dept. of Histology Karamanos, Nikos; University of Patras, Department of Chemistry |
| Keywords: | Heparin, Colon cancer, p38 MAPK, proliferation |
| | |



1
2
3 **Heparin regulates colon cancer cell growth through p38 mitogen**
4 **activated protein kinase signaling**
5
6
7
8
9

10 Chatzinikolaou Georgia, Department of Histology, Division of Morphology, School
11 of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece, email

12
13 gchatzinik@edu.med.uoc.gr
14

15
16
17
18
19 Nikitovic Dragana, Department of Histology, Division of Morphology, School of
20 Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece, email dnikitovic@med.uoc.gr
21
22
23

24
25
26 Berdiaki Aikaterini, Department of Histology, Division of Morphology, School of
27 Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece, e mail berdiaki@edu.med.uoc.gr
28
29
30

31
32
33 Zafiropoulos Alexandros, Department of Histology, Division of Morphology, School
34 of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece, e mail zafeiros@med.uoc.gr
35
36
37

38
39
40 Katonis Pavlos, Department of Histology, Division of Morphology, School of
41 Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece, email katonis@hol.gr
42
43
44

45
46
47
48 Karamanos K. Nikos, Department of Chemistry, University of Patras, Patras, Greece,
49 e mail N.K.Karamanos@upatras.gr
50
51

52
53
54 Tzanakakis N. George, Department of Histology, Division of Morphology, School of
55 Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece, email tzanakak@med.uoc.gr
56
57
58

59
60
Correspondence to:

1
2
3 Tzanakakis GN., Department of Histology, Division of Morphology, School of
4 Medicine, University of Crete, Voutes 71110 Heraklion, Greece. Tel/Fax:
5
6 00302810394719, email tzanakak@med.uoc.gr
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Review Only

1
2
3 **Abstract. Objectives:** Heparin acts as an extracellular stimulus capable of activating
4 major cellular signaling pathways. Thus, we examined the putative mechanisms
5 utilized by heparin to stimulate HT29, SW1116 and HCT116 colon cancer cell
6 growth. *Materials and methods:* The possible participation of mitogen activated
7 protein kinase (MAPK) cascade on heparin-induced HT29, SW1116 and HCT116
8 colon cancer cell growth was evaluated by utilizing specific MAPK cascade
9 inhibitors, western blot analysis, real-time quantitative PCR and FACS apoptosis
10 analysis. *Results:* Treatment with a highly specific p38 kinase inhibitor, SB203580,
11 significantly (50-70%) inhibited colon cancer cell heparin-induced growth,
12 demonstrating that p38 MAPK signaling is involved in their heparin-induced
13 proliferative response. Heparin-induced stimulation of colon cancer cell growth was
14 shown to be correlated to increased (up to 3-fold) phosphorylation of 181/182
15 threonine/tyrosine residues on p38 MAP kinase. Furthermore, heparin inhibited
16 cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/cip and p53 tumor suppressor gene and
17 protein expression up to 2-fold or 1.8-fold, respectively and stimulated cyclin D1
18 expression up to 1.8 in these cell lines through a p38-mediated mechanism. On the
19 other hand, treatment with heparin did not appear to affect HT29, SW1116 and
20 HCT116 cell apoptosis rates. *Conclusions:* This study demonstrates that an
21 extracellular glycosaminoglycan, heparin, finely modulates the expression of genes
22 crucial to cell cycle regulation through the specific activation of the p38 MAP kinase
23 to stimulate colon cancer cell growth.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

Colon cancer is one of the most commonly diagnosed types of cancer among men and women worldwide (Jemal *et al.* 2008; Rougier *et al.* 2003). Cancer progression requires a continually evolving network of interactions between neoplastic cells and the surrounding microenvironment (Pupa *et al.* 2002; Zigrino *et al.* 2005). Distinct organs have unique extracellular matrix (ECM) properties which by regulating tumor cell proliferation and migration can either attenuate or stimulate their ability to metastasize. Liver is the major colon cancer metastasis target, and importantly hepatocyte-derived ECM was reported to stimulate the proliferation of colon cancer cell lines (Zvibel *et al.* 2001). Specifically, the heparan sulphate (HS) component of the hepatocyte ECM, structurally similar to highly sulfated heparin (Lyon *et al.* 1994), was suggested to enhance colon cancer cell growth (Zvibel *et al.* 2001). Furthermore, the key role of heparan sulfate-derived metabolites in the tumorigenesis of colon cancer is supported by reports correlating heparanase expression with colon cancer progression (Nobuhisa *et al.* 2005; Naomoto *et al.* 2005; Perreti *et al.* 2008).

Inhibitory effects of heparin on the *in vitro* proliferation of many types of cells, including normal osteoblasts and human osteosarcoma cells (Nikitovic *et al.* 2005; Hausser *et al.* 2004], vascular smooth muscle cells (Au *et al.* 1993), normal fibroblasts (Ferrao *et al.* 1993; Westergren *et al.* 1993), and human melanoma cells (Nikitovic *et al.* 2008) have earlier been reported. On the other hand, some reports show that heparin can stimulate cell growth (Flint *et al.* 1994; Maurer *et al.* 1994; Wu *et al.* 2006). In our recent study, heparin was demonstrated to stimulate colon cancer cell growth (Chatzinikolaou *et al.* 2008), whereas previously liver HS derived disaccharides were shown to both inhibit and enhance colon cancer cell proliferation in a sulfation pattern dependent manner (Fishman *et al.* 2002).

1
2
3 Numerous mechanisms of heparins' action have been postulated including the
4 regulation of growth factors / growth factor receptors (Schlessinger 2000; Lyon *et al.*
5 1994), cytokines, mitogen activated protein kinases (MAPKs) (Ottlinger *et al.* 1993)
6 activities, or the modulation of cell cycle progression (Yu *et al.* 2006). Thus, heparin
7 and the structurally related HS act as extracellular stimuli capable of activating key
8 cellular signaling pathways and consequently key cellular functions (Rabenstein
9 2002).

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20 The transduction of signals from the cell surface to the nucleus is mediated by
21 several protein kinases, including the family of MAPKs (Nebreda *et al.* 2000; Zhai *et*
22 *al.* 2004; Juretic *et al.* 2001; Kim *et al.* 2007). MAPKs are a family of
23 serine/threonine kinases constituted by three major classes: extracellular-regulating
24 kinases (ERKs), c-Jun amino-terminal kinases (JNKs) and p38 MAPKs that differ in
25 their substrate specificity and responses to extracellular signals. MAPKs signaling
26 pathways have been implicated in a wide range of cellular functions, such as
27 proliferation, apoptosis and migration (Ding *et al.* 2001; Hecquet *et al.* 2003; Igarashi
28 *et al.* 2000; McMullen *et al.* 2005; Tong *et al.* 2005). Importantly, ERK1/2 cascade is
29 frequently dysregulated in cancer and implicated in colon cancer tumorigenesis
30 (Balmanno *et al.* 2008), whereas c-Jun NH₂-terminal kinase 1 plays a critical role in
31 colon cancer cell proliferation (Tong *et al.* 2007). Although, p38 has been proposed
32 primarily as a MAP kinase participating in apoptosis and the cellular response to
33 stress, there is evidence that p38 activation is required for colon cancer cell growth
34 and survival (Comes *et al.* 2007; Lim *et al.* 2006; Sun *et al.* 2005).

35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
In this study, we investigated the possible mechanisms that the extracellular
glycosaminoglycan, heparin, utilizes in order to regulate HT29, SW1116 and HCT116
colon cancer cells' growth.

Materials and methods

Materials :

RPMI-1640 medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin and gentamycin were obtained from Gibco-Invitrogen (Paisley, UK). Heparin (H3933), the p38 (SB202190) and JNK (SP600125) inhibitors were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). The p38 inhibitor SB203580 was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). The MEK1/2 (U0126) inhibitor, anti-caspase 3, anti-cleaved caspase 3, as well as polyclonal antibodies specific for p38 and phosphorylated p38 MAPK were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti-p-EGFR (pY1068) was obtained from Biosource International (Camarillo, CA, USA). Polyclonal antibody against the protein core of actin, anti-cyclin D1, anti-p53, anti-p21, as well as the anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat HRP-conjugated secondary antibodies were purchased from Santa Cruz Biochemicals (Santa Cruz, CA, USA). The fluorometric CyQUANT cell proliferation Assay Kit was obtained from Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). EGF was from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). The MAPK inhibitors were dissolved in DMSO according to the manufacturers' instructions. All other chemicals used were of the best available grade.

Cell culture :

HT29, SW1116 and HCT116 human colon adenocarcinoma cell lines were obtained from ATCC. The HT29 and SW1116 cells were grown in a humidified atmosphere at 37°C, 5% (v/v) CO₂ in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and 0.5%

1
2
3 gentamycine. HCT116 cell line was grown in RPMI-1640 supplemented with 10%
4
5 FBS, 100 IU/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin.
6
7
8
9

10 *Real-time PCR:*

11
12 Total ribonucleic acid was isolated with the TRIzol method (GibcoBRL) according to
13
14 the manufacturer's instructions. Five micrograms of total RNA was used for cDNA
15
16 synthesis using the DyNAmo cDNA synthesis Kit (Finnzymes, Finland) according to
17
18 the manufacturer's instructions. The primers were mRNA specific to avoid
19
20 misleading results from traces of DNA contamination p21WAF1/cip1 (F:
21
22 CTGCCCAAGCTCTACCTTCC, R: CAGGTCCACATGGTCTTCCT), p53 (F:
23
24 CGTCTGGGCTTCTTGCATTC, R: AAGGCCTGCCCTGTGCAGC), cyclin D1 (F:
25
26 GCCCTCGGTGTCCTACTTCAA, R: TCCTCCTCGCACTTCTGTTCC), GAPDH
27
28 (F: GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA, R: GTCATTGATGGCAACAATATCCAC
29
30 T). For the real-time PCR reaction we utilized the QuantiTech SYBR Green master
31
32 mix (Qiagen) in a total volume of 20 µl. Standard curves were run in each optimized
33
34 assay which produced a linear plot of threshold cycle (Ct) against log (dilution). The
35
36 real-time PCR reactions were carried out in an Mx300P cycler. The amount of each
37
38 target was quantified based on the concentration of the standard curve and was
39
40 presented as arbitrary units. The quantity of each target was normalised against the
41
42 quantity of GAPDH.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 *SDS-PAGE and Western Blotting :*

54
55 Growing cells from non confluent cultures were harvested and seeded in 24-well
56
57 culture plates and allowed to rest overnight in RPMI supplemented with 10% FBS.
58
59 The cells were serum-starved for 24 hours and then treated with heparin (50 and 100
60

1
2
3
4 μg/ml) or/and the specific MAPK inhibitors or gefitinib for 30 minutes and 1 hour,
5
6 respectively. Following the treatment, cells were lysed with 50mmol/L of Tris-HCl,
7
8 0.5 mol/L of EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% NaCl and protease/phosphatase
9
10 inhibitors (1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mmol/L NEM, 5 mmol/L
11
12 benzamidine, 1% sodium chlorate and 1 mmol/L orthovanadate). The cell extracts
13
14 were electrophoresed on 8% polyacrylamide Tris/glycine gels and transferred to
15
16 nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with PBS containing 0.1%
17
18 Tween 20 (PBS-T) and 5% (w/v) low-fat milk powder, overnight at 4°C. Incubation
19
20 with primary antibodies, rabbit anti-p38 (1:1000), rabbit anti-phospho-p38 (1:1000),
21
22 rabbit anti-p-EGFR (1:1000), rabbit anti-cleaved caspase 3 (1:1000), mouse anti-p53
23
24 (1:200), rabbit anti-cyclin D1 (1:200), mouse anti-p21 (1:100) and goat anti-actin
25
26 (1:200) in PBS-T and 1% (w/v) low-fat milk powder was done for 1 hour at room
27
28 temperature. The immune complexes were detected after incubation with peroxidase-
29
30 conjugated anti-rabbit (1:2000 or 1:4000), anti-mouse (1:2000) or anti-goat (1:4000)
31
32 antibodies, diluted in PBS-Tween, 1% low-fat milk, with the Super Signal West Pico
33
34 Chemiluminescent substrate (Pierce), according to the manufacturer's instructions.
35
36
37
38
39
40
41
42

43 *Proliferation assay:*

44
45 Exponentially growing cells from non confluent cultures were harvested and seeded
46
47 in a flat-bottom 96-well black plate (Corning, USA) at a density of 3×10^3 cells
48
49 (HT29 and HCT116) or 7×10^3 cells (SW1116) per well in the presence of 10% FBS
50
51 for 24 hours. Cells were serum-deprived for 24 hours prior to treatment with heparin
52
53 (100 μg/ml) in serum free culture medium. The utilized heparin preparation has
54
55 previously been finely biochemically characterized (Nikitovic 2005). In experiments
56
57 using SP600125 (5 μM), U0126 (30 μM), SB202190 (5 μM) and SB203580 (0.4 or 5
58
59
60

1
2
3
4 μM) inhibitors, cells were preincubated with the respective inhibitors 1 hour prior to
5
6 the addition of heparin. As the utilized MAPK inhibitors were dissolved in DMSO
7
8 according to the manufacturers' instructions, the equivalent DMSO vehicle controls
9
10 were used to rule out any non-specific DMSO effects. After 48 hours of treatment, the
11
12 cells were lysed and their number was determined using the fluorometric CyQUANT
13
14 cell proliferation Assay Kit, which measures the DNA content using fluorescent dye
15
16 binding. A separate standard curve for each cell line was used to convert fluorescence
17
18 units to cell numbers. All measurements were performed in triplicate.
19
20
21
22
23
24

25 *Assay of cell cycle regulator genes expression:*

26
27 Colon cancer cells (HT29, SW1116 and HCT116) were plated on flat-bottom 24-well
28
29 plates at a density of 2×10^5 (HT29 and HCT116) or 4×10^5 (SW1116) cells per well
30
31 as described above. After 0, 48 and 96 hours of treatment with heparin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
32
33 and/or SB203580 inhibitor (5 μM), total RNA was isolated with the TRIzol method
34
35 (Gibco) and p21WAF1/cip1, p53 and cyclin D1 expression was determined utilizing
36
37 Real-time PCR analysis.
38
39
40
41
42

43 *Apoptosis and cell cycle analysis assay:*

44
45 **HT29, SW1116 and HCT116 cells were seeded in 12-well plates in the presence**
46
47 **of 10% FBS for 24 hours. The cells were serum starved for 24 hours whereupon**
48
49 **the medium was replaced with fresh supplemented with heparin at a**
50
51 **concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In the experiments using the SB203580 (5 μM)**
52
53 **inhibitor, cells were preincubated with the respective inhibitor for 1 hour before**
54
55 **the addition of heparin.** Apoptosis was quantified with annexin V-FITC and PI (BD
56
57 Pharminogen Cat.No. 556547) according to the manufacturer's instructions. Briefly,
58
59
60

1
2
3 cells were washed twice with cold PBS and then harvested in binding buffer (BB,
4 provided in the kit) at a concentration of 10^6 cells/ml. Annexin V-FITC (5 μ l) and PI
5 (5 μ l) were added in 100 μ l / 10^5 cells and incubated for 15 minutes at room
6 temperature in the dark. After the incubation, 400 μ l of BB was added and the cells
7 were analyzed at a Beckton-Dickinson FACSArray apparatus (Beckton-Dickinson,
8 Franklin Lakes, NJ) with the CELLQuest (Beckton-Dickinson). DNaseI (3 U/ml)
9 treated cells were used as a positive control. Flow cytometry was also used to analyze
10 cell cycle phase distribution. Following 48 hours of treatment, the cells were washed
11 and harvested in PBS. After centrifugation (5 minutes, 1200 rpm), the cell pellet was
12 resuspended in 1 ml of cold 1:1 mixture of PBS and McIlvaine's (0.2 M Na_2HPO_4 ,
13 0.1 M citric acid, pH 7.5) consecutively, two volumes of cold ethanol were added
14 drop by drop whereupon the cells were incubated for 1 hour at 4°C . The cells (10^6
15 cells/ml) were then centrifuged (10 minutes, 2000 rpm), washed with distilled water
16 and incubated in staining solution (PBS, 100 μ g/ml RNase A, 10 μ g/ml propidium
17 iodide) for 1 hour at 37°C . DNA content was measured at a Beckton-Dickinson
18 FACSArray apparatus. The sum of all cells in the cell cycle analysis was set to 100%
19 and the distribution into G0/G1, S and G2/M was determined.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 *Statistical analysis:*

47
48 The statistical significance was evaluated using the *t*-test and the one way completely
49 randomized variance analysis (ANOVA) using the Microcal Origin (version 5.0)
50 software. The independence / dependence between characteristics were tested at a
51 significant level of $p < 0.01$.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

60 **Results**

1
2
3 *Effect of specific MAPK inhibitors on heparin-stimulated colon cancer cell growth*

4
5
6 MAPKs intracellular pathways are crucial in the regulation of cell
7
8 proliferation (Kim *et al.* 2007; Roux *et al.* 2004; Welsh *et al.* 2006) and implicated in
9
10 colon cancer progression (Balmanno *et al.* 2008; Comes *et al.* 2007). We examined
11
12 the possible participation of MAPK cascade on heparin-induced colon cancer cell
13
14 growth by utilizing specific MAPK cascade inhibitors. SP600125, a specific inhibitor
15
16 of JNK; U0126, a specific inhibitor of MEK1/2, which is an upstream activator of
17
18 ERK1/2; as well as two independently-acting specific inhibitors of p38 (SB203580
19
20 and SB202190) were utilized in concentrations that did not affect cells
21
22 morphologically as verified by light microscopy (data not shown). The administration
23
24 of 5 μM of SP600125 or 30 μM of U0126 had no effect on heparin-induced HT29,
25
26 SW1116 and HCT116 cells' proliferation (Figure 1A-C). On the other hand, treatment
27
28 with the highly specific p38 kinase inhibitors, SB203580 and SB202190 at the
29
30 concentration of 5 μM , and SB203580 at the low concentration of 0.4 μM (Lali *et al.*,
31
32 2000) significantly inhibited their heparin-induced growth (Figure 1A-C) **but did not**
33
34 **have statistically significant effects on their basal cell proliferation (data not**
35
36 **shown). In order to establish the net heparin-induced growth effect the values of**
37
38 **the media growth rates were subtracted from just the heparin treated;**
39
40 **SP600125 (5 μM) were subtracted from the heparin-SP600125 (5 μM) co-**
41
42 **treatment; U0126 (30 μM) were subtracted from the heparin-U0126 (30 μM)**
43
44 **co-treatment; SB202190 (5 μM) were subtracted from the heparin-SB202190 (5**
45
46 **μM) co-treatment; and SB203580 (0.4 or 5 μM) were subtracted from the**
47
48 **heparin-SB203580 (0.4 or 5 μM) co-treatments and the resulting data expressed**
49
50 **as percentage of just heparin induced growth. DMSO vehicle controls**
51
52 demonstrated that this solvent under utilized conditions did not affect HT29, SW1116
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 and HCT116 cells' growth (Figure 1A-C). These results indicate that p38 MAPK
4
5 signaling is involved in the heparin-induced colon cancer proliferative response.
6
7
8
9

10 *Heparin modulates phospho-p38 activation*

11
12 In order to elucidate the effect of heparin on p38 signaling in HT29, SW1116
13 and HCT116 human colon cancer cell lines antibodies against total p38 protein
14
15 content (anti-p38) and phosphorylation levels (anti-pp38) were utilized. The anti-pp38
16
17 antibody, which specifically detects the phosphorylation of serin/tyrosine 181/182
18
19 residues, demonstrated that heparin in a dose-dependent manner stimulates p38
20
21 activation in HT29, SW1116 and HCT116 cells (Figure 2A, B). The increase in p38
22
23 MAPK phosphorylation was not related to changes in total p38 protein content as p38
24
25 protein expression was not affected (Figure 2A, B). These data demonstrate that
26
27 heparin induces activation of p38 in colon cancer cells. In control experiments, the
28
29 effect of heparin on p38 phosphorylation was examined in the presence of the highly
30
31 specific p38 kinase inhibitor, SB203580 (5 μ M) (Figure 2C, D) which abolished
32
33 heparin-induced p38 activation.
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 *Heparin regulates colon cancer cell cycle through a p38-dependent mechanism*

44
45 To characterize the molecular mechanisms involving the p38 pathway on the
46
47 heparin-induced colon cancer cell growth the expression of three cell cycle related
48
49 genes was analyzed. Initially, HT29, SW1116 and HCT116 cells were grown during
50
51 96 hours (at which point they reached growth arrest) and p21WAF1/cip1, p53 and
52
53 cyclin D1 expression was evaluated at 0, 48 and 96 hours points (Figure 3). Real-time
54
55 PCR analysis demonstrated that p21WAF1/cip1 and p53 transcript expression was
56
57 significantly increased at the 48 and 96 hour time point ($p < 0.001$) whereas the levels
58
59
60

1
2
3 of the cyclin D1 transcripts were significantly decreased ($p < 0.001$) as compared to
4
5 the 0 hour time point for the three cell lines. These results demonstrate that the
6
7 expression of examined cell cycle related genes correlates well with HT29, SW1116
8
9 and HCT116 cells growth curves. To investigate the possible effect of heparin on
10
11 p21WAF1/cip1, p53 and cyclin D1 expression, HT29, SW1116 and HCT116 cells
12
13 were treated with heparin, SB203580 (5 μ M) or their combination during 48 hours
14
15 and p21WAF1/cip1, p53 and cyclin D1 mRNA and protein expression was analyzed.
16
17 Heparin in a p38-dependent manner modulated p21WAF1/cip1, p53 and cyclin D1
18
19 expression. Specifically, p21WAF1/cip1 and p53 transcripts and protein levels were
20
21 strongly reduced in all three cell lines ($p < 0.001$), whereas cyclin D1 expression both
22
23 at mRNA and protein level was significantly increased in the presence of heparin ($p <$
24
25 0.001) (Figure 4A-C). Furthermore, the cell cycle distribution of HT29 and HCT116
26
27 cells under heparin (100 μ g/ml) and/or SB203580 (5 μ M) treatment was analyzed by
28
29 flow cytometry. Heparin treatment caused a significant increase in the percentage of
30
31 HT29 and HCT116 cells in S phase of the cell cycle ($p < 0.001$), an effect which was
32
33 inhibited when the cells were co-treated with the p38 inhibitor SB203580 (Figure
34
35 4D). The cell cycle analysis of SW1116 cells could not be reproducibly determined by
36
37 FACS analysis due to their tendency to form clusters. Collectively, these results
38
39 suggest that heparin is involved in the transcriptional control of cell cycle genes
40
41 through a p38-dependent mechanism.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 *Effect of heparin on colon cancer cell apoptosis*

54
55 p38 MAPK is defined as a key cellular check-point in the cascade leading to
56
57 colon cancer cell apoptosis (Comes *et al.* 2007). A specific apoptosis assay was
58
59 utilized to assess rates of apoptosis in colon cancer cells treated with a p38 inhibitor
60

1
2
3 (SB203580, 5 μ M), heparin (100 μ g/ml) or their combination (Figure 5A). FACS
4
5 analysis demonstrates that at the 48 hours time point the apoptotic rates of HT29 and
6
7 HCT116 colon cancer cells were not affected by heparin treatment. Since the
8
9 apoptosis of SW1116 cells could not be reproducibly determined by FACS analysis
10
11 due to their tendency to form clusters when harvested mechanically, western blot
12
13 analysis was used to examine the cleavage of caspase 3, a key mediator of apoptosis
14
15 of mammalian cells. As shown in Figure 5B, SB203580 and heparin/SB203580
16
17 treatment resulted in increased cleaved caspase 3 protein expression in SW1116 cells,
18
19 which correlates well with the FACS analysis results for HT29 and HCT116 cells.
20
21
22
23
24
25

26 *Effect of EGFR-mediated signaling on heparin-stimulated colon cancer cell growth*

27
28
29 Previously, heparan sulfate has been specifically implicated to stimulate colon
30
31 cancer cell growth through the EGFR signaling pathways (Fishman *et al.* 2002).
32
33 Therefore, gefitinib, a specific inhibitor of the PTK activity of EGFR, was utilized to
34
35 address the possibility that heparin-stimulated colon cancer cell growth may be
36
37 dependent on EGFR signaling. Pilot experiments showed that gefitinib treatment
38
39 inhibited dose-dependently basal EGFR phosphorylation in HT29 and SW1116 cell
40
41 lines (Figure 6A, B). The addition of gefitinib at the concentration of 10 μ M abolished
42
43 EGF-stimulated HT29 and SW1116 cell growth (Figure 6C), whereas heparin in the
44
45 presence of gefitinib stimulated the growth of HT29 and SW1116 cell lines to the
46
47 same level as that of the just heparin-treated control (Figure 6C). Since, gefitinib had
48
49 a toxic effect on HCT116 cells, as indicated by their decreased basal proliferation
50
51 level and the semiquantitative method of trypan blue dye exclusion assay (%
52
53 cytotoxicity: 45.8% gefitinib 0.1 μ M, 58% gefitinib 1 μ M, 71.4% gefitinib 10 μ M),
54
55
56
57
58
59
60 the role of EGFR signaling on the heparin-induced cell growth could not be estimated

1
2
3 (Figure 6C). **The basal proliferation levels of HT29 and SW1116 cells were not**
4 **affected by gefitinib treatment as demonstrated by the cell proliferation assay**
5 **(Figure 6C) and verified with the trypan blue dye exclusion assay (data not**
6 **shown).** These data indicate that the heparin-induced effect on human colon cancer
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

Site-specific metastasis is strongly dependent on the local environment prevalent in the organ to be colonized by metastatic tumor cells, in particular the extracellular matrix (ECM) of these organs (Pupa *et al.* 2002; Kouniavsky *et al.* 2002, Radisky *et al.* 2001). The organ-specific ECM may have either a stimulatory or an inhibitory effect on tumor cell proliferation (Zvibel *et al.* 2001). Proteoglycans / glycosaminoglycans are key ECM molecules which have been shown to affect the survival and proliferation of cancer cells (Fjeldstad *et al.* 2005; Nikitovic *et al.* 2008). Previously, hepatocyte-derived HS was found to stimulate colon cancer cell proliferation *in vitro* (Zvibel *et al.* 2001). In a recent study, we have shown that heparin dose-dependently stimulates HT29, SW1116 and HCT116 cells' growth (Chatzinikolaou *et al.* 2008). Furthermore, in liver-colonizing colon cell lines HS disaccharides were found to stimulate the growth of weakly metastatic and to inhibit the growth of strongly metastatic colon cancer cell lines on fibronectin substrate depending on their structure and sulfation pattern (Fishman *et al.* 2002). These data highlight the importance of HS-dependent pathways on colon cancer cell growth and metastasis.

1
2
3 In view of the fact that MAPKs signaling involvement on colon cancer cell
4 growth is well established (Balmanno *et al.* 2008; Tong *et al.* 2007; Comes *et al.*
5 2007; Welsh *et al.* 2006), three major MAPK pathways, JNK, ERK1/2 and p38, were
6 examined for their participation on the mitogenic effect of heparin. Heparin-
7 stimulated HT29, SW1116 and HCT116 colon cancer cell proliferation was inhibited
8 by p38 inhibition, while it was not modulated by the MEK1/2 or JNK inhibition, thus
9 demonstrating that the mitogenic effect of heparin is perpetrated through p38 MAPK
10 signaling. Previously, p38 MAPK pathway has been established as a central mediator
11 of colorectal cancer cell homeostasis involved in processes such as proliferation,
12 differentiation and cell death (Comes *et al.* 2007; Cheung *et al.* 2008; Corona *et al.*
13 2007; Sun *et al.* 2005). Thus, treatment with the SB202190 inhibitor specific for
14 p38 α/β kinases causes cell cycle arrest; autophagy and cell death of colon cancer cells
15 (Comes *et al.* 2007). In another study, olive oil polyphenols were found to inhibit p38
16 phosphorylation initiating anti-proliferative effects in human colon adenocarcinoma
17 cells (Corona *et al.* 2007). In contrast, PEITC induces G1 cell cycle arrest through the
18 activation of p38 pathway which appears to involve the modulation of major colon
19 cancer cell cycle regulators expression (Cheung *et al.* 2008). These data therefore,
20 indicate that the relationship of p38 MAPK pathway with cell cycle arrest,
21 proliferation and apoptosis is complicated and may be dependent on the cellular
22 context, cell type and stimuli.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 In the present study, the effect of heparin on cyclin D1, p21WAF1/cip1 and
51 p53 cell-cycle related genes important in colon cancer progression, was examined.
52 Cyclin D1 is an oncogene that drives G1/S cell cycle progression in a manner
53 dependent on extracellular stimuli (Matsushima *et al.* 1991). The expression of cyclin
54 D1 has been correlated to colon cancer cell malignant transformation and resistance to
55
56
57
58
59
60

1
2
3 chemotherapy (Liao *et al.* 2007). Cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/cip1
4
5 involved in the control of G1/S and G2/M transitions is suggested to have a key role
6
7 in the regulation of colon cancer cell proliferation (Wilson *et al.* 2008), whereas p53
8
9 tumor suppressor protein exerts its growth inhibitory activity by activating and
10
11 interacting with diverse signaling pathways and deregulation of its activity supports
12
13 tumor progression [Damia *et al.* 2004). Our results demonstrate that heparin through a
14
15 p38-dependent mechanism modulates the mRNA and protein expression of these key
16
17 cell cycle regulators in a manner supportive of colon cancer cell proliferation.
18
19 Furthermore, heparin treatment caused a significant increase in the percentage of
20
21 HT29 and HCT116 cells in the S phase of the cell cycle, an effect which was inhibited
22
23 when the cells were co-treated with the p38 inhibitor SB203580. The results indicated
24
25 that heparin promoted cell cycle progression in cells with increased S-phase entry.
26
27
28
29
30

31
32 Colon cancer cell growth and metastasis is well established to depend on the
33
34 glycosaminoglycan content of the surrounding ECM. Therefore this study proposes a
35
36 novel mechanism directly linking the extracellular glycosaminoglycan, heparin, with
37
38 the regulation of colon cancer cell cycle.
39
40

41
42 Cancer results from an imbalance between cell proliferation, differentiation
43
44 and apoptosis (Raff 1992). Previously, p38 MAPK-dependent pathways have been
45
46 determined to support colon cancer proliferation and survival and to confer these cells
47
48 with protection against autophagy and apoptosis (Comes *et al.* 2007; Chiacchiera *et*
49
50 *al.* 2008). In this study, treatment with heparin did not appear to affect colon cancer
51
52 cell apoptosis rates. Therefore, the observed effect of heparin on colon cancer cell
53
54 growth is most likely perpetrated through the demonstrated modulation of cell cycle
55
56 regulators expression.
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Previous studies have shown that HS chains secreted by liver cells, as well as exogenous HS disaccharides, stimulated the proliferation of colon cancer cells through a mechanism involving increased expression of tyrosine kinase receptors of the erbB family (Zvibel *et al.* 1998; Zvibel *et al.* 1998; Fishman *et al.* 2002). The possibility that EGFR signaling affects heparin-induced colon cancer cell proliferation was examined using an EGFR tyrosine kinase inhibitor, gefitinib. The combined treatment of HT29 and SW1116 human colon cancer cell lines with gefitinib and heparin demonstrated that the heparin-induced effect on these cells' growth is not dependent on EGFR signaling. On the other hand, gefitinib had a toxic effect on HCT116 cells disabling us to evaluate the role of EGFR signaling on heparin-induced growth of these cells. Previously, EGFR activation was shown to be dependent on fine HS structure (Fishman *et al.* 2002). The lack of EGFR involvement in the heparin-induced effect demonstrated in this study could well be correlated to the disaccharide sequence and fine sulfation pattern of the utilized heparin preparation as previously shown in other model systems (Nikitovic *et al.* 2008). Furthermore, the authors can not exclude the possibility that specific organ-derived HS chains may utilize the demonstrated in this study p38 MAP kinase-dependent pathway to regulate colon cancer cell growth.

In conclusion, these novel results demonstrate that an extracellular glycosaminoglycan, heparin, may modulate the expression of genes crucial to colon cancer cell cycle regulation, promoting increased S-phase entry through the specific activation of the p38 MAP kinase. Furthermore, the discovery of heparin-mediated p38 MAPK pathway on colon cancer cells growth may provide a target for future effective therapy.

Acknowledgements

The excellent scientific and technical advice by Dr I. Charalampopoulos and Mr I. Lazaridis from Dept. of Pharmacology, School of Medicine, University of Crete is gratefully acknowledged. This research project (PENED) is cofinanced by E.U.-European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%).
Grant Number: KA2337.

For Review Only

References

Au YP, Kenagy RD, Clowes MM, Clowes AW (1993) Mechanisms of inhibition by heparin of vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Haemostasis* **23**, 177-182.

Balmanno K, Cook SJ (2008) Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ.* PMID: 18846109.

Chatzinikolaou G, Nikitovic D, Asimakopoulou A, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN (2008) Heparin--a unique stimulator of human colon cancer cells' growth. *IUBMB Life* **60**, 333-340.

Cheung KL, Khor TO, Yu S, Kong AN (2008) PEITC induces G1 cell cycle arrest on HT-29 cells through the activation of p38 MAPK signaling pathway. *Aaps J.* **10**, 277-281.

Chiacchiera F, Simone C (2008) Signal-dependent regulation of gene expression as a target for cancer treatment: inhibiting p38alpha in colorectal tumors. *Cancer Lett.* **265**, 16-26.

Comes F, Matrone A, Lastella P, Nico B, Susca FC, Bagnulo R, Ingravallo G, Modica S, Lo Sasso G, Moschetta A, Guanti G, Simone C (2007) A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ.* **14**, 693-702.

Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessi MA, Spencer JP (2007) Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 606-611.

Damia G, Brogгинi M (2004) Cell cycle checkpoint proteins and cellular response to treatment by anticancer agents. *Cell Cycle* **3**, 46-50.

1
2
3 Ding XZ, Adrian TE (2001) MEK/ERK-mediated proliferation is negatively regulated
4 by P38 map kinase in the human pancreatic cancer cell line, PANC-1. *Biochem.*

5
6
7 *Biophys. Res. Commun.* **282**, 447-453.
8

9
10 Ferrao AV, Mason RM (1993) The effect of heparin on cell proliferation and type-I
11 collagen synthesis by adult human dermal fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1180**,
12 225-230.
13
14

15
16
17 Fishman S, Brill S, Papa M, Halpern Z, Zvibel I (2002) Heparin-derived disaccharides
18 modulate proliferation and Erb-B2-mediated signal transduction in colon cancer cell
19 lines. *Int. J. Cancer* **99**, 179-184.
20
21
22

23
24
25 Fjeldstad K, Kolset SO (2005) Decreasing the metastatic potential in cancers--
26 targeting the heparan sulfate proteoglycans. *Curr. Drug Targets* **6**, 665-682.
27
28

29
30 Flint N, Cove FL, Evans GS (1994) Heparin stimulates the proliferation of intestinal
31 epithelial cells in primary culture. *J. Cell Sci.* **107**, 401-411.
32
33

34
35 Hausser HJ, Brenner RE (2004) Low doses and high doses of heparin have different
36 effects on osteoblast-like Saos-2 cells in vitro. *J. Cell Biochem.* **91**, 1062-1073.
37
38

39
40 Hecquet C, Lefevre G, Valtink M, Engelmann K, Mascarelli F (2003) Activation and
41 role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelium cells: JNK1,
42 P38 kinase, and cell death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 1320-1329.
43
44
45

46
47 Igarashi M, Yamaguchi H, Hirata A, Daimon M, Tominaga M, Kato T (2000) Insulin
48 activates p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase via a MAP kinase kinase
49 (MKK) 3/MKK 6 pathway in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Clin. Invest.* **30**,
50 668-677.
51
52
53

54
55
56 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008) Cancer
57 statistics, 2008. *CA Cancer J. Clin.* **58**, 71-96.
58
59
60

1
2
3 Juretic N, Santibanez JF, Hurtado C, Martinez J (2001) ERK 1,2 and p38 pathways
4 are involved in the proliferative stimuli mediated by urokinase in osteoblastic SaOS-2
5 cell line. *J. Cell Biochem.* **83**, 92-98.
6
7

8
9
10 Kim CS, Kim JM, Nam SY, Yang KH, Jeong M, Kim HS, Lim YK, Kim CS, Jin
11 YW, Kim J (2007) Low-dose of ionizing radiation enhances cell proliferation via
12 transient ERK1/2 and p38 activation in normal human lung fibroblasts. *J. Radiat. Res.*
13 **48**, 407-415.
14
15
16

17
18
19 Kouniavsky G, Khaikin M, Zvibel I, Zippel D, Brill S, Halpern Z, Papa M (2002)
20 Stromal extracellular matrix reduces chemotherapy-induced apoptosis in colon cancer
21 cell lines. *Clin. Exp. Metastasis* **19**, 55-60.
22
23
24

25
26 Lali FV, Hunt AE, Turner SJ, Foxwell BM (2000) The pyridinyl imidazole inhibitor
27 SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase
28 B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-
29 stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol.*
30 *Chem.* **275**, 7395-402.
31
32
33
34

35
36
37 Liao DJ, Thakur A, Wu J, Biliran H, Sarkar FH (2007) Perspectives on c-Myc, Cyclin
38 D1, and their interaction in cancer formation, progression, and response to
39 chemotherapy. *Crit. Rev. Oncog.* **13**, 93-158.
40
41
42

43
44 Lim SJ, Lee YJ, Lee E (2006) p38MAPK inhibitor SB203580 sensitizes human SNU-
45 C4 colon cancer cells to exisulind-induced apoptosis. *Oncol. Rep.* **16**, 1131-1135.
46
47
48

49
50 Lyon M, Deakin JA, Gallagher JT (1994) Liver heparan sulfate structure. A novel
51 molecular design. *J. Biol. Chem.* **269**, 11208-11215.
52
53

54
55 Lyon M, Deakin JA, Mizuno K, Nakamura T, Gallagher JT (1994) Interaction of
56 hepatocyte growth factor with heparan sulfate. Elucidation of the major heparan
57 sulfate structural determinants. *J. Biol. Chem.* **269**, 11216-11223.
58
59
60

1
2
3 Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ (1991) Colony-stimulating factor
4 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* **65**, 701-713.

5
6 Maurer AM, Han ZC, Dhermy D, Briere J (1994) Glycosaminoglycans enhance
7 human leukemic cell growth in vitro. *Leuk. Res.* **18**, 837-842.

8
9
10
11
12 McMullen ME, Bryant PW, Glembotski CC, Vincent PA, Pumiglia KM (2005)
13 Activation of p38 has opposing effects on the proliferation and migration of
14 endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 20995-21003.

15
16
17
18
19 Naomoto Y, Takaoka M, Okawa T, Nobuhisa T, Gunduz M, Tanaka N (2005) The
20 role of heparanase in gastrointestinal cancer. *Oncol. Rep.* **14**, 3-8.

21
22
23
24
25 Nebreda AR, Porras A (2000) p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends*
26 *Biochem. Sci.* **25**, 257-260.

27
28
29
30 Nikitovic D, Assouti M, Sifaki M, Katonis P, Krasagakis K, Karamanos NK,
31 Tzanakakis GN (2008) Chondroitin sulfate and heparan sulfate-containing
32 proteoglycans are both partners and targets of basic fibroblast growth factor-mediated
33 proliferation in human metastatic melanoma cell lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**,
34 72-83.

35
36
37
38
39
40 Nikitovic D, Berdiaki K, Chalkiadaki G, Karamanos N, Tzanakakis G (2008) The role
41 of SLRP-proteoglycans in osteosarcoma pathogenesis. *Connect. Tissue Res.* **49**, 235-
42 238.

43
44
45
46
47
48 Nikitovic D, Zafiropoulos A, Tzanakakis GN, Karamanos NK, Tsatsakis AM (2005)
49 Effects of glycosaminoglycans on cell proliferation of normal osteoblasts and human
50 osteosarcoma cells depend on their type and fine chemical compositions. *Anticancer*
51 *Res.* **25**, 2851-2856.

52
53
54
55
56
57
58
59
60 Nobuhisa T, Naomoto Y, Ohkawa T, Takaoka M, Ono R, Murata T, Gunduz M,
Shirakawa Y, Yamatsuji T, Haisa M, Matsuoka J, Tsujigiwa H, Nagatsuka H,
Nakajima M, Tanaka N (2005) Heparanase expression correlates with malignant
potential in human colon cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **131**, 229-237.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Ottlinger ME, Pukac LA, Karnovsky MJ (1993) Heparin inhibits mitogen-activated protein kinase activation in int act rat vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 19173-19176.

Peretti T, Waisberg J, Mader AM, de Matos LL, da Costa RB, Conceicao GM, Lopes AC, Nade HB, Pinhal MA (2008) Heparanase-2, syndecan-1, and extracellular matrix remodeling in colorectal carcinoma. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **20**, 756-765.

Pupa SM, Menard S, Forti S, Tagliabue E (2002) New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J. Cell Physiol.* **192**, 259-267.

Rabenstein DL (2002) Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 312-331.

Radisky D, Hagios C, Bissell MJ (2001) Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin. Cancer Biol.* **11**, 87-95.

Raff MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**, 397-400.

Rougier P, Mitry E (2003) Epidemiology, treatment and chemoprevention in colorectal cancer. *Ann. Oncol.* **14**, 3-5.

Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 320-344.

Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225.

Sun Y, Sinicrope FA (2005) Selective inhibitors of MEK1/ERK44/42 and p38 mitogen-activated protein kinases potentiate apoptosis induction by sulindac sulfide in human colon carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 51-59.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Tong C, Yin Z, Song Z, Dockendorff A, Huang C, Mariadason J, Flavell RA, Davis RJ, Augenlicht LH, Yang W (2007) c-Jun NH2-terminal kinase 1 plays a critical role in intestinal homeostasis and tumor suppression. *Am. J. Pathol.* **171**, 297-303.

Tong WG, Ding XZ, Talamonti MS, Bell RH, Adrian TE (2005) LTB4 stimulates growth of human pancreatic cancer cells via MAPK and PI-3 kinase pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**, 949-956.

Welsh DJ, Scott PH, Peacock AJ (2006) p38 MAP kinase isoform activity and cell cycle regulators in the proliferative response of pulmonary and systemic artery fibroblasts to acute hypoxia. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **19**, 128-138.

Westergren-Thorsson G, Persson S, Isaksson A, Onnervik PO, Malmstrom A, Fransson LA (1993) L-iduronate-rich glycosaminoglycans inhibit growth of normal fibroblasts independently of serum or added growth factors. *Exp. Cell Res.* **206**, 93-99.

Wilson AJ, Byun DS, Nasser S, Murray LB, Ayyanar K, Arango D, Figueroa M, Melnick A, Kao GD, Augenlicht LH, Mariadason JM (2008) HDAC4 promotes growth of colon cancer cells via repression of p21. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4062-4075.

Wu WK, Shin VY, Ye YN, Wong HP, Huang FY, Hui MK, Lam EK, Cho CH (2006) Heparin increases human gastric carcinoma cell growth. *Anticancer Res.* **26**, 439-443.

Yu L, Quinn DA, Garg HG, Hales CA (2006) Gene expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and effect of heparin on their expression in mice with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 1565-1572.

Zhai W, Eynott PR, Oltmanns U, Leung SY, Chung KF (2004) Mitogen-activated protein kinase signalling pathways in IL-1 beta-dependent rat airway smooth muscle proliferation. *Br. J. Pharmacol.* **143**, 1042-1049.

Zigrino P, Loffek S, Mauch C (2005) Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochimie* **87**, 321-328.

1
2
3
4
5 Zvibel I, Brill S, Halpern Z, Moskovitz S, Yayon A, Papa M (2001) Soluble and
6 matrix-associated heparan sulfate proteoglycans increase expression of erb-B2 and
7 erb-B3 in colon cancer cell lines. *Int. J. Cancer* **91**, 316-321.
8
9

10
11 Zvibel I, Brill S, Halpern Z, Papa M (1998) Hepatocyte extracellular matrix
12 modulates expression of growth factors and growth factor receptors in human colon
13 cancer cells. *Exp. Cell Res.* **245**, 123-131.
14
15
16
17

18
19 Zvibel I, Halpern Z, Papa M (1998) Extracellular matrix modulates expression of
20 growth factors and growth-factor receptors in liver-colonizing colon-cancer cell lines.
21 *Int. J. Cancer* **77**, 295-301.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure legends

Figure 1. Effect of MAPK inhibitors treatment on heparin-induced colon cancer cell proliferation. HT29 (A), SW1116 (B) and HCT116 (C) human colon cancer cell lines were treated with SP600125 (5 μ M), U0126 (30 μ M), SB202190 (5 μ M) and SB203580 (0.4 or 5 μ M) (JNK, MEK1/2 and p38 MAPK inhibitors, respectively) or the MAPK inhibitors in combination with heparin (100 μ g/ml). **In order to establish the net heparin-induced growth effect the values of the media growth rates were subtracted from just the heparin treated; SP600125 (5 μ M) were subtracted from the heparin-SP600125 (5 μ M) co-treatment; U0126 (30 μ M) were subtracted from the heparin-U0126 (30 μ M) co-treatment; SB202190 (5 μ M) were subtracted from the heparin-SB202190 (5 μ M) co-treatment; and SB203580 (0.4 or 5 μ M) were subtracted from the heparin-SB203580 (0.4 or 5 μ M) co-treatments and the resulting data expressed as percentage of just heparin induced growth.** Also presented are the DMSO vehicle controls. The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm SEM plotted; statistical significance: *** $p < 0.001$ compared to control and the DMSO vehicle.

Figure 2. Effect of heparin on human colon cancer cell p38 activation. (A) Western blot analysis of pp38 activation in HT29, SW1116 and HCT116 cells treated with 50 and 100 μ g/ml heparin. (B) The bands, from three separate experiments, were quantified utilising image analysis software (ImageJ 1.4.3.67 Launcher Symmetry Software) and used to calculate the ratio of phosphorylated p38/total p38 (pp38/p38). (C) Activation of pp38 in colon cancer cells treated with heparin (100 μ g/ml) in combination with SB203580 (5 μ M) and (D) densitometric analysis of the resulting bands. Representative blots are presented. Means \pm SEM plotted.

Figure 3. Analysis of p21WAF1/cip1, p53 and cyclin D1 mRNA expression during 96 hours. p21WAF1/cip1, p53 and cyclin D1 mRNA expression in human colon cancer (HT29, SW1116 and HCT116) cells after 0, 48 and 96 hours of serum starvation, as determined by real-time PCR Means \pm SE plotted; $n=3$. Statistical significance: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to 0 hours control.

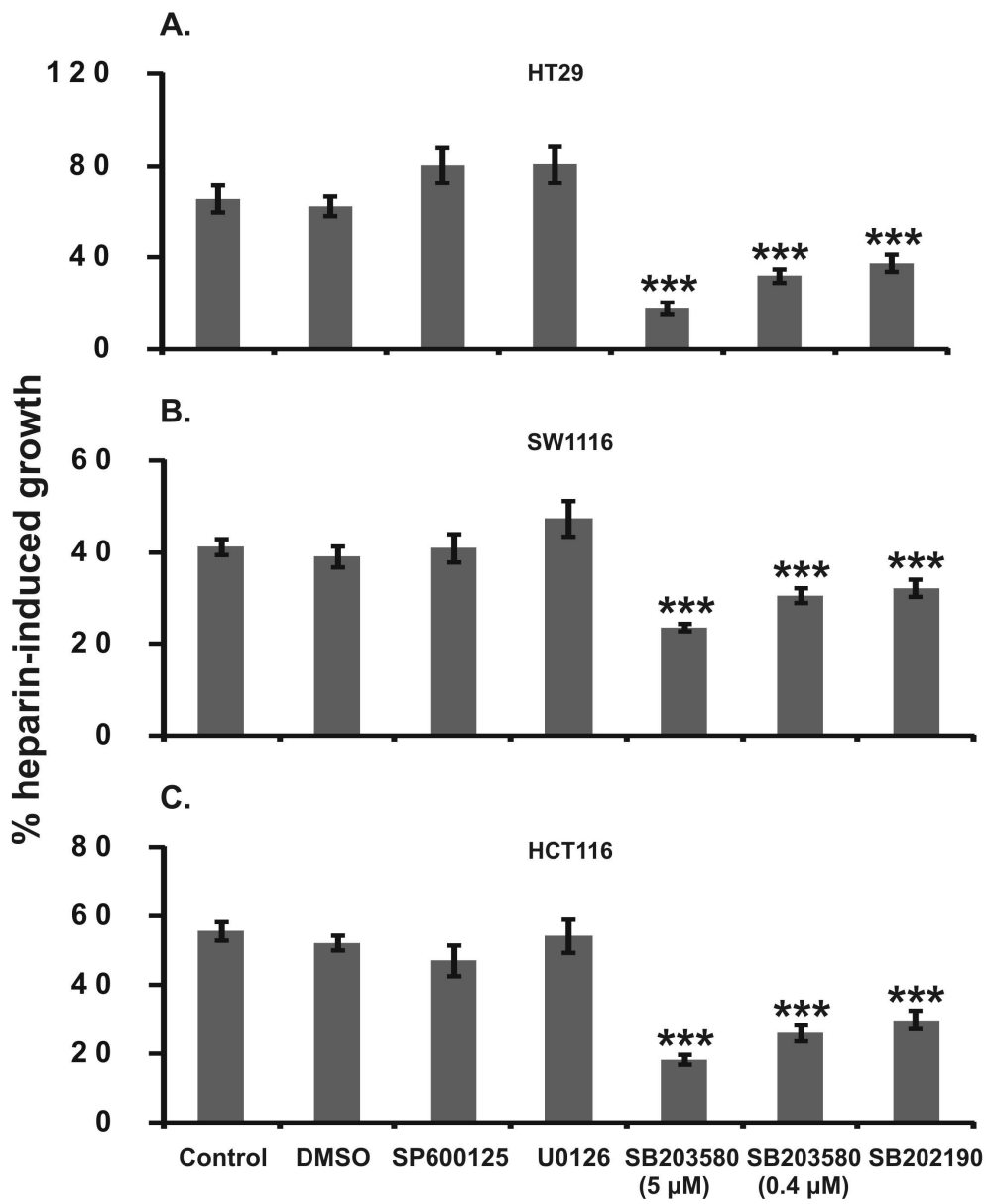
Figure 4. Effect of heparin on human colon cancer cell cycle. p21WAF1/cip1, p53 and cyclin D1 mRNA and protein expression in HT29, SW1116 and HCT116 colon cancer cells treated with heparin (H) (100 μ g/ml), SB203580 (SB) (5 μ M) or their combination (SB+H)

1
2
3 for 48 hours, as determined by real-time PCR (A) and western blot (B) analysis. (C) The
4 bands were densitometrically analyzed and the ratio of p53, p21 and cyclin D1/actin are
5 presented. (D) Cell cycle distribution of HT29 and HCT116 cells after 48 hours treatment
6 with heparin (100 $\mu\text{g/ml}$) and/or SB203580 (5 μM), as determined by propidium iodine
7 staining and subsequent FACS analysis. The percentage of cells in G0/G1, S and G2/M
8 phases are indicated. Means \pm SE plotted; n=3. Statistical significance: ***p < 0.001
9 compared to respective control (C) **and SB203580 treatment: ** p < 0.01, *** p < 0.001**
10 **heparin as compared to heparin/SB203580.**
11
12
13
14
15
16
17
18

19 **Figure 5. Effect of heparin on colon cancer cell apoptosis.** (A) Apoptotic effect of heparin
20 (100 $\mu\text{g/ml}$), SB203580 inhibitor (5 μM) or their combination on HT29, SW1116 and
21 HCT116 cells after 48 hours of treatment, as determined by annexin V/propidium iodine
22 staining of apoptotic cells and subsequent FACS analysis. DNaseI (3 U/ml) treated cells were
23 used as a positive control. The apoptosis rates were calculated and expressed as percentage of
24 cells stained with annexin. (B) Expression of cleaved caspase 3 protein after 48 hours of
25 heparin and/or SB203580 treatment in SW1116 cells, as determined by western blotting, and
26 the ratio of cleaved caspase 3/actin measured after digital image analysis. Means \pm SEM
27 plotted.
28
29
30
31
32
33
34

35 **Figure 6. Effect of EGFR-mediated signaling on heparin-stimulated colon cancer cell**
36 **growth.** (A) Serum-starved HT29 and SW1116 cells treated with 0, 0.1, 1 and 10 μM of
37 gefitinib were lysed and equal amounts of protein/lysate were analyzed for phosphorylated
38 EGFR by western blotting and (B) the ratio of phosphorylated EGFR/actin measured after
39 digital image analysis. (C) Effects of EGF (50 ng/ml), heparin (100 $\mu\text{g/ml}$), gefitinib (10 μM)
40 treatment or their combination on HT29, SW1116 and HCT116 colon cancer cells' growth.
41 The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm SEM
42 plotted; statistical significance: ***p < 0.001.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



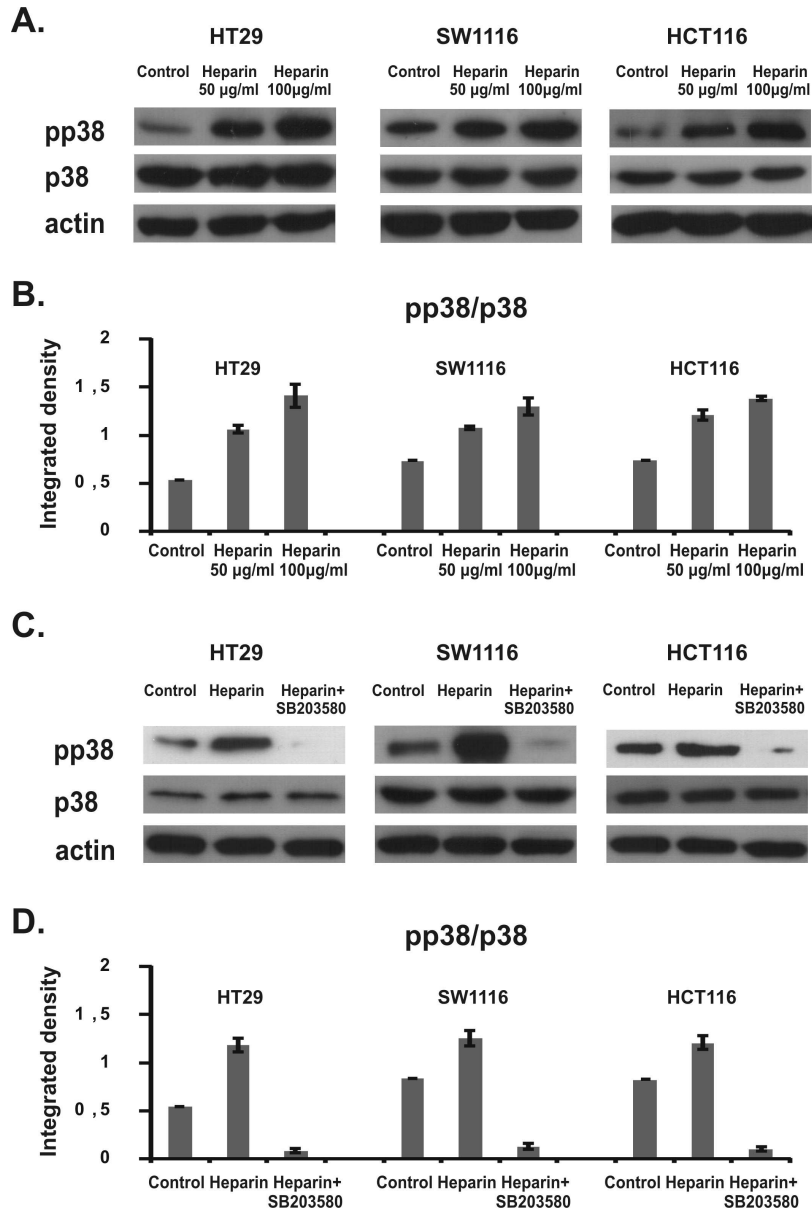


Figure 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

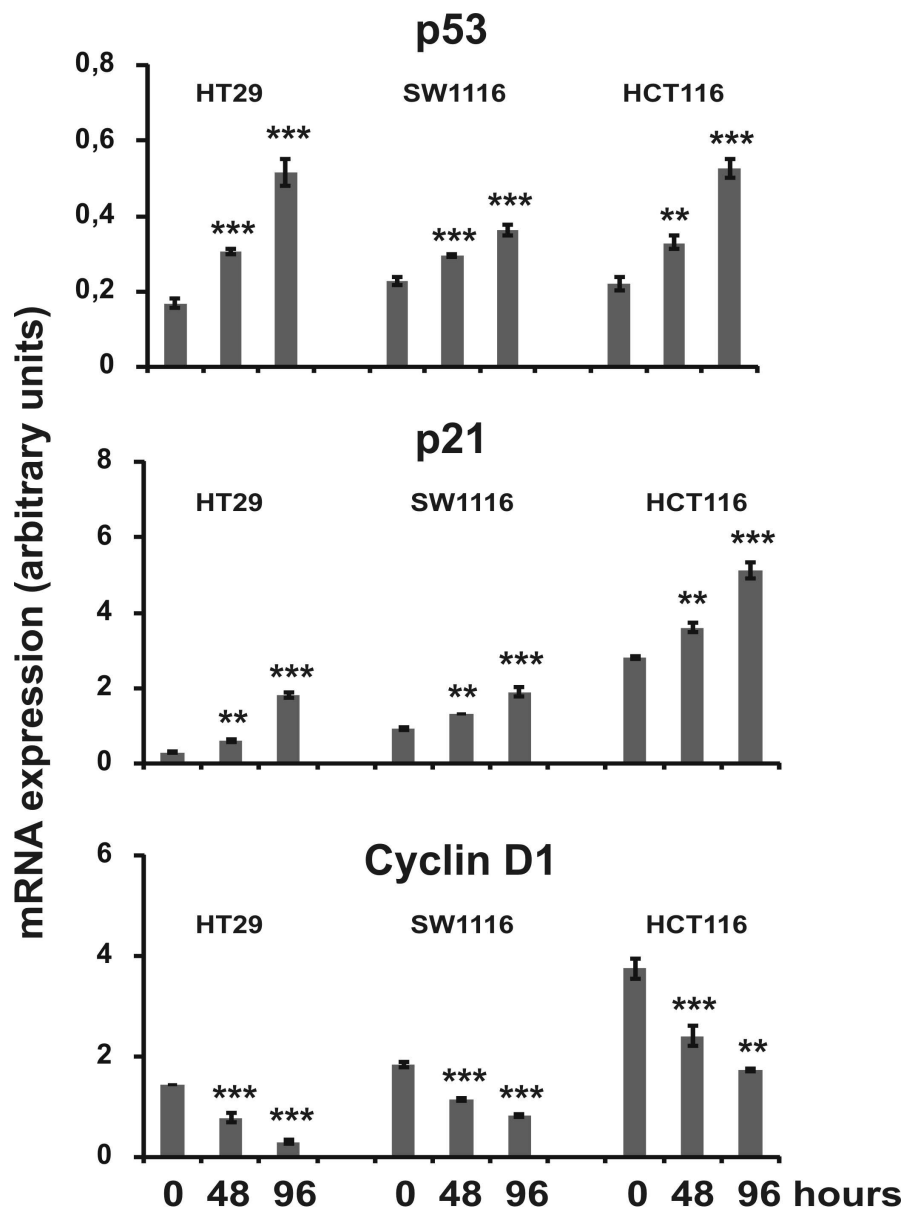
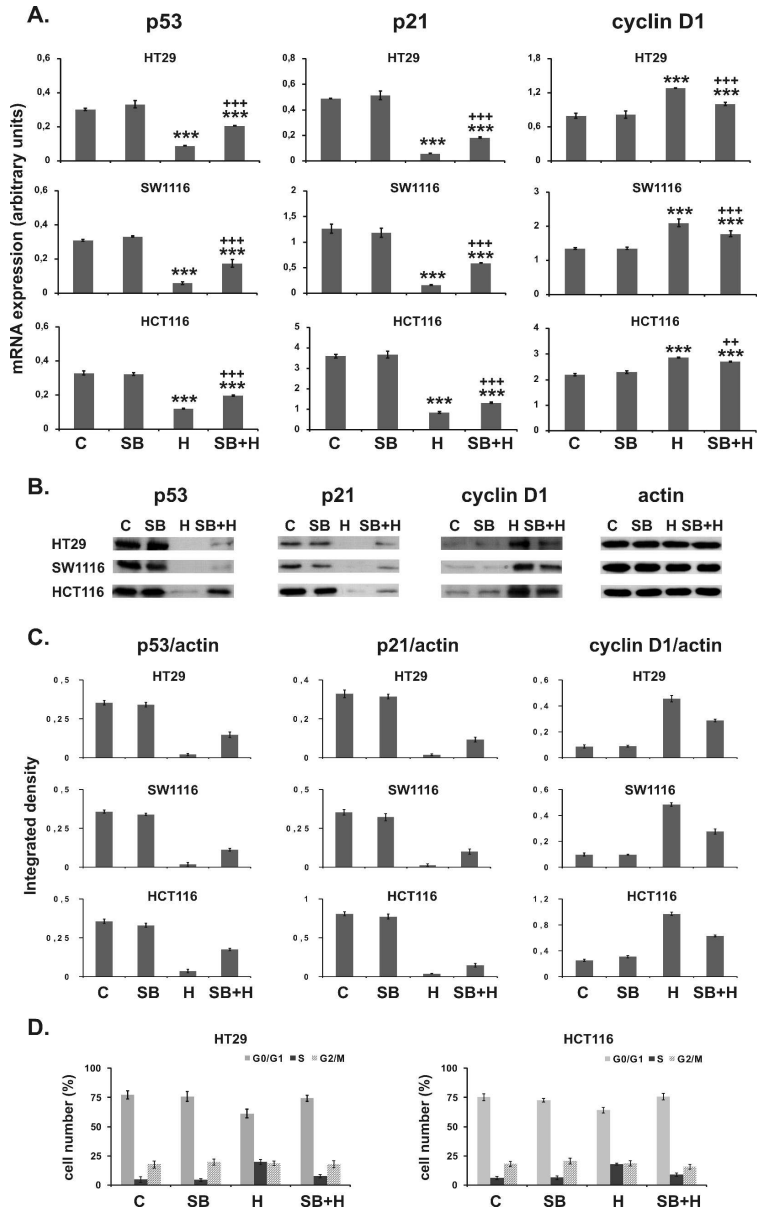
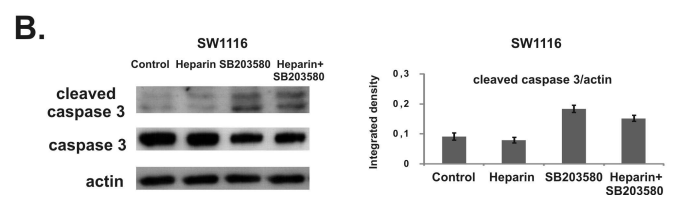
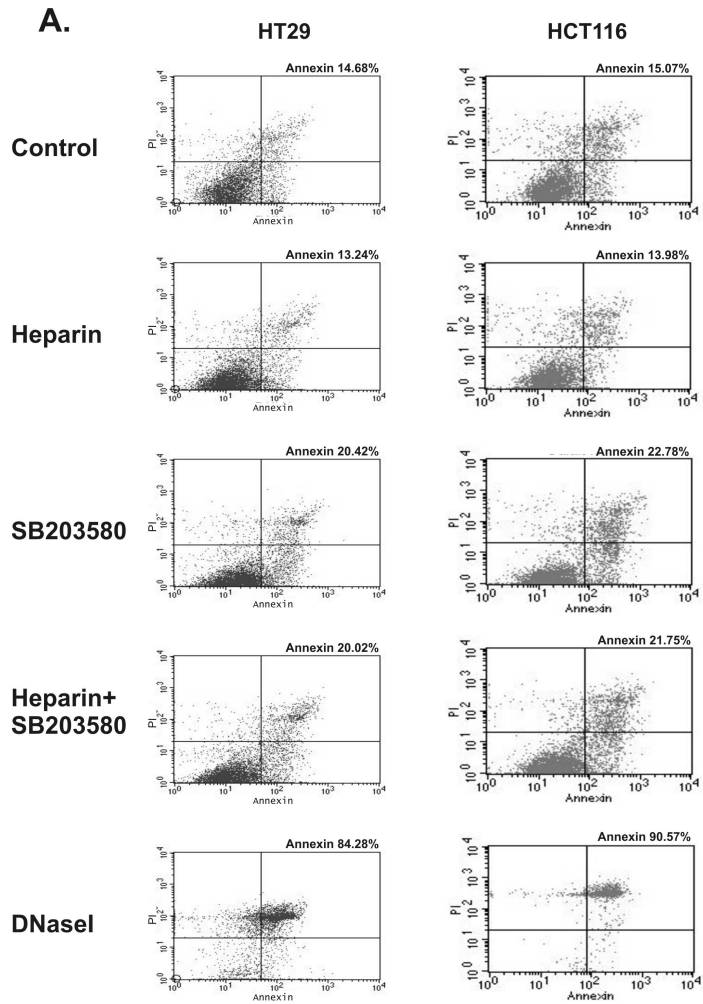


Figure 3



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



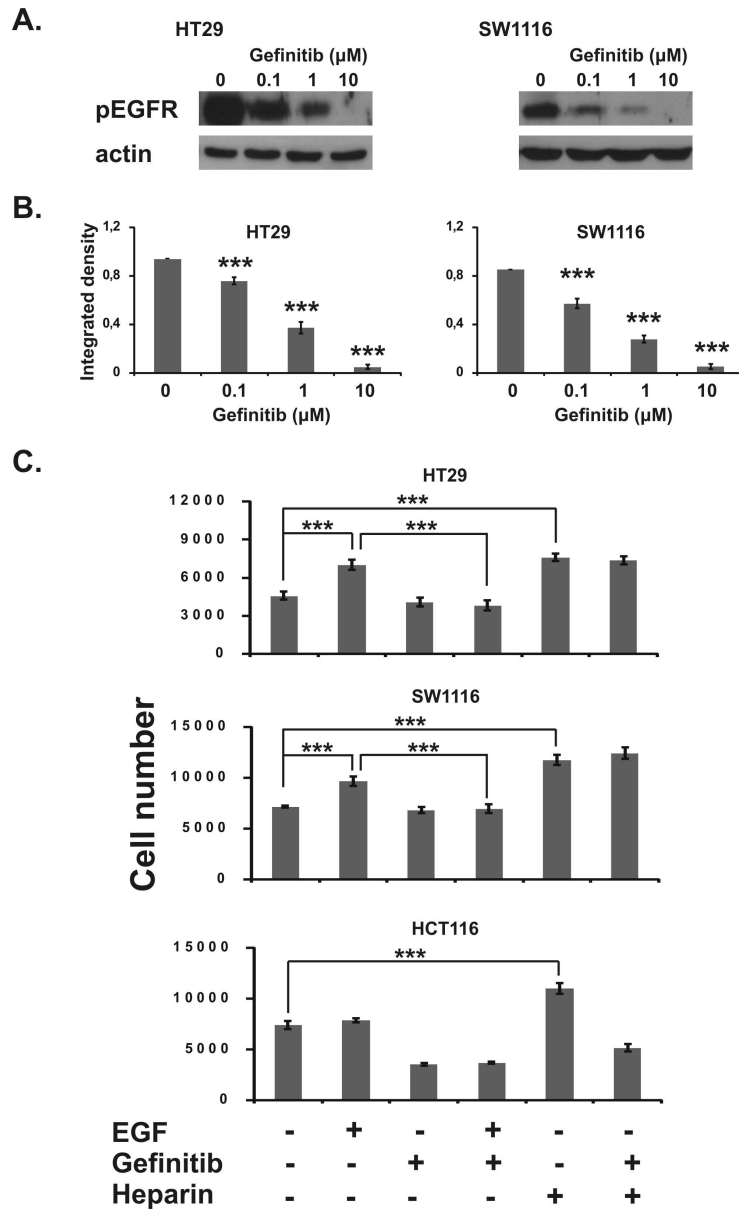


Figure 6

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60