

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η
Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

In vitro μελέτη της δράσης αυξητικών παραγόντων και κινάσης της τυροσίνης στην οργάνωση του εξωκυττάριου δικτύου κυτταρικών σειρών οστεοσαρκώματος.

Dragana Nikitovic-Τζανακάκη

Βιοχημικός

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος Διδακτορικού Διπλώματος του Τομέα Μορφολογίας (Εργαστήριο Τοξικολογίας) του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

1. Α. Τσατσάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής
2. Ν. Κ. Καραμάνος, Καθηγητής
3. Η. Κραμποβίτης, Καθηγητής

Εξεταστική επιτροπή

1. Α. Τσατσάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής
2. Ν. Κ. Καραμάνος, Καθηγητής
3. Η. Κραμποβίτης, Καθηγητής
4. Ε. Κουμαντάκης, Καθηγητής
5. Κ. Κρασαγάκης, Επίκουρος Καθηγητής
6. Π. Κατώνης, Επίκουρος Καθηγητής
7. Α. Ζαφειρόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής

Μέρος των αποτελεσμάτων της διδακτορικής αυτής διατριβής, έχουν δημοσιευτεί σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά και παρουσιαστεί σε ελληνικά και διεθνή συνέδρια .

Διεθνή επιστημονικά περιοδικά

1. Nikitovic D, Tsatsakis AM, Karamanos NK and Tzanakakis GN (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.
2. Nikitovic D, Zafiropoulos A, Tzanakakis GN, Karamanos NK and Tsatsakis AM. (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.
3. Nikitovic D, Zafiropoulos A, Katonis P, Tsatsakis A, Theocharis AD, Karamanos NK and Tzanakakis GN. (2006) Transforming growth factor-beta as a key molecule triggering the expression of versican isoforms v0 and v1, hyaluronan synthase-2 and synthesis of hyaluronan in malignant osteosarcoma cells. *IUBMB Life.* 58:47-53.
4. Nikitovic D, Berdiaki A, Zafiropoulos A, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos N.K and Tzanakakis GN. (2008) Lumican expression is positively correlated with human osteosarcoma cell differentiation and negatively with their growth. *FEBS J.* 275: 350-361.
5. Zafiropoulos A, Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK and Tzanakakis GN. MG63 osteosarcoma cells evade the decorin-induced growth arrest by the protracted expression and activation of EGFR *In press: Molecular Cancer Res* (2008)
6. Tzanakakis GN, Nikitovic D, Katonis P, Kanakis I and Karamanos NK. (2006) Expression and distribution of N-acetyl and N-glycolylneuraminic acids in secreted and cell-associated glycoconjugates by two human osteosarcoma cell lines. *Biomed Chromatogr.* 21:406-409.
7. Nikitovic D, Berdiaki K, Chalkiadaki G, Karamanos K and Tzanakakis G (2008) The role of SLRP-proteoglycans in osteosarcoma pathogenesis in press: *Connect Tissue Res* (invited minireview)(2008)

Ελληνικά συνέδρια

8. **Nikitovic D.**, Karamanos NK., Tzanakakis GN. In vitro effects of genistein on synthesis and distribution of glycosaminoglycans/proteoglycans by osteosarcoma cell lines. Hellenic Connective Tissue Club, 5th Ετήσια Ημερίδα, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» Αγ. Παρασκευή, Αθήνα, 17 Μαΐου 2003
9. **Nikitovic D.**, Zafiropoulos A., Dialyna I., Karamanos NK., Tzanakakis GN. Effects of glycosaminoglycans on proliferation of human osteosarcoma and normal osteoblasts: a structure-function relationship. 7th Annual Meeting of the Hellenic Research Club for Connective Tissue & Matrix Biology, Patras 8-9 April 2005
10. Zafiropoulos A., **Nikitovic D.**, Tsatsakis A., Karamanos NK., Tzanakakis GN. Distinct differences in the expression of matrix chondroitin sulphate proteoglycans between normal and cancerous osteoblastic cells. 7th Annual Meeting of the Hellenic Research Club for Connective Tissue & Matrix Biology, Patras 8-9 April 2005
11. **Nikitovic D.**, Zafiropoulos A., Fthenou E., Karamanos NK., Tzanakakis GN. Decorin and biglycan are differentially regulated by growth factors in human osteosarcoma and osteoblastic cells. Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, 57th National Conference, Athens, 9-11 December 2005.
12. **Nikitovic D.**, Zafiropoulos A., Assouti M., Berdiaki A., Tzanakakis GN. TGF-B2 modulates the expression of pericellular matrix components in osteosarcoma cells. Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, 57th National Conference, Athens, 9-11 December 2005.
13. Zafiropoulos A., Berdiaki E., Fthenou D., **Nikitovic D.**, Tzanakakis GN. Decorin in osteosarcoma cells: control of gene transcription, secretion and assessment of its effects on osteosarcoma cell growth. 8th Annual Meeting of the Hellenic Research Club for Connective Tissue & Matrix Biology, Heraklion 14-15 April 2006.
14. **Nikitovic D.**, Zafiropoulos A., Chatzinicolaou G., Tzanakakis GN. The expression of SLRP proteoglycans lumican and biglycan differs among osteosarcoma cell lines of different metastatic potential and is specifically

regulated by TGF- β . 8th Annual Meeting of the Hellenic Research Club for Connective Tissue & Matrix Biology, Heraklion 14-15 April 2006.

Διεθνή συνέδρια

15. **Nikitovic D**, Karamanos NK, Tzanakakis GN *In vitro* effects of genistein on synthesis and distribution of glycosaminoglycans/proteoglycans by osteosarcoma cell lines. XVII th Federation of the European Connective Societies Meeting, Brighton, UK, 27-31 July, 2002. (Abstract P125)
16. **Nikitovic D**, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Synthesis of glycosaminoglycans by osteosarcoma cell lines in culture and its dependence on various growth factors. XVII th Federation of the European Connective Societies Meeting, Brighton, UK, 27-31 July, 2002. (Abstract P131)
17. **Nikitovic D.**, Tsatsakis AM., Zafiropoulos A., Karamanos NK., Tzanakakis GN. TGF- β 2 regulates osteosarcoma cells growth by modulating the biosynthesis of glycosaminoglycans/ proteoglycans. XIX th Meeting of the Federation of the European Connective Tissue Societies, Taormina-Giardini Naxos, Italy, 9-13 July, 2004. (Abstract PJ29)
18. **Nikitovic D.**, Tsatsakis AM., Zafiropoulos A., Karamanos NK., Tzanakakis GN. TGF- β 2 by modulating the biosynthesis of glycosaminoglycans/proteoglycans may regulate osteosarcoma cell growth. Seventh International Conference of Anticancer Research, Corfu, Greece, October 25-30, 2004 (Abstracts 357).
19. **Nikitovic D.**, Zafiropoulos A., Tsatsakis AM., Karamanos NK., Tzanakakis GN. Normal and cancerous osteoblastic cells display distinct differences in the expression of matrix chondroitin sulphate proteoglycans. 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary, July 2-7, 2005 (Abstract D1-035P).
20. **Nikitovic D.**, Zafiropoulos A., Phenou E., Tsatsakis A., Karamanos NK., Tzanakakis GN. The role of TGF- β in regulating gene expression and biosynthesis of matrix macromolecules in human osteosarcoma. 10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on

Molecular Medicine, Hersonissos, Crete, Greece, October 13-15, 2005

(Abstract 312)

21. Zafiropoulos A., **Nikitovic D.**, Phenou E., Tsatsakis A., Karamanos NK., Tzanakakis GN. Biosynthetic pathways of matrix proteoglycans decorin and biglycan, are differentially regulated between tumor and normal osteoblastic cells. 10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Crete, Greece, October 13-15, 2005 (Abstract 313)
22. Zafiropoulos A., Berdiaki A., Fthenou E., **Nikitovic D.**, Tzanakakis GN. MG-63 osteosarcoma cells are resistant to decorin induced cell cycle arrest. FECTS XXth & ISMB meeting, Oulu, Finland, July 1-5, 2006 (Abstract E3476).
23. **Nikitovic D.**, Assouti M., Zafiropoulos A., Tzanakakis GN. TGF- β 2 differentially regulates lumican and biglycan expression in two human osteosarcoma cell lines. 31st FEBS Congress, Istanbul, Turkey, June 24-29, 2006 (Abstract PP-696).
24. Zafiropoulos A., **Nikitovic D.**, Katonis P., Tsatsakis A., Karamanos NK., Tzanakakis GN. MG-63 osteosarcoma cells evade the decorin-induced growth arrest by the protracted expression and activation of EGFR. FEBS Advanced Lecture Course, Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets, Patras, Greece, May 21-26, 2007. P 25

Πρόλογος

Σύντμησης- Αποδόσεις όρων

D-GlcA	D-γλυκουρονικό οξύ
DS	Θειϊκή δερματάνη
cDNA	Συμπληρωματικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
CS	Θειϊκή χονδροϊτίνη
CSPGs	Πρωτεογλυκάνες θειϊκής χονδροϊτίνης
ECM	Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία
EGF	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
FBS	Ορός βόειου εμβρύου
FGF	Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών
GAG	Γλυκοζαμινογλυκάνη
GAPDH	Αφυδρογονάση της 5-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης
HA	Υαλουρονικό οξύ
hPDL	Φυσιολογικοί ανθρώπινοι οστεοβλάστες του περιοδοντικού συνδέσμου
HS	Θειϊκή ηπαράνη
HSPGs	Πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαράνης
Hep	Ηπαρίνη
KS	Θειϊκή κερατάνη
L-IdoA	L-ιδουρονικό οξύ
MG-63	Κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος
mRNA	Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ

Neu5Ac	N-ακετυλνιουραμινικό οξύ
Neu5Gc	N-γλυκολυλνιουραμινικό οξύ
OB	Οστεοβλάστες
p21WAF-1	Αναστολέας της κυκλίνης-εξαρτώμενης κινάσης
PDGF	Αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων
PG	Πρωτεογλυκάνη
Real time-PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ
Saos 2	Κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος
SDS	Θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο
SDS-PAGE	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS
Sia	Σιαλικά οξέα
SLRP	Μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες
TGF-β	Αυξητικός παράγον του μετασχηματισμού-β

Όταν τελειώνεις μια ερευνητική προσπάθεια μακρόχρονη, κουραστική μα και ενδιαφέρουσα, με αποτελέσματα μικρότερα ή μεγαλύτερα από τις προσδοκίες σου, με ταξίδια στο εσωτερικό και στο εξωτερικό για να παρουσιάσεις την δουλειά σου, με καλές και κακές στιγμές, έρχεται η στιγμή που όλα αυτά μαζεύονται, ταξινομούνται, σελιδοποιούνται και δένονται σε τεύχος που ονομάζεται διδακτορική διατριβή. Εξώφυλλο, περιεχόμενα, ευχαριστίες. Στη τελευταία από αυτές τις σελίδες που αναφέρονται προηγούμενα , κάνεις μια στάση μεγάλη. Είναι η ώρα που θέλεις να ευχαριστήσεις αυτούς που σε βοήθησαν στο ερευνητικό σου ταξίδι, που μοιράστηκαν τις αγωνίες, τους προβληματισμούς, τις δυσκολίες, τα προβλήματά σου. Θέλεις να μην παρασυρθείς σε μακροσκελής προτάσεις με μεγάλες κουβέντες, αλλά να τους πείς όσο πιο απλά γίνεται αυτό που νοιώθεις, που πάρα πολύ καλά εκφράζεται με μια και μόνο λέξη, ευχαριστώ.

Θέλω λοιπόν να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. **Αριστείδη Τσατσάκη** για την επιστημονική του καθοδήγηση, την εποικοδομητική του κριτική, την ηθική του συμπαράσταση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την εκπόνηση της διατριβής μου. Θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής τον Καθηγητή κ. **Νίκο Καραμάνο** για την αμέριστη, πολύπλευρη και ουσιαστική βοήθειά του σ' όλες τις φάσεις της μελέτης, τον Καθηγητή κ. **Ηλία Κραμποβίτη** για την επιστημονική και ηθική υποστήριξή του. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. **Ευγένιο Κουμαντάκη** και τους Επίκουρους Καθηγητές κ. **Αλέξανδρο Ζαφειρόπουλο**, **Παύλο Κατόνη** και **Κώστα Κρασαγάκη** για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Και βέβαια θέλω να ευχαριστήσω θερμά την ομάδα του εργαστηρίου Ιστολογίας για την επιστημονική, τεχνική και ηθική συμπαράσταση που μου έδειξαν σε όλη την διάρκεια αυτής της επιστημονικής προσπάθειας. Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ζαφειρόπουλο για την επιστημονική, τεχνική και φιλική συμπαράστασή του, την Δρ. **Κατερίνα Μπερδιάκη**, την Δρ. **Ελένη Φθενού**, την **Τζωρτζίνα Χατζηνικολάου**, την **Χαλκιαδάκη Γιούλη** και την **Καρτζιλάκη Ελευθερία** για την υποστήριξη και φιλική τους διάθεση και συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, τον **Petar** και την **Radmila** που με έμαθαν να αγωνίζομαι και να προσπαθώ για το καλύτερο σε κάθε φάση της ζωής μου. Ευχαριστώ τα αδέρφια, την **Ljilja** και τον **Nenad** για την αγάπη και συμπαράστασή τους που με συντροφεύουν την κάθε στιγμή.

Θέλω να ευχαριστήσω τον άνδρα μου **Γιώργο** για την αγάπη του, για την υποστήριξή του, για τις πολύτιμες συμβουλές του σε θεωρητικά ζητήματα και για την συμπαράστασή του όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω και να αφιερώσω την διατριβή μου στα παιδιά μου **Πέτρο** και **Αλέξανδρο** για την κατανόηση και υπομονή τους για το χρόνο που δεν είχαν από μένα, γιατί δεν μπορούσα.

Συντμήσεις	1
Περίληψη	3
Abstract	9
Εισαγωγή	
1.1 Οστά.....	15
1.2 Οστεοσάρκωμα.....	16
1.2.1 Ταξινόμηση.....	17
1.2.2 Θεραπεία.....	19
1.2.3 Πρόγνωση.....	19
1.3 Οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs).....	19
1.3.1 Θεϊκή χονδροϊτίνη (CS).....	21
1.3.2 Θεϊκή δερματάνη (DS).....	21
1.3.3 Θεϊκή κερατάνη (KS).....	22
1.3.4 Ηπαρίνη (Hep) και θεϊκή ηπαράνη (HS).....	22
1.3.5 Υαλουρονικό οξύ (HA).....	23
1.3.6 Σιαλικά οξέα.....	24
1.4 Η βιοσύνθεση των GAGs.....	24
1.4.1 Η βιοσύνθεση Hep/HS.....	25
1.4.2 Η βιοσύνθεση των DS/CS.....	26
1.4.3 Η βιοσύνθεση της KS.....	26
1.4.4 Η βιοσύνθεση της HA.....	26
1.4.5 Η βιοσύνθεση των σιαλικών οξέων.....	27
1.5 Οι Πρωτεογλυκάνες.....	27
1.5.1 Υαλεκτάνες.....	28
1.5.2 Μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες.....	29
1.5.3 Πρωτεογλυκάνες της βασικής μεμβράνης.....	29
1.5.4 Ενδοκυττάρια και της κυτταρικής επιφάνειας PGs.....	30
1.5.5 Η βιοσύνθεση των πρωτεογλυκανών.....	32
1.6 Πρωτεογλυκάνες και οστά.....	32
1.6.1 SLRPs και οστεοσάρκωμα.....	33
1.6.2 Υαλεκτάνες και οστεοσάρκωμα.....	36
1.6.3 Πρωτεογλυκάνες θεϊκής ηπαράνης και οστεοσάρκωμα.....	36
1.7 Αυξητικοί παράγοντες και καρκίνος των οστών.....	36
1.8 Γενιστεΐνη ως ειδικός αναστολέας της κινάσης της τυροσίνης.....	40
Σκοπός.....	41
Υλικά και Μέθοδοι	
1.1 Κυτταρικές καλλιέργειες.....	42
1.2 Μελέτη της δράσης των PDGF-BB, bFGF και TGF-B2 αυξητικών Παραγόντων.....	42
1.3 Απομόνωση /εκχύλιση RNA από τα κύτταρα.....	42
1.4 Φωτομέτρηση του συνολικού RNA των κυττάρων.....	43
1.5 Αντίστροφη μεταγραφή.....	43
1.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real- Time PCR).....	43

1.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE).....	44
1.8 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot).....	44
1.9 Η ανάλυση των γλυκοζαμινογλυκανών.....	45
1.10 Α) Μέτρηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με ενσωμάτωση [³ H]- θυμιδίνης ([³ H]-TdR).....	45
1.11 Β) Μέτρηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη μέθοδο CyQUANT.....	45
1.12 Τροποποίηση γενετικού υλικού με την εισαγωγή γενετικού τμήματος μέσω siRNA (Transfection).....	46
1.13 Δοκιμή ινώδους ουλής (Wound Healing Assay).....	46
1.14 Δοκιμή κυτταρικής μετανάστευσης – χημειοταξίας.....	47
1.15 Στατιστική ανάλυση.....	47
1.16 Η ανάλυση των σιαλικών οξέων.....	47
1.17 Διαλύματα.....	47
1.18 Αντισώματα.....	48
1.19 Εκκινητές.....	49

Αποτελέσματα

1.0 Μελέτη της σύνθεσης και της κατανομής των γλυκοζαμινογλυκανών/ πρωτεογλυκανών GAGs / PGs στις δύο κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος.....	51
1.1 Στόχος.....	51
1.2 Μελέτη της σύνθεσης και της κατανομής των GAGs / PGs.....	51
1.3 Μελέτη της δράσης της γενιστεΐνης, στη σύνθεση των GAGs/PGs.....	54
1.4 Συμπεράσματα.....	54
2.0 Η επίδραση των αυξητικών παραγόντων bFGF, TGF και PDGF στη σύνθεση και κατανομή των γλυκοζαμινογλυκανών/πρωτεογλυκανών στις δύο κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος.....	55
2.1 Στόχος.....	55
2.2 Μελέτη της δράσης των αυξητικών παραγόντων bFGF, TGF-β2 και PDGF στη σύνθεση και κατανομή των Gs/PGs.....	55
2.3 Συμπεράσματα.....	56
3.0 Η επίδραση των γλυκοζαμινογλυκανών (GAG) στην ανάπτυξη των φυσιολογικών οστεοβλαστών και των καρκινικών κυττάρων του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος.....	58
3.1 Στόχος.....	58
3.2 Μελέτη της καθαρότητας και της χημικής σύνθεσης των GAGs.....	58
3.3 Μελέτη της επιδράσεως των GAGs στη ανάπτυξη φυσιολογικών και μετασχηματισμένων οστεοβλαστών.....	60
3.4 Συμπεράσματα.....	60
4.0 Μελέτη της επίδρασης του αυξητικού παράγοντα του μετασχηματισμού (TGFβ2) στη έκφραση των ισομορφών της βερσικάνης, των συνθασών του υαλουρονικού οξέος καθώς και στην παραγωγή του υαλουρονικού οξέος από τα κακοήθη κύτταρα του οστεοσαρκώματος.....	62
4.1 Στόχος.....	62
4.2. Μελέτη της επίδρασης των αυξητικών παραγόντων στη γονιδιακή έκφραση της βερσικάνης.....	62
4.3 Μελέτη της επίδρασης των αυξητικών παραγόντων στην έκφραση των HAS και στην σύνθεση του HA.....	65

4.4 Συμπεράσματα.....	67
5.0 Μελέτη της έκφρασης της λουμικάνης και συσχέτιση αυτής με τη διαφοροποίηση και ανάπτυξη των κύτταρων του οστεοσαρκώματος.....	68
5.1 Στόχος.....	68
5.2 Αναστολή των mRNA επιπέδων της λουμικάνης μετά από εισαγωγή του siRNA.....	70
5.3 Μελέτη της επίδρασης του siRNA της λουμικάνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.....	72
5.4 Μελέτη της επίδρασης της αναστολής της λουμικάνης στη σηματοδότηση των Smad.....	74
5.5 Μελέτη της επίδρασης της αναστολής της λουμικάνης στη έκφραση του p21WAF-1.....	76
5.6 Μελέτη της επίδρασης siRNA της λουμικάνης στη κυτταρική μετανάστευση και χημειοταξία.....	77
5.7 Συμπεράσματα.....	80
6.0 Η διακοσμιτίνη αποτρέπει την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων του οστεοσαρκώματος με την διατηρημένη σύνθεση και ενεργοποίηση των EGFR.....	83
6.1 Στόχος.....	83
6.2 Τα MG-63 κύτταρα παράγουν σημαντικά ποσά της διακοσμιτίνης.....	83
6.3 Οι TGF-β2, PDGF-BB και bFGF εντείνουν σημαντικά τη μεταγραφή του γονιδίου της διακοσμιτίνης και την έκκρισή της στη ECM των MG-63 κυττάρων.....	84
6.4 Τα MG-63 κύτταρα δεν είναι ευαίσθητα στην αναστολή της ανάπτυξής τους μέσω της διακοσμιτίνης σε αντίθεση με τα Saos 2 κύτταρα.....	86
6.5 Η αναστολή της έκφρασης της διακοσμιτίνης δεν επηρέασε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά μείωσε την κυτταρική κινητικότητα.....	86
6.6 Τα ενδογενή επίπεδα διακοσμιτίνης εμποδίζουν την κυτταροστατική επίδραση του TGF-β2.....	88
6.7 Η διακοσμιτίνη δεν προκαλεί τη μεταγραφική αύξηση του p21 στα MG-63 κύτταρα.....	89
6.8 Διατήρηση της σύνθεσης και φωσφορυλίωσης των EGFR στα MG-63 κύτταρα από την διακοσμιτίνη.....	89
6.9 Επίδραση της διακοσμιτίνης στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των κυττάρων οστεοσαρκώματος, συσχετίζεται με ενεργοποίηση του EGFR.....	91
6.10 Συμπεράσματα.....	93
7.0 Έκφραση και καθορισμός των N-ακετυλ και των N-γλυκολυλιουραμινικών οξέων σε εκκρίνομενα και μεμβρανικά, γλυκοζυζευγμάτα από δύο κυτταρικές σειρές του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος.....	94
7.1 Στόχος.....	94
7.2 Η ανάλυση των σιαλικών οξέων.....	95
7.3 Συμπεράσματα.....	96

Βιβλιογραφία112

Παράρτημα 1-7

Βιογραφικό Σημείωμα

Συντμήσεις- Αποδόσεις όρων

D-GlcA	D-γλυκουρονικό οξύ
DS	Θειϊκή δερματάνη
cDNA	Συμπληρωματικό δεοξυριβονουκλείικό οξύ
CS	Θειϊκή χονδροϊτίνη
CSPGs	Πρωτεογλυκάνες θειϊκής χονδροϊτίνης
ECM	Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία
EGF	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
FBS	Ορός βόειου εμβρύου
FGF	Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών
GAG	Γλυκοσαμινογλυκάνη
GAPDH	Αφυδρογόναση της 5-φωσφορικής Γλυκεραλδεύδης
HA	Υαλουρονικό οξύ
hPDL	Φυσιολογικοί ανθρώπινοι οστεοβλάστες του περιοδοντικού συνδέσμου
HS	Θειϊκή ηπαράνη
HSPGs	Πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαράνης
Hep	Ηπαρίνη
KS	Θειϊκή κερατάνη
L-IdoA	L-ιδουρονικό οξύ
MG-63	Κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος

mRNA	Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ
Neu5Ac	N-ακετυλνιουραμινικό οξύ
Neu5Gc	N-γλυκολυλνιουραμινικό οξύ
OB	Οστεοβλάστες
p21WAF-1	Αναστολέας της κυκλίνη-εξαρτόμενης κινάσης
PDGF	Αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων
PG	Πρωτεογλυκάνη
Real time-PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ
Saos 2	Κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος
SDS	Θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο
SDS-PAGE	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS
Sia	Σιαλικά οξέα
SLRP	Μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες
TGF-β	Αυξητικός παράγον του μετασχηματισμού-β

Περίληψη

Το οστεοσάρκωμα είναι ο πιο κοινός όγκος των οστών στα παιδιά και τους εφήβους. Το κύριο χαρακτηριστικό του οστεοσαρκώματος είναι ο κακοήθης μετασχηματισμός των οστεοβλαστικών κυττάρων και η συσσώρευση άφθονης, ημιτελώς ασβεστοποιημένης, εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM). Το άφθονο περιεχόμενο της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας αλλάζει το μικροπεριβάλλον των οστών και έχει επιπτώσεις στην κανονική λειτουργία των οστεοβλαστικών κυττάρων και στη διαφοροποίηση των κακοήθων κυττάρων.

Οι πρωτεογλυκάνες (PGs) είναι μια από τις κύριες τάξεις μακρομορίων της κυτταρικής μεμβράνης και του εξωκυττάριας χώρου. Περιέχουν ένα πρωτεϊνικό κορμό με τον οποίο είναι συνδεδεμένες ομοιοπολικά μια ή περισσότερες θειωμένες αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών (GAGs). Οι αλυσίδες των GAGs είναι γραμμικά πολυμερή αποτελούμενα από επαναλαμβανόμενες δισακχαριδικές μονάδες που περιέχουν μια εξωζαμίνη και ένα ουρονικό οξύ ή γαλακτόζη στην περίπτωση της θειϊκής κερατάνης. Οι ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες των PGs τις καθιστούν ρυθμιστές της οργάνωσης του εξωκυττάριας χώρου, ενώ συμμετέχουν στη ρύθμιση πληθώρας κυτταρικών γεγονότων, όπως η κυτταρική προσκόλληση, η μετακίνηση, η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός τους. Η ρυθμιστική δράση των PGs πραγματοποιείται μέσω των αλληλεπιδράσεων τους με δραστικά μακρομόρια του εξωκυττάριας χώρου καθώς και με αυξητικούς παράγοντες, είτε μέσω των γλυκανικών αλυσίδων τους είτε μέσω του πρωτεϊνικού τους κορμού.

Οι πρωτεογλυκάνες είναι σημαντικά συστατικά των μή κολλαγονοδών μακρομορίων του οστού. Συντίθενται και εκκρίνονται από τους οστεοβλάστες, και συμμετέχουν στον έλεγχο της ασβεστοποίησης των οστών. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι PGs της κυτταρικής μεμβράνης (κυρίως η θειϊκή ηπαράνη) όπως και οι εκκρινόμενες PGs συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση κύτταρο με κύτταρο και κύτταρο με εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και μπορούν να παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό και την διατήρηση του οστίτη ιστού.

Τα φυσικοχημικά στοιχεία και οι μοριακές αλλαγές της εξωκυττάριας ουσίας του οστεοσαρκώματος, όπως και οι συσχετίσεις αυτών των αλλαγών με την διαφοροποίηση και την πρόγνωση του οστεοσαρκώματος δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Ο ρόλος των πρωτεογλυκανών στους μηχανισμούς ανάπτυξης του οστεοσαρκώματος θεωρείται σημαντικός. Η λεπτομερής δομική ανάλυση των

υδατανθρακικών αλυσίδων των PGs θα φωτίσει τη βιοχημεία των γλυκοσυζευγμάτων που έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον γιατί οι γλυκάνες συμμετέχουν στη ρύθμιση πληθώρας κυτταρικών γεγονότων, καθώς και στην κακοήθη εξαλλαγή των κυττάρων. Ο στόχος της μελέτης αυτής ήταν να συμβάλλει στην κατανόηση του ρόλου συγκεκριμένων PGs/ GAGs στη παθοφυσιολογία του οστεοσαρκώματος, ενός εκ των σημαντικότερων καρκίνων των οστών του ανθρώπου.

Χρησιμοποιήσαμε τις MG-63 και Saos 2 κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος, υψηλού και χαμηλού μεταστατικού δυναμικού αντίστοιχα. Αυτές οι κυτταρικές σειρές διαφέρουν μεταξύ τους στο βαθμό διαφοροποίησης, η μια είναι μέτρια και η άλλη καλά διαφοροποιημένη. Σε κυτταρικές καλλιέργειες αυτών των σειρών, μελετήσαμε τη σύνθεση και τη κατανομή των GAGs τόσο στο υλικό καλλιέργειας όσο και την κυτταρική μεμβράνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αμφότερες οι κυτταρικές σειρές συνθέτουν εξωκυττάριο υαλουρονικό οξύ (HA) καθώς και εκκρινόμενες και κυτταρικά προσκολλημένες γαλακτοζαμινογλυκάνες (GalAGs) και θειϊκή ηπαράνη (HS). Αν και αμφότερες οι κυτταρικές σειρές συνθέτουν αξιοσημείωτες ποσότητες PGs, τα Saos 2 κύτταρα παράγουν HA, GalAGs και HS σε σημαντικά χαμηλότερες ποσότητες από αυτές των MG-63 κυττάρων.

Μελετήσαμε επίσης τη δράση της γενιστεΐνης στη σύνθεση αυτών των μορίων. Ο μηχανισμός δράσης της γενιστεΐνης, μέσω της ειδικής αναστολής της πρωτεΐνης της κινάσης της τυροσίνης (PTK), στο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων είναι γνωστός. Η ανασταλτική επίδραση της γενιστεΐνης στη σύνθεση των εξωκυττάρια εκκρινόμενων και των κυτταρικά προσκολλημένων GAGs/PGs στα Saos 2 κύτταρα βρέθηκε να είναι δοσοεξαρτώμενη, και πιο πιθανόν μέσω ενός PTK μηχανισμού. Η σύνθεση των GAGs/PGs από τα MG-63 κύτταρα με την παρουσία της γενιστεΐνης εξαρτάται από το τύπο και την κατανομή, υποδηλώνοντας ένα πιο σύνθετο μηχανισμό που ρυθμίζει την σύνθεση των PGs.

Έχει βρεθεί ότι οι GFs όπως, ο αυξητικός παράγοντας του μετασχηματισμού (TGF-β), ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (bFGF) και ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF) βοηθούν την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος. Έτσι, θελήσαμε να εξετάσουμε την δράση του TGF-β2, του bFGF και του PDGF-BB στη σύνθεση και κατανομή των GAGs/PGs στις δύο κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η δράση των αυξητικών

παραγόντων διαφέρει μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών και ότι η ρύθμιση στη σύνθεση των GAGs εξαρτάται από τον τύπο και την κατανομή τους.

Τροποποιήσεις της δομικής σύστασης των συστατικών των GAGs/PGs της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας μπορεί να έχει σημαντικές συνέπειες στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων ή / και τη διαφοροποίησή τους. Σε οστεοβλάστες ανθρώπου, καθώς και στις MG-63 και Saos 2 κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος, χορηγήσαμε στη συνέχεια τους κυριότερους τύπους αλυσίδων GAGs π.χ τηθειϊκή χονδροϊτίνη (CSA), τηθειϊκή δερματάνη (DS) και ηπαρίνη (Hep) και μελετήσαμε την επίδρασή τους στην ανάπτυξη αυτών των κυττάρων. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι GAGs της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας είναι μακρομόρια που επηρεάζουν τη κυτταρική ανάπτυξη των κακοήθων και των φυσιολογικών κυττάρων οστεοβλαστικής αρχής με μια δόσοεξαρτώμενη συμπεριφορά. Αυτή η επίδραση σχετίζεται στενά με τη λεπτομερή χημική δομή των GAGs, όπως για π.χ. είναι η παρουσία L-ιδουρονικού οξέος και ο βαθμός της θείωσής τους.

Η βερσικάνη (versican), μια μεγάλη μεγέθους πρωτεογλυκάνη τηθειϊκής χονδροϊτίνης και το συνδεδεμένο σε αυτή HA είναι συστατικά της ECM που παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην συμπεριφορά των μετασχηματισμένων κυττάρων. Η έκφραση συγκεκριμένων ισομορφών της βερσικάνης έχει ενοχοποιηθεί για την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων. Επίσης η διακοπή της σύνθεσης HA μέσω της αναστολής της έκφρασης της συνθάσης 2 (HAS2) στα κύτταρα οστεοσαρκώματος καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα και την διηθητική ικανότητά τους. Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπ' όψη ότι ο TGF-β2, ο bFGF και ο PDGF-BB είναι σημαντικοί ρυθμιστές της έκφρασης των μακρομορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, μελετήσαμε την επίδραση αυτών των αυξητικών παραγόντων στην έκφραση των διαφόρων ισομορφών της βερσικάνης, στην σύνθεση της συνθάσης του HA από τα MG-63 κύτταρα του οστεοσαρκώματος αλλά και από φυσιολογικούς ανθρώπινους οστεοβλάστες του περιοδοντικού συνδέσμου (hPDL). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι ο TGF-β2 προκαλεί την έκφραση της βερσικάνης και του HA από τα κύτταρα του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος ενώ ο PDGF-BB είχε την κύρια επίδραση του στην έκφραση της HAS2 ισομορφής και της βιοσύνθεσης του HA από τους οστεοβλάστες. Συμπερασματικά, ο TGF-β2 μπορεί να έχει ρόλο στη μεταστατική δυνατότητα των κυττάρων του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος.

Οι μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRP) όπως είναι η διγλυκάνη (biglycan), η διακοσμιτίνη (decorin), η φιβρομοδουλίνη (fibromodulin), η λουμικάνη (lumican) και η οστεοαδχερίνη (osteoaderin) είναι οι πιο άφθονες πρωτεογλυκάνες του οστεοειδούς. Το χαρακτηριστικό σε σχήμα πετάλου αλόγου του πρωτεϊνικού τους κορμού, τους επιτρέπει να αλληλεπιδρούν με άλλα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας (κυρίως με ίνες κολλαγόνου), αλλά και με την ανόργανη φάση στη διάρκεια της ασβεστοποίησης. Η έκφραση της λουμικάνης δεν ήταν γνωστή στο ανθρώπινο οστεοσάρκωμα μέχρι την ανάδειξη της από την παρούσα μελέτη.

Εξετάσαμε την έκφραση της λουμικάνης στα MG-63 και στα Saos 2 κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος. Αυτές οι κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος εκφράζουν και εκκρίνουν την λουμικάνη μερικώς γλυκοζυλιωμένη με τις αλυσίδες θειϊκής κερατάνης (KS). Είναι ενδιαφέρον, ότι τα μη μεταστατικά καλώς διαφοροποιημένα Saos 2 κύτταρα παρήγαγαν λουμικάνη επτά φορές περισσότερη συγκρινόμενη με εκείνη που παρήγαγαν τα υψηλής μεταστατικής ικανότητας κύτταρα της MG-63 σειράς. Η χρησιμοποίηση ειδικού siRNA για το γονίδιο της λουμικάνης κατέστειλε τα επίπεδα του mRNA και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η ανάπτυξη των Saos 2 κυττάρων αναστάλη, ενώ η μετανάστευση και η χημειοτακτική απάντηση στην ινονεκτίνη αυξήθηκε από την λουμικάνη. Η έκφραση της λουμικάνης είχε αρνητική συσχέτιση με το βασικό επίπεδο της Smad 2 ενεργοποίησης. Από την άλλη μεριά, αυτές οι κυτταρικές λειτουργίες στα υψηλής επιθετικότητας MG-63 κύτταρα, δεν ήταν ευαίσθητες στην καταστολή των ενδογενών χαμηλών επιπέδων λουμικάνης που παράγουν αυτά τα κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η έκφραση της λουμικάνης μπορεί να σχετίζεται θετικά με την διαφοροποίηση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος και αρνητικά με την εξέλιξή τους.

Η διακοσμιτίνη είναι μια καλά μελετημένη μικρή πλούσια σε λευκίνη πρωτεογλυκάνη για την οποία βρέθηκε ότι έχει ανασταλτική δράση στο πολλαπλασιασμό διαφόρων κυτταρικών σειρών. Έχει αναφερθεί ότι η διακοσμιτίνη επιδρά μέσα από το μονοπάτι του EGFR προκαλώντας απόπτωση / αναστολή ανάπτυξης. Ο σκοπός της παρούσας φάσης της μελέτης μας ήταν να εξετασθεί η ρύθμιση της σύνθεσης της διακοσμιτίνης μετά από χορήγηση του TGF-β₂, του PDGF-BB και του bFGF στις MG-63 και Saos 2 κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος όπως και στα κύτταρα ανθρώπινων φυσιολογικών οστεοβλαστών.

Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της διακοσμιτίνης στην ανάπτυξη των κυττάρων του οστεοσαρκώματος. Βρέθηκε ότι τα MG-63 κύτταρα εκφράζουν την διακοσμιτίνη ενώ τα Saos 2 και τα φυσιολογικά κύτταρα των οστεοβλαστών δεν την εκφράζουν. Η έκφραση της διακοσμιτίνης αυξήθηκε μετά από τη χορήγηση όλων των αυξητικών παραγόντων, ενώ τα Saos 2 και τα φυσιολογικά κύτταρα των οστεοβλαστών δεν διεγέρθηκαν από κανένα από τους αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για να συνθέσουν την διακοσμιτίνη. Η χορήγηση της διακοσμιτίνης είχε ανασταλτική επίδραση στη ανάπτυξη των Saos 2 κυττάρων, ενώ τα MG-63 κύτταρα δεν επηρεάστηκαν. Η καταστολή της σύνθεσης της διακοσμιτίνης στα MG-63 κύτταρα δεν είχε επίδραση στο πολλαπλασιασμό τους. Αντίθετα, η διακοσμιτίνη φάνηκε να έχει ευεργετική επίδραση στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος αφ' ενός διότι ήταν απαραίτητη για την μετανάστευση των MG-63 κυττάρων και αφ' ετέρου διότι εμπόδισε την επαγόμενη από το TGF- β 2 κυτταροστατική λειτουργία. Η ανάλυση αυτών των δραστηριοτήτων της διακοσμιτίνης στα MG-63 κύτταρα έδειξε ότι δεν επάγει την έκφραση της p21WAF-1, ούτε προκαλεί παρατεταμένη αναίρεση και αδρανοποίηση του EGFR. Αντίθετα, ο EGFR φάνηκε να υπερεκφράζεται και να παραμένει δια μακρόν φωσφορυλιωμένος. Επιπρόσθετα, φάνηκε ότι για τα αυξημένα επίπεδα του EGFR δεν χρειάζεται ενεργοποιημένη σηματοδότηση του EGFR, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να επιτευχθεί σταθεροποίηση των υποδοχέων αυτών μέσω των αλληλεπιδράσεων της εξωκυττάριας διακοσμιτίνης και του EGFR. Σαν συμπέρασμα συνάγεται ότι τα MG-63 κύτταρα είναι ανθεκτικά στην αναστολή της ανάπτυξης που προκαλείται από την διακοσμιτίνη.

Το N-ακετυλνιουραμινικό οξύ (Neu5Ac) και το N-γλυκολυλνιουραμινικό οξύ (Neu5Gc) είναι τα επικρατούντα σιαλικά οξέα (Sia) στα θηλαστικά που συνήθως βρίσκονται στα μη αναγόμενα άκρα των ολιγοζαχαριδικών αλυσίδων στις γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια. Προσδιορίστηκε ότι τα MG-63 κύτταρα παράγουν πάνω από 5 φορές περισσότερο ολικό σιαλικό οξύ συγκρινόμενο με τα Saos-2 κύτταρα. Το Neu5Ac υπολογίστηκε στο περίπου 60% των ολικών σιαλικών οξέων που εκκρίθηκαν από τα MG-63 κύτταρα, ενώ το Neu5Gc ήταν το κύριο σιαλικό οξύ στην κυτταρική μεμβράνη των MG-63 κυττάρων. Τα Saos-2 κύτταρα εκκρίνουν αξιόλογες ποσότητες του Neu5Ac στο υπερκείμενο. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι τα κύτταρα του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος εκφράζουν

Περίληψη

αμφότερους τους τύπους γλυκοζυζευγμάτων που περιέχουν σιαλικά οξέα, οι δε διαφορές στις ποσότητες του καθενός από τους δύο κύριους τύπους σιαλικών οξέων καθώς και η κατανομή τους μπορεί να σχετίζεται με τις διαφορές τους στην μορφολογία και την μεταστατική τους ικανότητα .

Abstract

Osteosarcoma is the most common bone tumor associated with childhood and adolescence. The main characteristics of the osteosarcoma are the malignant transformation of the osteoblasts and the excessive accumulation of the partially mineralized extracellular matrix (ECM). The abundant content of the ECM modulates the microenvironment of the bone tissue and affects the normal function of the osteoblasts as well as the differentiation of the malignant cells.

Proteoglycans (PGs) are one of the major classes of macromolecules located both at the cell membrane and the ECM. They consist of a protein core to which one or more sulfated glycosaminoglycan (GAG) chains are covalently bound. GAG chains are linear polymers composed of repeating disaccharide units consisting of a hexosamine and an uronic acid. The specific physicochemical characteristics with which PGs are endowed enable them to affect the organization of the ECM, as well as to participate in the regulation of several cellular events, including cell proliferation, adhesion and migration. These roles of PGs are perpetrated through specific interactions with target macromolecules or growth factors and these interactions may involve both their GAG chains and/or protein cores.

PGs are major non-collagen component of the bone ECM. They are synthesized and secreted by osteoblasts and participate in the regulation of bone calcification. Furthermore, it has been suggested that cell membrane (mainly heparan sulfate containing) as well as secreted PGs participate in cell-cell and cell-ECM interactions and play important roles in the in the formation and the renewal of the bone tissue.

Both the physicochemical characteristics and the alternations in the composition of the osteosarcoma ECM as well as the association of these changes with its differentiation and prognosis have not been adequately studied. The role of PGs in the mechanisms of osteosarcoma development is suggested to be important. The fine

structural analysis of the proteoglycans' GAG chains 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. Therefore, the aim of this study was to contribute to the understanding of the role specific PGs / GAGs have in the pathology of the osteosarcoma, which is one of the most important human primary bone tumors.

MG-63 and Saos 2 human osteosarcoma cell lines, endowed with high and low metastatic capability, and differing in their differentiation level, being medium and well differentiated, respectively were utilized. The synthesis and the distribution of GAGs among the cell membrane and the culture medium by these cell lines were studied. The obtained results showed that both cell lines synthesized extracellular hyaluronan (HA) and both extracellular and cell-associated galactosaminoglycans (GalAGs) and heparin sulfate (HS). Even though both cell lines synthesized considerable amounts of PGs, the Saos 2 cells produced HA, GalAGs and HS at considerably lower rates than the MG-63 cells.

The role of genistein on the synthesis of these macromolecules has also been studied. Genistein is a well known specific inhibitor of the protein tyrosine kinase (PTK) and affects the proliferation of both cancer and normal cells. The inhibitory effect of genistein on the synthesis of both extracellularly secreted and cell-associated GAGs / PGs in Saos 2 cells was found to be dose-dependent and mediated most probably through a PTK mechanism. The synthesis of GAGs / PGs by the MG-63 cells in the presence of genistein was dependent on their type and localization suggesting that a more complex mechanism regulates their PG synthesis.

It has been shown that growth factors such as the transforming growth factor (TGF- β 2), basic fibroblast growth factor (bFGF) and the platelet derived growth factor

support the growth of osteosarcoma. Therefore, we examined the actions of TGF- β 2, bFGF and PDGF-BB on the synthesis and the distribution of the GAGs / PG between the two cell lines. The obtained results showed that the action of the growth factors differs between the two cell lines and that the regulation of the GAG synthesis depends on their type and location.

Alterations in the structural composition of the GAG/PG component may have important consequences on the cell proliferation and / or differentiation. Human osteoblasts and the two osteosarcoma cell lines, able to produce galactosaminoglycan (GalAGs) and heparan sulfate (HS)-containing proteoglycans, were treated with their main GAG chain types (*i.e.* chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS) and heparin) and their effects on cell growth were examined. The obtained results showed that exogenous GAGs affect the growth of both normal and cancer cell in a dose-dependent fashion. This effect is closely related to the fine chemical structure of GAGs, *i.e.* the presence of the L-iduronic acid and the degree of sulfation.

Versican, large sized chondroitin sulfate PG and its binding partner hyaluronan (HA) are extracellular matrix components that play an essential role in transformed cell behavior. Expression of certain versican isoforms has been implicated in migration and proliferation of cancer cells. Likewise the disruption of HA synthesis by inhibiting hyaluronan synthase-2 (HAS2) expression in osteosarcoma cells inhibits cell proliferation, migration and invasiveness. Considering that growth factors, such as TGF- β 2, bFGF and PDGF-BB, are important regulators for the expression of the ECM molecules, in this study we examined the effect of these growth factors on the expression of the various versican isoforms, HA synthases as well as HA synthesis by MG-63 osteosarcoma cells and normal human osteoblastic periodontal ligament cells (hPDL). Our results show that TGF- β 2 was the major stimulator of HAS2 isoform

expression as well as HA synthesis in osteosarcoma cells, while PDGF-BB exerted dominant influence on HAS2 isoform expression and hyaluronan biosynthesis by osteoblasts. These results indicate that TGF- β 2 may account for the metastatic potential of these cells.

The small, leucine rich proteoglycans such as biglycan, decorin, fibromodulin, lumican and osteoadherin are the most abundant proteoglycans of the osteoid. The characteristic horse-shoe shape of their protein core enables them to interact with the other ECM components (mainly with collagen fibers) as well as with the inorganic phase during bone mineralization. The expression of lumican by osteosarcoma cells has not previously been reported.

We examined the expression of lumican by MG-63 and Saos 2 cell osteosarcoma cells. The two human osteosarcoma cell lines were found to express and to secrete lumican which was partly substituted with keratan sulfate chains glycosaminoglycans. Importantly, the non-metastatic, well differentiated Saos 2 cells produced lumican at rates that were up to seven-fold higher than the highly metastatic MG-63 cells. The utilization of short interfering RNA specific for the lumican gene resulted in efficient down-regulation of its mRNA levels in both cell lines. The growth of Saos 2 cells was inhibited by lumican, whereas their migration and chemotactic response to fibronectin were found to be promoted. Lumican expression was negatively correlated with the basal level of Smad activation in these cells, suggesting that lumican may affect the bioavailability of Smad 2 activators. By contrast, these cellular functions of highly aggressive MG-63 cells were demonstrated not to be sensitive to a decrease in their low endogenous lumican levels. These results suggest that lumican expression may be positively correlated with the differentiation and negatively to the progression of the osteosarcoma.

Decorin is a well studied SLRP, reported to have inhibitory action on the growth of numerous cell lines. It has been shown that decorin by acting through the EFGR pathway causes apoptosis/ cell growth inhibition. The aim of the present phase of our study was to examine the regulation of decorin synthesis by the MG-63 and Saos 2 cell line as well as by human osteoblasts, after treatment with TGF- β 2, PDGF-BB and bFGF. Likewise, the effect of decorin on these cells' growth was examined. We show that the MG-63 cells in contrast to the Saos 2 cells and the normal osteoblasts express decorin. Furthermore, the expression of decorin by the MG-63 cells was stimulated by all utilized growth factors while none of the treatments induced decorin expression in Saos 2 cell and the normal osteoblasts. Treatment with exogenous decorin inhibited Saos 2 cell growth while neither exogenous decorin nor downregulation of the endogenous decorin synthesis did affect MG-63 cell growth. On the contrary, treatment with decorin seemed to be beneficial to osteosarcoma cells, since it was necessary for MG-63 cell migration and acted as a mediator, counteracting the TGF- β 2-induced cytostatic function. In contrast to the established model decorin in MG-63 cells did not induce p21 expression nor cause protracted retraction and inactivation of the EGFR. Conversely, EGFR appeared to be overexpressed and continuously phosphorylated. These results provide new data on pathways that cancer cell might employ to overcome the established decorin-induced growth suppression.

N-acetylneuraminic acid and N-glycolylneuraminic acid are the dominant sialic acids in mammals usually found in the non-reducing terminal of oligosaccharide side chains in glycoproteins or glycolipid form. Their expression and distribution pattern has been correlated both with the malignant phenotype and tumor grade of human cancers. Our aim was to examine the synthesis and distribution of sialic acid containing glycoconjugates in human osteosarcoma cell lines and particularly whether the type

and content of N-acetylneuraminic acid and N-glycolylneuraminic acid may be correlated to osteosarcoma metastatic potential. It was determined that the MG-63 and Saos 2 cell lines differ both in the content and distribution of the two sialic acid types. MG-63 cells produce up to 5-fold more total sialic acid as compared to the Saos 2 cells. Neu5Gc is the predominant sialic acid present on the MG-63 cells membrane and represents 40 % of the determined sialic acid by these cells. Saos 2 cell fraction was found to be poor in sialic acid content as only traces of Neu5Ac were detected. However these cells secrete considerable amounts of Neu5Ac to culture media. In conclusion both the total sialic acid and specifically the Neu5Gc content may be correlated to osteosarcoma metastatic potential.

1.1 Οστά

Τα οστά είναι ένας στηρικτικός ιστός που εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση και χαρακτηρίζεται από ακαμψία και ιδιαίτερα σκληρή σύσταση. Τα οστά αποτελούνται από:

- στηρικτικά κύτταρα (οστεοβλάστες και οστεοκύτταρα)
- οργανική εξωκυττάρια ουσία από κολλαγόνο και γλυκοζαμινογλυκάνες (οστεοειδές)
- ανόργανα άλατα που εναποτίθενται μέσα στην εξωκυττάρια ουσία
- κύτταρα της αποδόμησης του οστού (οστεοκλάστες)

Το οστεοειδές είναι ένα εξειδικευμένο συστατικό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας των οστών, με στηρικτικό κυρίως ρόλο. Αποτελείται από ίνες κολλαγόνου τύπου I που συνδέονται με τις εξωκυττάρια γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs)/ πρωτεογλυκάνες (PGs), περιέχει ειδικές γλυκοπρωτεΐνες (π.χ. οστεοκαλσίνη) και δημιουργεί ένα ειδικό περιβάλλον με ιδιότητες ισχυρής δέσμευσης του ασβεστίου.

Οι οστεοβλάστες και τα οστεοκύτταρα εκκρίνουν και τρέφουν το οστεοειδές, στο οποίο θα εναποτεθούν τα ανόργανα άλατα που προσδίδουν τη σκληρή του σύσταση. Οι οστεοκλάστες ανασχηματίζουν σταθερά το εναποτιθέμενο οστό το οποίο βρίσκεται σε δυναμική κατάσταση σύνθεσης και αποδόμησης κάτω από τον έλεγχο ορμονικών και φυσικών παραγόντων. Ανάλογα με τον τρόπο που διατάσσονται οι ίνες κολλαγόνου για να σχηματίσουν το οστεοειδές διακρίνονται σε δικτυωτή και πεταλιώδη μορφή οστίτη οστού. Το υγιές οστό είναι πεταλιώδους τύπου, ενώ το οστό δικτυωτού τύπου σχηματίζεται σε περιπτώσεις πολύ γρήγορης παραγωγής νέου οστού, όπως συμβαίνει στην αποκατάσταση ενός κατάγματος ή στη νόσο Paget.

Ο κύκλος ανακατασκευής του οστού διατηρείται φυσιολογικά σε χαμηλούς ρυθμούς στον ώριμο ενήλικα, αλλά στα βρέφη και στα παιδιά είναι έντονος. Επιπρόσθετα, ο αυξημένος κύκλος ανακατασκευής των οστών στους ενήλικους μπορεί να είναι αποτέλεσμα παθολογικών καταστάσεων που οδηγούν σε κάποια οστική νόσο. Τα περισσότερα οστά έχουν μια βασική δομή που αποτελείται από:

- μία εξωτερική φλοιώδη ή συμπαγή ζώνη
- μία εσωτερική δοκιδώδη ή σπογγώδη ζώνη

Το φλοιώδες οστό σχηματίζει ένα άκαμπτο εξωτερικό περίβλημα, το οποίο ανθίσταται στις δυνάμεις παραμόρφωσης, ενώ η εσωτερική δοκιδώδης ζώνη ισχυροποιεί το οστό, καθώς λειτουργεί σαν ένα πολύπλοκο σύστημα εσωτερικών στηριγμάτων (Εικόνα)

Τα κύτταρα που θεωρούνται υπεύθυνα για την παραγωγή, διατήρηση και ανακατασκευή του οστεοειδούς είναι:

- τα οστικά αρχέγονα κύτταρα (οστεοπρογονικά)

- οι οστεοβλάστες
- τα οστεοκύτταρα
- οι οστεοκλάστες

Τα οστικά αρχέγονα κύτταρα αποτελούν ένα πληθυσμό αδιαφοροποίητων προγονικών κυττάρων που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οστεοπαραγωγά κύτταρα (οστεοβλάστες και οστεοκύτταρα). Στο ώριμο οστό τα οστικά αρχέγονα κύτταρα μοιάζουν με ινοβλάστες και εντοπίζονται κυρίως στην οστική επιφάνεια. Αντίθετα, σε ένα ενεργά αναπτυσσόμενο οστό, όπως για παράδειγμα τα οστά του εμβρύου, τα κύτταρα αυτά που ονομάζονται οστεοβλάστες, πολλαπλασιάζονται και μεγεθύνονται, εμφανίζοντας παχύτερο, ωοειδή πυρήνα και εμφανέστερο ατρακτόμορφο κυτταρόπλασμα.

Οι οστεοβλάστες είναι κυβοειδή ή πολυγωνικά κύτταρα με βασεόφιλο κυτταρόπλασμα ενδεικτικό της έντονης πρωτεϊνοσυνθετικής και εκκριτικής λειτουργίας τους.

Τα οστεοκύτταρα είναι ανενεργοί οστεοβλάστες που έχουν παγιδευτεί στην οστεοποιούμενη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Τα γειτονικά οστεοκύτταρα μπορούν να επικοινωνούν μεταξύ τους με μικρές κυτταροπλασματικές αποφυάδες, οι οποίες βρίσκονται μέσα σε στενούς αυλοειδείς χώρους. Πιθανόν να έχουν συμβολή στη διατήρηση του οργανικού στοιχείου της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του οστού.

Οι οστεοκλάστες είναι μεγάλα κύτταρα με πολλαπλούς πυρήνες και άφθονο κυτταρόπλασμα.. Προσκολλώνται στην ελεύθερη οστική επιφάνεια σε θέσεις ενεργού απορρόφησης του οστού, συχνά μέσα σε σκαφοειδή κοιλώματα που ονομάζονται κοιλότητες απορρόφησης ή βοθρία του Howship (Stevens & James, 1997).

1.2 Οστεοσάρκωμα

Το οστεοσάρκωμα είναι ο πιο κοινός όγκος των οστών στα παιδιά και τους εφήβους, στο 65% των περιπτώσεων προσβάλλει τις ηλικίες μεταξύ των 5 και 30 ετών (Jaffe, N, 2002). Σε μεγαλύτερες ηλικίες το οστεοσάρκωμα είναι συνήθως δευτεροπαθές και παρατηρείται σε υπάρχουσα νόσο του Paget ή σε περιοχές που έχουν ακτινοβοληθεί (Dahlin & Unni, 1977). Το κύριο χαρακτηριστικό του οστεοσαρκώματος είναι ο κακοήθης μετασχηματισμός των οστεοβλαστικών κυττάρων και η συσσώρευση άφθονης, ημιτελώς ασβεστοποιημένης, εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM) (Unni,1998). Το άφθονο περιεχόμενο της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας αλλάζει το μικροπεριβάλλον των οστών και έχει επιπτώσεις στην κανονική λειτουργία των οστεοβλαστικών κυττάρων και στη διαφοροποίηση των κακοήθων κυττάρων (Kido *et al*, 1999).

Το οστεοσάρκωμα αναπτύσσεται σε ποσοστό που ποικίλλει από 50-75% στις μεταφύσεις

του κάτω άκρου του μηριαίου οστού και του άνω άκρου της κνήμης (Συμεωνιδης 1992; Παπαδημητρίου, 1990). Σε ποσοστό μικρότερο του 20% παρουσιάζεται στην άνω μετάφυση του βραχιονίου οστού, ενώ σε λιγότερο απο 1% στα χέρια και τα πόδια. Συνήθως το οστεοσάρκωμα αναπτύσσεται κεντρικά στη μυελική κοιλότητα και επεκτείνεται προς τον οστικό φλοιό. Το περίοστεο, αρχικά υπεγείρεται από την αναπτυσσόμενη νεοπλασματική μάζα και



Σχήμα: 1. Α,Β: Οστεοσάρκωμα άνω μετάφυσης μηριαίου, σε νεαρή γυναίκα Γ: Επέκταση στα μαλακά μόρια της περιοχής, όπως αναδεικνύεται από το MRI. Δ, Ε: Εκτομή του όγκου και τοποθέτηση ενδοπρόθεσης. ΣΤ, Ζ: Μετά από 4 έτη και ενώ η ασθενής είναι ελεύθερη νόσου έγινε αντικατάσταση της μηριαίας πρόθεσης, εξαιτίας θραύσης του υλικού (Λαμπίρης, 2003).

αργότερα διηθείται από τα νεοπλασματικά κύτταρα του σαρκώματος, τα οποία στη συνέχεια επεκτείνονται στους γύρω ιστούς. Σε μεταγενέστερο στάδιο το οστεοσάρκωμα επεκτείνεται προς την επίφυση και ο συζευκτικός χόνδρος καταστρέφεται σταδιακά (Malawer *et al*, 1989). Οι περισσότεροι ασθενείς παρουσιάζουν ένα σύντομο ιστορικό με πόνο και οίδημα στη περιοχή που έχει προσβληθεί. Ο πόνος είναι αρχικά ήπιος και σπανίως ανησυχεί τον ασθενή στη φάση αυτή, ενώ αργότερα γίνεται εντονότερος και επιμένων .

1.2.1 Ταξινόμηση

Οι διάφοροι τύποι οστεοσάρκωματος που έχουν περιγραφεί βάσει των κλινικών, ακτινολογικών και ιστολογικών χαρακτηριστικών τους είναι οι ακόλουθοι :

α) Το κλασικό οστεοσάρκωμα που είναι η επιθετική (high grade) ενδομυελική βλάβη και αποτελεί τη συχνότερη (85%) μορφή. Ο όγκος συνήθως προσβάλλει τις

μεταφύσεις των μακρών οστών και μπορεί να εμφανίζει εξωοστική ή ενδομυελική επέκταση (Σχήμα 1). Μικροσκοπικά, ανάλογα με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά που επικρατούν αναγνωρίζονται ο οστεοβλαστικός, ο χονδροβλαστικός και ο ινοβλαστικός τύπος.

β) Το κεντρικό ή ενδοοστικό (χαμηλής βαθμίδος) οστεοσάρκωμα είναι και αυτό μία ενδομυελική βλάβη, που εμφανίζεται στις ίδιες ανατομικές περιοχές με το κλασικό οστεοσάρκωμα, έχει όμως καλύτερη πρόγνωση και προσβάλλει μεγαλύτερες ηλικίες.

γ) Το τηλεαγγειεκτακικό (telangiectatic) οστεοσάρκωμα είναι μια πολύ επιθετική βλάβη, με πτωχή πρόγνωση και αποτελεί το 5% των οστεοσαρκωμάτων.

δ) Το παραοστικό οστεοσάρκωμα είναι ένας τύπος επιφανειακού, παραφλοιώδους, οστεοσαρκώματος που αρχίζει από το φλοιώδες τμήμα των μακρών οστών. Προσβάλλει άτομα ηλικίας 20-40 ετών, έχει χαρακτηριστική εντόπιση στην οπίσθια επιφάνεια του κάτω άκρου του μοιριαίου οστού και αποτελεί το 3% των οστεοσαρκωμάτων (Σχήμα 2).



Σχήμα: 2. Παραοστικό οστεοσάρκωμα κάτω μετάφυσης μηριαίου (Λαμπίρης, 2003).

ε) Το περιοστικό (periosteal) οστεοσάρκωμα αποτελεί πολύ σπάνια οστική βλάβη, που αναπτύσσεται και αυτή στην οστική επιφάνεια, προσβάλλει συνήθως εφήβους και εντοπίζεται στη διάφυση των μικρών οστών. Ο ιστολογικός τύπος που επικρατεί είναι συνήθως ο χονδροβλαστικός.

στ) Δευτεροπαθές (secondary) οστεοσάρκωμα παρουσιάζεται σε περιοχές που πάσχουν από προκαρκινικές, μη νεοπλασματικές νόσους.

Η δευτεροπαθής νόσος συμβαίνει σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας και κατά το μεγαλύτερο ποσοστό εμπλέκεται με τη νόσο του Paget.

Περιοχές που έχουν υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία, αλλά και άλλες καταστάσεις όπως η ινώδης δυσπλασία, σπάνια εμφανίζουν σαρκωματώδη εξαλλαγή (Λαμπίρης, 2003)

1.2.2 Θεραπεία

Η αποτελεσματική θεραπεία του οστεοσαρκώματος απαιτεί τοπική και συστηματική αντιμετώπιση της νόσου. Ο τοπικός έλεγχος επιτυγχάνεται με χειρουργική αφαίρεση του όγκου, ενώ η συστηματική αντιμετώπιση του με διάφορα χημειοθεραπευτικά σχήματα.

1.2.3 Πρόγνωση

Η πρόγνωση των ασθενών με οστεοσάρκωμα έχει βελτιωθεί σημαντικά χάρις στα σύγχρονα χημειοθεραπευτικά σχήματα και τις χειρουργικές τεχνικές. Η θεραπεία επιτυγχάνεται στο 60% των περιπτώσεων στις οποίες δεν υπάρχουν πνευμονικές μεταστάσεις κατά τη διάγνωση, ενώ το συνολικό ποσοστό πενταετούς επιβίωσης είναι μεγαλύτερο από το 50%. Η ιστολογική μορφή του οστεοσαρκώματος δεν φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην πρόγνωση, ενώ είναι σημαντική η εντόπιση του οστεοσαρκώματος (κεντρικά ή περιφερικά αναπτυσσόμενος όγκος) καθώς και η εξωοστική επέκτασή του. Έτσι, οστεοσαρκώματα της λεκάνης και των άνω μεταφύσεων του βραχιονίου και του μηριαίου οστού έχουν δυσμενέστερη πρόγνωση. Επίσης, από τα οστεοσαρκώματα της κατά γόνυ αρθρώσεως, εκείνα της άνω μεταφύσεως της κνήμης εξελίσσονται ευνοϊκότερα από τα της κάτω μεταφύσεως του μηριαίου οστού (Συμεωνίδης 1992; Παπαδημητρίου, 1990).

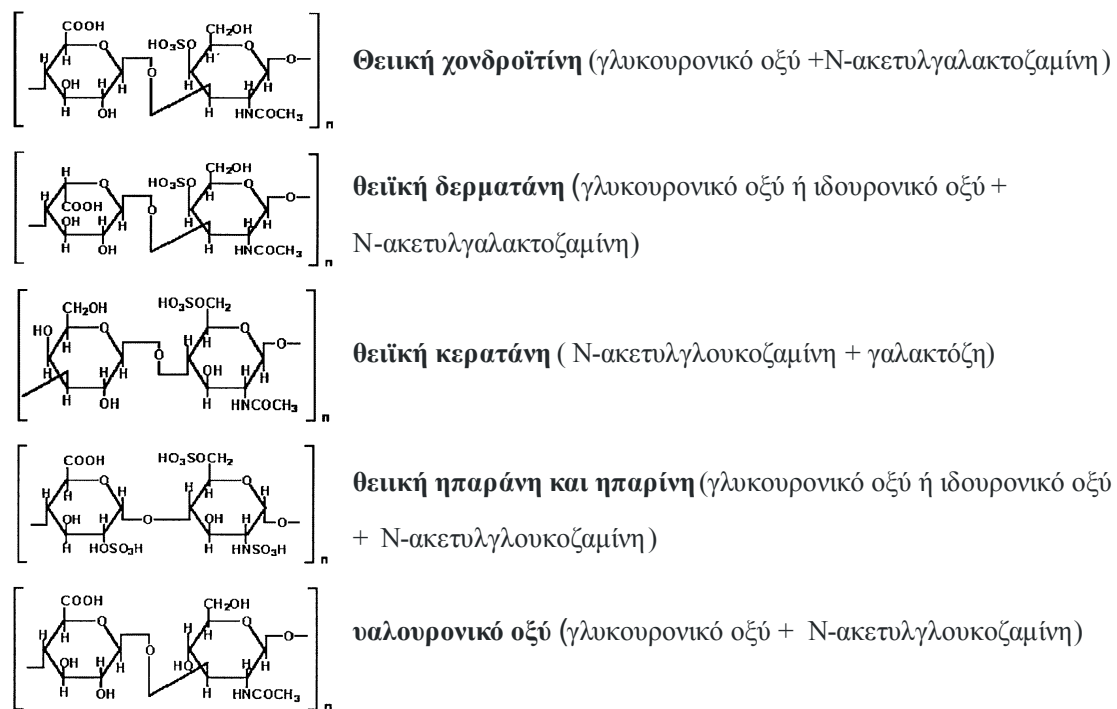
1.3 Οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs)

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) είναι γραμμικά πολυμερή αποτελούμενα από επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες που περιέχουν μια εξοζαμίνη και ένα ουρονικό οξύ ή γαλακτόζη στην περίπτωση της θειϊκής κερατάνης (Πίνακας 2.3.1). Οι εξοζαμίνες που απαντώνται στις γλυκοζαμινογλυκάνες είναι η γλυκοζαμίνη ή γαλακτοζαμίνη, οι οποίες στη δισακχαριτική μονάδα περιέχουν N-ακετυλο, O-θειϊκές ή N-θειϊκές ομάδες. Οι εξοζαμίνες συνδέονται γλυκοζιτικά με το D-γλυκουρονικό (D-GlcA) ή με το L-ιδουρονικό οξύ (L-IdoA) ή με D-γαλακτοζαμίνη. Ο τύπος της γλυκοζαμινογλυκάνης καθορίζεται από την εξοζαμίνη, το ουρονικό οξύ και από τις θέσεις των εστεροποιημένων θειϊκών ομάδων. Αρχικά η δομή των GAGs χαρακτηρίστηκε ως τυχαία, αλλά η ανάπτυξη μοριακών και βιοχημικών αναλυτικών τεχνικών υψηλής

Εισαγωγή

ευαισθησίας σηματοδότησε τη μεταβολή των αντιλήψεων αυτών (Hardingham & Fossang, 1992; Karamanos 1992, 1997).

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 καρβοξυλομάδες και οι εστεροποιημένεςθειικές ομάδες των GAGs είναι υπεύθυνες για το υψηλό αρνητικό φορτίο τους. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες βρίσκονται είτε ελεύθερες στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία είτε ομοιοπολικά συνδεδεμένες στον πρωτεϊνικό κορμό των πρωτεογλυκανών. Το μέγεθος και η ποιότητα της γλυκοζαμινικής αλυσίδας είναι που προσδίδουν στις πρωτεογλυκάνες τις χαρακτηριστικές λειτουργίες τους. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες εμπλέκονται σε μια ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών όπως



Σχήμα:3. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) είναι γραμμικά πολυμερή αποτελούμενα από επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες που περιέχουν μια εξοζαμίνη και ένα ουρονικό οξύ ή γαλακτόζη στην περίπτωση της θειϊκής κερατάνης.

ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η προσκόλληση και η μετανάστευση.

Οι GAGs διακρίνονται σε υαλουρονικό οξύ (HA), θειϊκή χονδροϊτίνη (CS), θειϊκή ηπαράνη (HS), ηπαρίνη (Hep) και θειϊκή κερατάνη (KS).

Η παρουσία των GAGs μπορεί να ρυθμίσει σε καλλιέργεια την ανάπτυξη τόσο των φυσιολογικών όσο και των καρκινικών κύτταρων. Έτσι, οι γλουκοζαμινογλυκάνες (GlcAGs) που περιέχουν L-IdoA όπως π.χ. η Hep και η HS, αναστέλλουν την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών από επιθηλιακά (Wright *et al*, 1989), μεσεγχυματικά κύτταρα (Takada *et al*, 2003) καθώς και ινοβλαστών πνεύμονος (Westergren-Thorsson *et al*, 1993). Η L-IdoA-περιέχοντας γαλακτοζαμινογλυκάνη (DS), αναστέλλει την ανάπτυξη των ινοβλαστών του πνεύμονος (Volpi *et al*, 1993), ενώ αντίθετα, η CS που δεν περιέχει L-IdoA διεγείρει τόσο τα U-937 κύτταρα λευχαιμίας όσο και τους ινοβλάστες πνεύμονος (Volpi *et al*, 1994). Επιπρόσθετα, έχει φανεί ότι η ανάπτυξη των U-937 λευχαιμικών κυττάρων εξαρτάται από τα επίπεδα της θείωσης της CS (Volpi *et al*, 1993) ενώ η ανάπτυξη των μεσοθηλιακών κύτταρων από τη συγκέντρωση και την δομή των GAGs (Syrokou *et al*, 1999).

1.3.1 Θεϊκή χονδροϊτίνη (CS)

Η δισακχαριτική μονάδα της CS αποτελείται από (D-GlcA) και N-ακετυλο-γαλακτοζαμίνη (GalNAc), συνήθως θειωμένη στις θέσεις C-4 ή C-6 που συνδέονται με $\beta 1 \rightarrow 3$ γλυκοζιτικό δεσμό. Υπάρχουν περιπτώσεις που η GalNAc είναι θειωμένη στις θέσεις C-4 και C-6 ή σε μια από αυτές και στη θέση C-2 ή C-3 του D-GlcA (Karamanos *et al*, 1995).

Περίπου το 70 % από τις συνολικές GAGs στα οστά είναι αλυσίδες CS/DS. Η παρουσία της CS κυμαίνεται κατά την διάρκεια της ωρίμανσης των οστών, με την μεγαλύτερη συγκέντρωση της να παρατηρείται στη φάση της ασβεστοποίησης (Waddington & Langley, 1998). Αυτό σχετίζεται με την μεγάλη ικανότητα της CS να δεσμεύει τα ιόντα ασβεστίου και να διευκολύνει την ανταλλαγή των ιόντων ασβεστίου με την επιφάνεια του νεοσχηματιζόμενου κρυστάλλου του υδροξυαπατίτη. Η παρουσία επίσης των αλυσίδων της CS συμβάλλει στην ινογένεση του κολλαγόνου (Vogel *et al*, 1984, Vogel & Trotter, 1987). Τη σημασία της CS στη ομοιοστάση των οστών υπογραμμίζει το γεγονός ότι η εξωγενής χορήγηση της CS αναστέλλει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών (Tenenbaum & Hunter, 1987).

Έρευνες έχουν δείξει τον ρόλο της θεϊκής χονδροϊτίνης στον ρυθμό ανάπτυξης φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων, καθώς και στην κινητικότητα και την μεταναστευτική τους ικανότητα.

1.3.2 Θεϊκή δερματάνη (DS)

Η επαναλαμβανόμενη δισακχαριτική ομάδα της θεϊκής δερματάνης (DS), αποτελείται από ουρονικό οξύ και μια N-ακέτυλο-γαλακτοζαμίνη. Η βιοσύνθεση της DS αρχίζει με τον

ίδιο τρόπο ως της CS, με την διαφορά ότι το D-GlcA να επιμερίζεται από την C-5 επιμεράση σε L-IdoA. Η διαδικασία του επιμερισμού έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ολιγοσακχαριτικών ομάδων DS μέσα στην αλυσίδα του πολυμερούς της CS. Έτσι, η αλυσίδα της DS έχει τη δομή ενός υβριδικού συμπολυμερούς που οι αλληλουχίες των δισακχαριτών που περιέχουν D-GlcA είναι περιορισμένου μήκους, συγκεκριμένης τοπογραφίας και θείωσης, ενώ οι δισακχαρίτες που περιέχουν L-IdoA σχηματίζουν μακρομοριακά τμήματα (Karamanos *et al*, 1995) που αποτελούνται από περιοχές CS και DS. Η ύπαρξη του L-IdoA στο μόριο της DS προσδίδει ελαστικότητα στην διαμόρφωσή της. Επιπλέον, μεταβάλλει το σχήμα και τον προσανατολισμό των θειϊκών ομάδων, προκίζοντας έτσι το μόριο με μεγαλύτερο αρνητικό φορτίο (Rosenberg *et al*. 1985; Choi *et al*, 1989).

Η ποσότητα της DS μειώνεται με το στάδιο της ωρίμανσης των οστών (Waddington & Langley, 1998) και φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τόσο την ινογένεση του κολλαγόνου όσο και την διαδικασία ασβεστοποίησης (Vogel *et al*, 1984, Vogel & Troter, 1987).

1.3.3 Θεϊκή κερατάνη (KS)

Η δισακχαριτική μονάδα της θεϊκής κερατάνης (KS) αποτελείται από β-D-γαλακτόζη ενωμένη με β1→4 γλυκοζιτικό δεσμό με την GlcNac. Η διαφορά της από τις άλλες GAGs είναι ότι περιέχει γαλακτόζη αντί ουρονικού οξέος και ότι οι δεσμοί της είναι αντεστραμμένοι σε σχέση με το HA και τις CS/DS.. Το μέγεθος της ανθρακικής της αλυσίδας καθώς επίσης και ο βαθμός θείωσης ποικίλουν με αποτέλεσμα το μοριακό της βάρος να είναι 4-20 kDa (Hascall & Riolo, 1972; Murata & Yokoyama, 1987). Στα θηλαστικά απαντώνται δύο τύποι KS, η KS I και η KS II. Η KS II βρίσκεται κυρίως στις μεγαλομοριακές πρωτεογλυκάνες του χόνδρου, ενώ η KS I εντοπίζεται στις μικρές πρωτεογλυκάνες θεϊκής κερατάνης, όπως η λουμικάνη (lumican) η ινομοδουλίνη (fibromodulin) και η οστεοαδχερίνη (osteoaderin). Η θεϊκή KS II προσδέεται μέσω O-γλυκοζιτικών δεσμών στον πρωτεϊνικό κορμό, ενώ η KS I συνδέεται μέσω N-γλυκοζιτικού δεσμού (Hoffman *et al*, 1967; Choi *et al*. 1975; Nilsson *et al*, 1983). Οι αλυσίδες τις KS I προσδεμένες στις μικρές πρωτεογλυκάνες εντοπίζονται στα οστά. (Ameye *et al*, 2002; Raouf *et al*, 2002; Ninomiya *et al*, 2007). Η βιολογική της σπουδαιότητα δεν είναι ακόμα γνωστή, ωστόσο φαίνεται να σχετίζεται με το στάδιο ωρίμανσης των οστών.

1.3.4 Ηπαρίνη (Hep) και θεϊκή ηπαράνη (HS)

Η βιολογική σπουδαιότητα της θεϊκής ηπαράνης έχει μελετηθεί και έχει δειχθεί η

συμμετοχή της σε πολλά βιολογικά σηματοδοτικά μονοπάτια που αφορούν βασικές λειτουργίες του κυττάρου (Salmivirta *et al*, 1996).

Η ηπαρίνη (Hep) και η θειϊκή ηπαράνη (HS) αποτελούνται από τη επαναλαμβανόμενη δισακχαριτική μονάδα GlcA και την N-ακέτυλο-γαλακτοζαμίνη (GlcNAc) που ενώνονται μεταξύ τους με το $\beta 1 \rightarrow 4$ γλυκοζιτικό δεσμό (Εικόνα 2.3.1). Εξαιτίας της δομικής τους ομοιότητας ο διαχωρισμός τους δεν είναι εύκολος. Οι διαφορές τους εντοπίζονται κυρίως στην N-θειώση που το ποσοστό της βρίσκεται στη μεν θειϊκή ηπαράνη κάτω από το 50%, στη δε ηπαρίνη στο 70% ή και υψηλότερα, με αποτέλεσμα η Hep να έχει περισσότερο αρνητικά φορτία από την HS (Fransson *et al*, 1986; Roden *et al*, 1992). Το πολυμερές είναι N-ακετυλιωμένο και N-θειωμένο στη γλυκοζαμίνη, κάτι που δημιουργεί περιοχές υπονήφειες για περαιτέρω δομικές τροποποιήσεις στην αλυσίδα. Η τοποθέτηση των θειωμένων μονάδων είναι κρίσιμη για να δημιουργηθούν μοναδικές θέσεις σύνδεσης κατά μήκος του πολυμερούς. Αυτό στη συνέχεια προσδιορίζει την ειδικότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών και της HS (Merry & Gallagher, 2002). Μπορεί επίσης να συμβεί επιμερισμός του GlcA στο IdoA δίνοντας έτσι αλληλουχίες [-IdoA(2-OSO₃)-GlcNSO₃(6-OSO₃)-]_n που εναλλάσσονται με περιοχές χαμηλής θειώσης πλούσιες σε GlcA, κάτι που είναι υπεύθυνο για την αντιπηκτική δράση της Hep (Karamanos *et al*, 1997). Η HS έχει γενικά μικρότερο ποσοστό IdoA και παρουσιάζει μεγαλύτερη δομική ποικιλία (Karamanos *et al*, 1997; Turnbull & Gallagher, 1991; Salmivirta *et al*, 1996). Τα χαρακτηριστικά αυτά δείχνουν την περιοδική και μη τυχαία κατανομή των IdoA, καθώς και της θέσης θειώσης της δομικής δισακχαριτικής μονάδας κατά την βιοσύνθεση των GAGs, υποδηλώνοντας με αυτό τον τρόπο την στενή σχέση της δομής και του βιολογικού τους ρόλου.

Η άμεση συμμετοχή των πρωτεογλυκανών θειϊκής ηπαράνης (HSPGs) στην ανάπτυξη της σπονδυλικής στήλης του ανθρώπου φαίνεται στις περιπτώσεις συνδρόμων που σχετίζονται με τις μεταλλάξεις της γλυπικάνης (glypican), της GPC3 (Cano-Gauchi, 1999) ή με τους υποδοχείς για τον FGF-2 (Song *et al*, 2004).

1.3.5 Υαλουρονικό οξύ (HA)

Το HA είναι η γλυκοζαμινογλυκάνη με την απλούστερη δομή. Αποτελείται από β -D-γλυκουρονικό οξύ (β -D-GlcA) συνδεδεμένο με $\beta 1 \rightarrow 3$ γλυκοζιτικό δεσμό με την N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη (β -D-GlcNAc) (Εικόνα 2.3.1). Οι δισακχαρίτες στο πολυμερές του HA συνδέονται με $\beta 1 \rightarrow 4$ γλυκοζιτικούς δεσμούς, δημιουργώντας έναν πολυσακχαρίτη με μοριακό βάρος που μπορεί να φτάσει, ανάλογα με τον ιστό προέλευσης, έως και πάνω από

2000 kDa (Holmes *et al*, 1988; Manicourt & Pitta, 1988). Διαφοροποιείται από τις υπόλοιπες γλυκοζαμινογλυκάνες από το γεγονός ότι δεν φέρει εστεροποιημένες θειϊκές ομάδες και δεν συνδέεται ομοιοπολικά με πρωτεΐνη (Laurent & Fraser, 1992).

Για πολλές δεκαετίες εθεωρείτο ότι η κύρια ιδιότητα του HA ήταν η βιοφυσική και ομοιοστατική λειτουργία του στους ιστούς. Πρόσφατες μελέτες εισηγήθηκαν το ρόλο του HA στην κυτταρική συμπεριφορά μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων με συγκεκριμένους υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη ή στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (Hardingham & Muir, 1972; Baker & Caterson, 1979; Bonnet *et al*, 1978; Miyake *et al*, 1990; Brown *et al*, 1991; LeBaron *et al*, 1992). Έτσι, το HA φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο σε κυτταρικά μονοπάτια που σηματοδοτούν κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η διαφοροποίηση των κυττάρων.

Το HA φαίνεται να ρυθμίζει τη διαμόρφωση των οστών. Η λειτουργία του εξαρτάται από το μέγεθος του πολυμερούς και τις αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένους πρωτεϊνικούς υποδοχείς. Λανθασμένη σύνθεση του HA προκαλεί παθολογικές καταστάσεις στα οστά (Bastow *et al*, 2008).

1.3.6 Σιαλικά οξέα

Τα σιαλικά οξέα συνιστούν μια οικογένεια που περιλαμβάνει περίπου 40 μονοσακχαρίτες που παράγονται από το N-ακετυλνιουραμινικό οξύ (Neu5Ac). Το Neu5Ac και το N-γλυκολυλνιουραμινικό οξύ (Neu5Gc) είναι τα επικρατούντα σιαλικά οξέα (Sia) στα θηλαστικά που συνήθως βρίσκονται στα μή αναγώμενα άκρα των ολιγοζαχαριδικών αλυσίδων στις γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια (Kelm & Schauer, 1997). Σε αντίθεση με τα περισσότερα θηλαστικά το Neu5Gc δεν εντοπίζεται στους φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς (Chou *et al*, 1998). Όμως τα γλυκοζυζεύγματα και των δύο σιαλικών οξέων έχουν βρεθεί στους καρκινικούς ιστούς (Tzanakakis *et al*, 2006).

Η σπουδαιότητα των σιαλικών οξέων στα οστά φαίνεται από το γεγονός ότι ορισμένες σιαλοπρωτεΐνες όπως η οστεοποντίνη (osteopontin), η σιαλοπρωτεΐνη των οστών (BSP) και η όξινη γλυκοπρωτεΐνη-75 των οστών (bone acidic glycoprotein-75) είναι σημαντικοί δείκτες των οστών (Butler, 1991).

1.4 Η βιοσύνθεση των GAGs

Η έναρξη της βιοσύνθεσης των GAGs συνδέεται με τη προσθήκη του αναγωγικού άκρου της ξυλόζης στο κατάλοιπο της σερίνης/ θριονίνης (serine/threonine) του πρωτεϊνικού κορμού στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και στα αρχικά διαμερίσματα του

συμπλέγματος των Golgi με τη βοήθεια του ενζύμου ξυλοσιλτρανσφεράσης (xylosyltransferase) για τον πολυμερισμό της θειϊκής χονδροϊτίνης/δερματάνης και της ηπαράνης (Grebner *et al*, 1966; Kjellen & Lindahl, 1991). Στη συνέχεια προστίθεται η γαλακτόζη με τη βοήθεια του ενζύμου γαλακτοσιλτρανσφεράσης I (galactosyltransferase I) (Telser *et al*, 1965, 1966). Δεν συμβαίνει το ίδιο με την θειϊκή κερατάνη και το υαλουρονικό οξύ. Οι αλυσίδες της θειϊκής κερατάνης προσδένονται στον πρωτεϊνικό κορμό των PGs είτε μέσω της πρόσδεσης των N-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNac) - ασπαραγίνης (asparagines) είτε μέσω των N-ακετυλογαλακτοζαμίνης (GalNac) - σερίνης/ θριονίνης. Ο πολυμερισμός της θειϊκής χονδροϊτίνης/δερματάνης και της ηπαράνης στο διπεπτίδιο της σερίνης/ θριονίνης συνεχίζεται με τη προσθήκη της επόμενης γαλακτόζης και με τη βοήθεια του ενζύμου γαλακτοσιλτρανσφεράσης II (galactosyltransferase II) το οποίο αναγνωρίζει τα δύο προηγούμενα σάκχαρα που είναι ήδη συνδεδεμένα με τον πρωτεϊνικό κορμό. Στη συνέχεια το γλυκουρονικό οξύ μεταφέρεται με το ένζυμο γλουκουρονιλτρανσφεράση I (glucuronyltransferase I) (Helting & Roden, 1969; Manzi *et al*, 1995; Sugahara *et al*, 1995; Sugahara & Kitagawa, 2000; Sugahara, Mikami, & Uyama, 2003). Το HA δεν προσδένεται σε πρωτεϊνικό κορμό.

1.4.1 Η βιοσύνθεση Hep/HS.

Το πρόδρομο πολυμερές στην βιοσύνθεση των Hep/HS αρχικά τροποποιείται μέσω αποακετυλίωσης και θείωσης των μονάδων GlcNac για να δημιουργηθεί ένα μερικώς θειωμένο προϊόν το οποίο αναγνωρίζεται 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-ακετυλίωσης, αλλά όχι σε αυτές με συνεχόμενη N-ακετυλίωση (Hook *et al*, 1974; Sasisekharan & Venkataraman, 2000).

1.4.2 Η βιοσύνθεση των DS/CS.

Με τη βοήθεια των ένζυμων, N-ακετυλγαλακτοζαμινυλ-τρανσφεράση (N-acetylgalactosaminyl-transferase) και γλουκουρονυλ-τρανσφεράση (glucuronyl-transferase), επιτυγχάνεται η επιμήκυνση των αλυσίδων CS και DS. Ένας μονοσακχαρίτης προστίθεται στο τελικό άκρο της γλυκοζαμινογλυκανικής αλυσίδας με τη ταυτόχρονη προσθήκη των ομάδων θείου (De Luca *et al*, 1973). Ο ανόργανος φώσφορος ενεργοποιείται με τη βοήθεια του ATP σε φωσφοαδενοσυλφωσφοθειικό (phosphoadenosylphosphosulphate, PAPS), που δίνει τη φωσφορική του ομάδα στις GAGs. Ειδικά ένζυμα, οι σουλφοτρανσφεράσες (sulphotransferases), καταλύουν αυτή την αντίδραση δίνοντας τη θειϊκή ομάδα στον άνθρακα 4 ή 6 του GalNAc. Η βιοσύνθεση της δερματάνης φαίνεται να είναι όμοια με αυτή της χονδροϊτίνης, με την εξαίρεση ότι το D-GlcA επιμερίζεται σε L-IdoA (Malmstrom & Fransson, 1975).

1.4.3 Η βιοσύνθεση της KS

Η σύνδεση της KS με τον πρωτεϊνικό κορμό μπορεί να επιτευχθεί μέσω N- ή O-γλυκοζιτικού δεσμού, ανάλογα με την πρωτεογλυκάνη. Στις μικρού μοριακού μεγέθους PGs, η σύνθεση γίνεται με N-δεσμό, ενώ στις μεγάλου μεγέθους με O- γλυκοζιτικό δεσμό. 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 γλυκοζαμινογλυκάνης. Στην δεύτερη περίπτωση, η περιοχή σύνδεσης αποτελείται από έναν διακλαδιζόμενο ολιγοσακχαρίτη GalNAc, συνδεδεμένο μέσω ενός υπόλοιπου σερίνης ή θρεονίνης με τον πρωτεϊνικό κορμό. Η GalNAc διακλαδίζεται σε μια συνδεδεμένη με σιαλικό οξύ Gal και μια Gal, η οποία αποτελεί το πρώτο σάκχαρο της αλυσίδας της KS (Funderburgh, 2002).

1.4.4 Η βιοσύνθεση της HA

Η σύνθεση του HA πραγματοποιείται στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και εκκρίνεται από τα κύτταρα χωρίς να μεσολαβεί η σύνδεση του με κάποιο πρωτεϊνικό κορμό, όπως συμβαίνει με τις υπόλοιπες GAGs (111 M). Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση του HA ανήκουν στο ενζυμικό σύστημα των συνθασών του HA και είναι τα HAS1, 2 και 3. Η βιοσύνθεση της αλυσίδας επιτυγχάνεται με εναλλακτική μεταφορά του UPD-επιμηκυσμένου μεγαλομορίου σε UDP-GlcUA και UDP-GlcNAc και ταυτόχρονη απελευθέρωση μιας UDP μονάδας. Ο τερματισμός της επιμήκυνσης φαίνεται

να οφείλεται στην μη ενεργοποίηση της συνθάσης από μεγάλο μοριακού βάρους, υαλουρονικό οξύ που δεσμεύεται από το ένζυμο. Παράλληλα με την επιμήκυνση πραγματοποιείται και 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 υαλουρονικού οξέος. 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 επανεργοποίηση της συνθάσης για το σχηματισμό νέων αλυσίδων (Itano & Kimata, 2002).

Το υαλουρονικό οξύ αμέσως μετά την ολοκλήρωση της βιοσύνθεσης του, διαχέεται στον εξωκυττάριο χώρο. Η διάχυση γίνεται με αποικοδόμηση που οφείλεται σε ελεύθερες ρίζες ή με αποδέσμευση ακέραιων μεγαλομορίων (Fraser & Laurent, 1989).

1.4.5 Η βιοσύνθεση των σιαλικών οξέων

Η βιοσύνθεση του πιο κοινού σιαλικού οξέος, του Neu5Ac, αρχίζει με την δημιουργία της N-ακετυλμανοζαμίνης (ManNAc) από την UDP-N-ακετυλγλυκοζαμίνη (UDP-GlcNAc). Στα θηλαστικά το ManNAc φωσφορυλιώνεται και μετατρέπεται σε ManNAc 6-φωσφορικό άλας (ManNAc-6P). Το δεύτερο βήμα της βιοσύνθεσης, περιέχει ζυζεύγματα του ManNAc ή του ManNAc-6P με το φωσφοενολπυροσταφυλικό οξύ να δημιουργεί το Neu5Ac ή το Neu5Ac-9P, αντίστοιχα. Τελικά, με την συμμετοχή της τριφωσφορικής κυτοσίνης (CTP), δημιουργείται η ενεργοποιημένη μορφή του σιαλικού οξέος, το CMP-σιαλικό οξύ. Οι σιαλοτρανσφεράσες ενσωματώνουν αυτή την ενεργοποιημένη μορφή του σιαλικού οξέος στις γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια (Tanner, 2005).

1.5 Οι Πρωτεογλυκάνες

Οι PGs είναι μια πανταχού παρούσα οικογένεια βιομορίων, που περιέχουν ένα πρωτεϊνικό κορμό με τον οποίο είναι συνδεδεμένες ομοιοπολικά μια ή περισσότερες θειωμένες αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών. Το μέγεθος του πρωτεϊνικού κορμού ποικίλλει από 10 έως > 500 kDa και κωδικοποιείται από γονίδια τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες. Η μεγάλη διαφορά στην δομή του πρωτεϊνικού κορμού των διαφόρων ομάδων PGs τους δίνει την δυνατότητα να συμμετέχουν σε ποικίλλες κυτταρικές λειτουργίες (Iozzo, 1998). Οι PGs έχει βρεθεί ότι βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες (κυρίως η θειϊκή ηπαράνη), στους ενδοκυττάριους χώρους, στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, καθώς

και στην βασική μεμβράνη των περισσότερων ιστών στους ενήλικες (Σχήμα 2.4.1).

1.5.1 Υαλεκτάνες

Οι PGs που φέρουν γαλακτοζαμινογλυκάνες (CS και DS) εντοπίζονται κυρίως στον εξωκυττάριο χώρο αλλά και στην κυτταρική μεμβράνη (Kjellen & Lindahl, 1991). Οι πιο γνωστές CSPGs μεγάλου μοριακού μεγέθους του εξωκυτταρίου χώρου είναι η οικογένεια των υαλεκτανών (hyalectans) όπως είναι η αγκρικάνη (aggrecan), η βερσικάνη (versican), η νευρικάνη (neurocan) και η μπρεβικάνη (brevican), με κύριο χαρακτηριστικό τη συζευξιμότητα με το HA και τη διαφορετική τοπολογία τους (Iozzo & Murdoch, 1996). Οι κυριότερες υαλεκτάνες είναι η αγκρικάνη και η βερσικάνη .

Η βερσικάνη απομονώθηκε αρχικά από τους ινοβλάστες (Krusius *et al*, 1987). Στον άνθρωπο εντοπίζεται κυρίως στα κερατινοκύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα των τοιχωμάτων των αγγείων, στον εγκέφαλο και τους χόνδρους (Iozzo,1998). Το γονίδιο της εντοπίζεται στη θέση 5q13.2 του ανθρώπινου χρωμοσώματος (Zimmermann & Ruoslahti, 1989). Στα θηλαστικά υπάρχουν τέσσερα πρωτεϊνικά προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου της βερσικάνης. Αυτές οι ισομορφές είναι η βερσικάνη V0, V1, V2 και V3 (Iozzo,1998).

Ο πρωτεϊνικός κορμός της βερσικάνης V0 αποτελείται από τρεις περιοχές, την I, II και III. Η περιοχή I βρίσκεται στο N-τελικό άκρο της, ενώ η περιοχή II περιέχει τις GAG-α και GAG-β υπομονάδες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη πρόσδεση έως και 30 αλυσίδων θειϊκής χονδροϊτίνης/δερματάνης καθώς και των N- και O-ολιγοσακχαριτών (Iozzo,1998). Τέλος, η περιοχή III αποτελείται από μια σειρά από επαναλαμβανόμενα δομικά μοτίβα όμοια με αυτά του EGF, ένα τμήμα του οποίου ομοιάζει με τον C-τύπο λεκτίνης και μια περιοχή που μοιάζει με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη του συμπληρώματος (Iozzo,1998; Aspberg *et al*, 1995). Ανάλογα με το μάτισμα του γονιδίου, χάνονται τμήματα της περιοχής II στις περιπτώσεις των V1 και V2, ενώ στη περίπτωση της V3 απουσιάζει ολόκληρη η περιοχή II. Οι ισομορφές της βερσικάνης παίζουν σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά του κυττάρου.

Ο πρωτεϊνικός κορμός της αγκρικάνης ποικίλλει σε μήκος και έχει συνδεδεμένες διαφορετικές αλυσίδες GAGs. Το μοριακό της βάρος κυμαίνεται από 1 έως 3,5 MDa, ανάλογα με τον τύπο του ιστού. Μαζί με το υαλουρονικό οξύ συνιστούν μεγαλομοριακά συσσωματώματα μοριακού βάρους έως και 800 MDa.

Στον πρωτεϊνικό κορμό της αγκρικάνης εντοπίζονται τρεις περιοχές, η I, II και III. Η

περιοχή I στο N-τελικό άκρο της περιέχει μια αλληλουχία που μοιάζει με ανοσοσφαιρίνη (Doerge *et al*, 1991). Στη περιοχή II βρίσκονται οι θέσεις πρόσδεσης των GAGs που μπορεί να φέρουν μέχρι και 100 αλυσίδες (Doerge *et al*, 1997). Η περιοχή III αποτελείται από επαναλαμβανόμενα δομικά μοτίβα όμοια με εκείνο του EGF, ένα τμήμα της ομοιάζει με τον C-τύπο της λεκτίνης και μια περιοχή της ομοιάζει με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη του συμπληρώματος (Fulop *et al*, 1993). Μέσω του τμήματος που ομοιάζει με τον C-τύπο της λεκτίνης, η αγγρικήνη 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 (Iozzo,1998).

1.5.2 Μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες

Μια άλλη οικογένεια CSPGs του εξωκυττάρου χώρου με μικρό μοριακό μέγεθος είναι οι μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRP) οι οποίες κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες. Η κατηγορία I περιλαμβάνει την διακοσμητίνη (decorin) και τη διγλυκάνη (biglycan), η κατηγορία II τις ινομοδουλίνη (fibromodulin), λουμικάνη (lumican), PRELP, κερατοκάνη (keratocan) και οστεοατχερίνη (osteoadherin) 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 ανακαλυφτεί η οπτικήνη (opticin) και η ασπορίνη (asporin) (Reardon *et al*, 2000; Lorenzo *et al*, 2001). Αυτές οι PGs παρουσιάζουν ομολογία ως προς τον πρωτεϊνικό κορμό, με το μοριακό βάρος του πρωτεϊνικού τους κορμού να κυμαίνεται από 36-40 kDa έχοντας όμοια αλληλουχία των αμινοξέων (Hocking *et al*, 1998; Day *et al*, 1987; Fisher *et al*, 1989; Oldberg *et al*, 1989). Οι πρωτεϊνικοί τους κορμοί έχουν μοτίβα πλούσια σε λευκίνη, τα οποία επαναλαμβάνονται 9-10 φορές στο C-τελικό άκρο τους. Το N-τελικό τους άκρο παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία τόσο στην αλληλουχία των αμινοξέων όσο και στο βαθμό γλυκοζυλίωσης. Αυτές οι περιοχές φαίνεται να παίζουν ρόλο στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου με κύτταρο και μεταξύ του κυττάρου και εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Iozzo,1998).

1.5.3 Πρωτεογλυκάνες της βασικής μεμβράνης

Στις PGs της βασικής μεμβράνης περιλαμβάνονται κυρίως η περιλεκάνη (perlecan), η

αγκρίνη (agrin) και η μπακανάνη (bacanan) οι οποίες εντοπίζονται ως επί το πλείστον στις βασικές μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων και των αγγείων.

Η περλεκάνη (perlecan) είναι η κύρια πρωτεογλυκάνη θειϊκής ηπαράνης (HSPG) του εξωκυττάρου χώρου που επικρατεί στις βασικές μεμβράνες (Iozzo, 1994). Ο πρωτεϊνικός της κορμός είναι περίπου 400 kDa, στο N-άκρο του οποίου συνδέονται 2-3 γλυκοζαμινικές αλυσίδες κυρίως θειϊκής ηπαράνης με μοριακό βάρος περίπου 40-60 kDa (Noonan *et al*, 1991). Ο πρωτεϊνικός της κορμός περιέχει 5-7 ποικιλόμορφου μεγέθους σφαιρικά τμήματα που συνδέονται μεταξύ τους μέσω ραβδόμορφων τμημάτων (Olsen, 1999; Noonan & Hassel, 1993). Περιστασιακά, έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη αλυσίδων θειϊκής ηπαράνης και θειϊκής χονδροϊτίνης/δερματάνης στον πρωτεϊνικό κορμό της περλεκάνης (Danielson *et al*, 1992). Η βιολογική σπουδαιότητα της περλεκάνης δεν είναι ακόμα γνωστή. Ωστόσο, λόγω της δομής της έχει προταθεί ότι μπορεί να αλληλεπιδρά με συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες (Iozzo, 1998). Έρευνες επίσης δείχνουν τη πιθανή συμμετοχή της στη κυτταρική προσκόλληση μέσω της αλληλεπίδρασής της με την ινονεκτίνη (Singer *et al*, 1987).

1.5.4 Ενδοκυττάρια και της κυτταρικής επιφάνειας PGs

Οι PGs της κυτταρικής επιφάνειας απαρτίζουν ποικίλες ομάδες μορίων με πολλές και διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες. Αυτές είναι: οι συνδεκάνες (syndecans), οι γλυπικάνες (glypicans), οι σεργιλίνες (serglylins), η μπεταγλυκάνη (beatglycan) και η οικογένεια των CD44.

Οι συνδεκάνες εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη και είναι μια οικογένεια HSPG με τέσσερα γνωστά μέλη, την συνδεκάνη-1, την ινογλυκάνη (fibroglycan) ή συνδεκάνη -2, την N-συνδεκάνη ή συνδεκάνη -3 και την αμφιγλυκάνη, ρουντοκάνη (amphiglycan, ruodocan) ή συνδεκάνη -4 (Couchman, 2003). Ως προς τον πρωτεϊνικό κορμό τους, παρουσιάζουν περιορισμένες αλλά σημαντικές δομικές ομοιότητες ενώ ορισμένες από αυτές (συνδεκάνη-1 και -4) εμφανίζονται ως υβρίδια της HS και της CS (Oh & Couchman 2004; Deera *et al*, 2004).

Οι πρωτεογλυκάνες της οικογένειας της CD44 μπορούν να υπάρχουν είτε με την μορφή πρωτεογλυκάνης είτε με μή-πρωτεογλυκανική μορφή. Οι γλυκοζαμινικές αλυσίδες που προσδένονται είναι θειϊκή χονδροϊτίνη ή θειϊκή ηπαράνη. Το CD44 είναι ο κύριος κυτταρικός υποδοχέας του υαλουρονικού οξέος (Miyake *et al*, 1990). Μέσω του εναλλακτικού ματίσματος δημιουργούνται διαφορετικές ισομορφές που παίζουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση του κυττάρου.

Τέλος, μια άλλη οικογένεια HSPGs, οι γλυπικάνες, συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη με γλυκοφωσφατιδυλοϊνοσιτολικό σύνδεσμο (GPI-anchor) (David, 1993).

Οι ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες των PGs τις καθιστούν ρυθμιστές της οργάνωσης του εξωκυττάριου χώρου, ενώ συμμετέχουν στη ρύθμιση πληθώρας κυτταρικών γεγονότων, όπως η κυτταρική προσκόλληση, μετακίνηση, διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμός τους (Karamanos, 1999). Η ρυθμιστική δράση των PGs πραγματοποιείται μέσω των αλληλεπιδράσεων τους με δραστικά μακρομόρια του εξωκυττάριου χώρου καθώς και με αυξητικούς παράγοντες, κυρίως μέσω των γλυκανικών αλυσίδων τους (GAGs). Οι PGs της κυτταρικής μεμβράνης παίζουν σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά του κυττάρου, το σχήμα και τον κυτταρικό φαινότυπο. Ένα καλά μελετημένο παράδειγμα πρωτεογλυκανών της κυτταρικής μεμβράνης είναι οι συνδεκάνες (Couchman & Woods, 1996; Dobra *et al*, 2000).

Οι λειτουργίες των συνδεκανών ποικίλλουν από κύτταρο σε κύτταρο. Η εξωκυττάρια περιοχή της συνδεκάνης δεσμεύει εκλεκτικά και πιθανώς μέσω των γλυκανών, εξωκυττάρια δραστικά μακρομόρια (ligands). Η δέσμευση των προαναφερθέντων μακρομορίων προάγει την αλληλεπίδραση των συνδεκανών με τον κυτταρικό σκελετό που είναι πλούσιος σε ακτίνη. Τα κύτταρα μπορούν να αποδεσμευτούν από αυτή την αλληλεπίδραση με τη διάσπαση του πρωτεϊνικού μέρους των πρωτεογλυκανών με πρωτεολυτικά ένζυμα όπως η θρυψίνη. Έτσι, οι συνδεκάνες συμμετέχουν αποδεδειγμένα στον καθορισμό του τελικού σχήματος του κυττάρου και κατ' επέκταση στο φαινότυπο και στη μορφολογία του κυττάρου (Dobra *et al*, 2000). Το υδατανθρακικό μέρος των συνδεκανών διαφέρει επίσης σημαντικά από κύτταρο σε κύτταρο και η ποικιλομορφία της γλυκοζυλίωσης οδηγεί στη διαφοροποίηση της ικανότητας δέσμευσης των δραστικών μακρομορίων του εξωκυττάριου χώρου (Sanderson *et al*, 1994). Οι αυξητικοί παράγοντες επιδρούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κύρια μέσω των HS των συνδεκανών που δρουν ως υποδοχείς ή συνυποδοχείς στη κυτταρική επιφάνεια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η δέσμευση του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (bFGF) στη HS. Η ελάχιστη δομική απαίτηση για τη δέσμευση είναι ένας πεντασακχαρίτης που περιέχει ένα IdoA θειωμένο στον C-2 και μια ή δύο HNSO₃ υποδεικνύοντας ότι η πρόσδεση των μακρομορίων δεν οφείλεται σε τυχαίες ηλεκτροστατικές έλξεις (Zhou *et al*, 1997; Faham *et al*, 1996).

Το κύριο χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι η ανικανότητά τους να διαφοροποιούνται και να επιτελούν τις λειτουργίες των αντίστοιχων φυσιολογικών κυττάρων, όπως η διατήρηση της κανονικής αρχιτεκτονικής και λειτουργίας του ιστού. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μικρού βαθμού διαφοροποίησης εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα συνδεκάνης-1 συγκριτικά με τα φυσιολογικά (Mali *et al*, 1994). Η μεγάλη

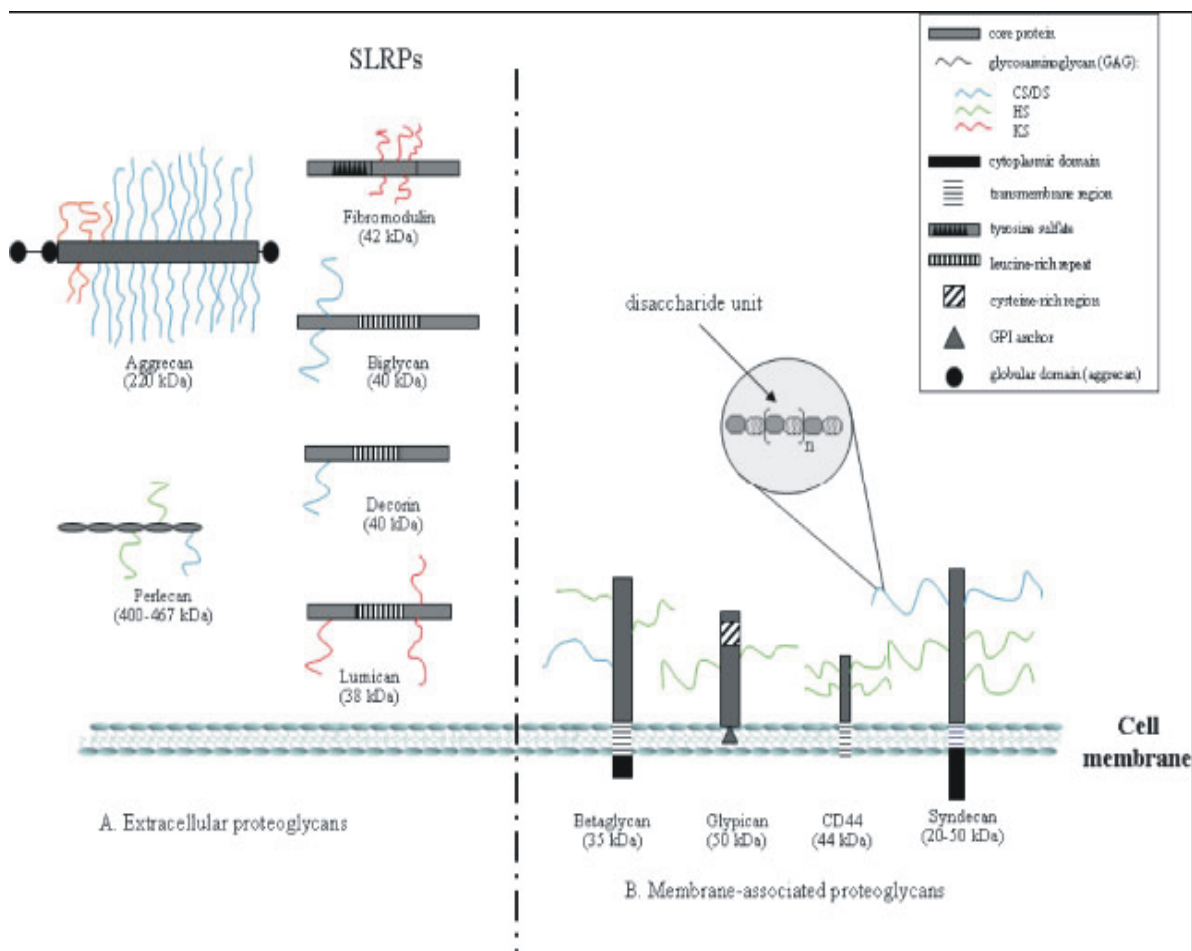
«επιθετικότητα» αυτών των καρκινικών όγκων αναστέλλεται με την υπερέκφραση της συνδεκάνης-1 και σχετίζεται με την αλληλεπίδραση με μόρια κολλαγόνου. Μόρια συνδεκάνης-1 από διαφορετικά κύτταρα δεν έχουν την ίδια συγγένεια για το κολλαγόνο-1 και η δομή της HS αναδεικνύεται ως ο ρυθμιστής της ισχύος των αλληλεπιδράσεων (Sanderson *et al*, 1994; Liebersbach & Sanderson, 1994). Ο ρόλος των αλυσίδων CS είναι λιγότερο γνωστός. Η μέτρηση των επιπέδων της συνδεκάνης-1 έχει χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης σε καρκινώματα της κεφαλής και του λαιμού (Inki *et al*, 1994).

1.5.5 Η βιοσύνθεση των πρωτεογλυκανών

Ο πρωτεϊνικός κορμός των πρωτεογλυκανών συντίθεται με τις γνωστές διεργασίες της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Αυτό σημαίνει ότι το ειδικό mRNA μεταγράφεται από το DNA που ακολούθως μεταφράζεται σε πρωτεΐνη. Στη συνέχεια το συντιθέμενο πολυπεπτίδιο μεταφέρεται μέσω του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου στο σύμπλεγμα της συσκευής Golgi. Εκεί προστίθενται οι υδατάνθρακες και πραγματοποιείται η θειώση των GAGs στο τελευταίο στάδιο της βιοσύνθεσης τους. (Esko & Selleck, 2002; Kjellen & Lindahl 1991; Iozzo, 1998; Sugahara, *et al*, 2003). Στη συνέχεια η πρωτεογλυκάνη είτε εκκρίνεται (π.χ. η αγκρικάνη, η διακοσμιτίνη, η διγλυκάνη), είτε μεταφέρεται στη κυτταρική μεμβράνη (π.χ. συνδεκάνες, CD-44), είτε πακετάρεται και παραμένει μέσα στο κύτταρο (π.χ. σεργιλίνες). Η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών αρχίζει στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο.

1.6 Πρωτεογλυκάνες και οστά

Οι πρωτεογλυκάνες είναι σημαντικά συστατικά των μη-κολλαγονοδών μακρομορίων του οστού. Συντίθενται και εκκρίνονται από τους οστεοβλάστες, και συμμετέχουν στον έλεγχο της ασβεστοποίησης των οστών (Chen & Boskey, 1985). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι PGs της κυτταρικής μεμβράνης (κυρίως η θειϊκή ηπαράνη) συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση κύτταρο με κύτταρο και κύτταρο με εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και μπορούν να παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό και την διατήρηση του οστίτη ιστού (Hook *et al*, 1984). Είναι γνωστό, ότι ανθρώπινα κύτταρα των οστών παράγουν κυρίως (α) πρωτεογλυκάνες πλούσιες σε λουμικάνη (SLRP), (β) μεγάλου μοριακού μεγέθους πρωτεογλυκάνες που φέρουν γαλακτοζαμινογλυκάνες (υαλεκτάνες) και (γ) πρωτεογλυκάνες που φέρουν την θειϊκή ηπαράνη (Σχήμα 4)



Σχήμα: 4. Δομή και κατανομή των κύριων πρωτεογλυκανών στα οστά. (A) Πρωτεογλυκάνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (B) Πρωτεογλυκάνες συνδεδεμένες στη κυτταρική μεμβράνη. (Πηγή: Mintz, 2006)

1.6.1 SLRPs και οστεοσάρκωμα

Αυτή η ομάδα των PGs που συμπεριλαμβάνει τις διγλυκάνη, διακοσμιτίνη, φιμπρομοδουλίνη, λουμικάνη και οστεοαδερίνη μεταξύ των άλλων χαρακτηριστικών της είναι και η άφθονη παρουσία της στο οστεοειδές (Waddington, 1999). Το χαρακτηριστικό σε σχήμα πετάλου αλόγου πρωτεϊνικού τους κορμού τις κάνει να αλληλεπιδρούν με άλλα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, (κυρίως με ίνες κολλαγόνου), αλλά και με την ανόργανη φάση στη διάρκεια της ασβεστοποίησης. Έχει αναφερθεί μετά από απομόνωση και χαρακτηρισμό των PGs, η παρουσία διγλυκάνης και διακοσμιτίνης σε ανθρώπινα κύτταρα εμβρυϊκού οστού (Fisher *et al*, 1987,) ενώ σε κύτταρα ώριμου οστού απουσιάζει η διγλυκάνη (Fisher, 1985). Σε μελέτες κυτταρικών καλλιέργειών παρατηρήθηκε ότι η διγλυκάνη είναι μεταξύ των κυρίως εκκρινόμενων προϊόντων των οστεοβλαστών, ενώ σε καλλιέργειες κυττάρων ανθρώπινου οστεοσάρκωματος (MG-63)

ανευρέθει σε μικρότερη ποσότητα και δεν ανευρέθηκε στα κύτταρα μιας άλλης κυτταρικής σειράς (Saos-2) οστεοσαρκώματος (Ungefroren *et al*, 1997; Beneyahu *et al*, 2001). Η απουσία της διγλυκάνης από τα κύτταρα του δεύτερου οστεοσαρκώματος θεωρήθηκε ότι ενδεχομένως αλλάζει την σύσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και η αλλαγή αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την μη-οστεοποίηση του οστεοειδούς που παράγεται από τα κύτταρα του οστεοσαρκώματος. Η ινομοδουλίνη βρέθηκε να εκφράζεται στη εσωτερική ζώνη ανάπτυξης του χόνδρου, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να παίζει ρόλο στη ενδοχόνδρια οστεοποίηση (Alini & Roughley, 2001). Η λουμικάνη έχει βρεθεί ότι έχει σημαντική συμμετοχή στη ρύθμιση του σχηματισμού των ινών του κολλαγόνου στο οστεοϊδές και ότι σχετίζεται με το στάδιο ωρίμανσης του οστεοειδούς (Raouf *et al*, 2002).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι οι SLRPs εμπλέκονται στην δομική οργάνωση του οστεοειδούς. Έχουν δημιουργηθεί ποντίκια με ελλιπή έκφραση της διγλυκάνης, ινομοδουλίνης, διακοσμιτίνης και της λουμικάνης με σκοπό την καλύτερη μελέτη των SLRPs στην οργάνωση του οστεοειδούς *in vivo*. Η έλλειψη της διγλυκάνης σε ποντίκια προκαλεί αλλαγές στο μέγεθος των ινών του κολλαγόνου και στο σχήμα των οστών ενώ η έλλειψη της διακοσμιτίνης προκαλεί αλλαγές στη πυκνότητα του δέρματος (Corsi *et al*, 2002). Η ρύθμιση του σχηματισμού ινιδίων κολλαγόνου σχετίζεται με την τριαδιάστατη δομή της διακοσμιτίνης σε σχήμα πετάλου αλόγου το οποίο παρέχει μια τριπλή έλικα του κολλαγόνου (Weber *et al*, 1996). Ωστόσο η έλλειψη της διακοσμιτίνης δεν επηρεάζει την οστική μάζα και δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές στη μορφολογία των οστών. Ποντίκια με knock-out διγλυκάνης αποτυγχάνουν να έχουν μέγιστη οστική μάζα λόγω της μείωσης στη παραγωγή των οστών η οποία οφείλεται στο μειωμένο αριθμό και δραστηριότητα των οστεοβλαστών (Xu *et al*, 1998). Παρομοίως, τα ποντίκια που έχουν έλλειψη στη διγλυκάνη έχουν μειωμένη ικανότητα να παράγουν κύτταρα του στρώματος στο μυελό των οστών (bone marrow stromal cells). Τα κύτταρα αυτά έχουν μειωμένη αντίδραση στο TGF- β , μειωμένη σύνθεση κολλαγόνου και σχετικά μεγαλύτερη απόπτωση σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Επιπλέον, η απουσία της διγλυκάνης αλλάζει το μέσο όρο στη διάμετρο των ινών κολλαγόνου εξαιτίας της προκαλούμενης αύξησης τους (Corsi *et al*, 2002). Μορφολογική ανάλυση της διγλυκάνης / διακοσμιτίνης knock out ποντικών αποκάλυψε ότι η οστική τους μάζα ήταν πολύ μειωμένη συγκρινόμενη με αυτή των φυσιολογικών ποντικών (Corsi *et al*, 2002). Κατά συνέπεια η επίδραση της διπλής ανεπάρκειας διγλυκάνης / διακοσμιτίνης έδρασε συνεργιστικά στα οστά, αν και η ανεπάρκεια μόνο της διακοσμιτίνης δεν τα επηρέασε σημαντικά. Σαν συμπέρασμα βγαίνει ότι η διγλυκάνη και η διακοσμιτίνη, αν και έχουν ξεχωριστές λειτουργίες είναι δομικά

παρόμοιες και μπορούν να αντικαθιστούν η μία την απουσία της άλλης.

Ποντίκια με ανεπάρκεια ινομοδουλίνης έχουν ανώμαλες και λιγότερο άφθονες ίνες κολλαγόνου στην ουρά τους σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ποντίκια. Όταν συγκρίθηκαν με ποντίκια στα οποία υπήρχε απουσία της διακοσμιτίνης τότε παρατηρήθηκε διαφορετική κατανομή και έκφραση της ινομοδουλίνης στη ρύθμιση του σχηματισμού ινιδίων κολλαγόνου και της ασβεστοποίησης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Saamanen *et al*, 2001). Η λουμικάνη προσδέεται στις ίδιες θέσεις σύνδεσης για τις ίνες κολλαγόνου με αυτές της ινομοδουλίνης (Svensson *et al*, 2000). Έχει ενδιαφέρον ότι τα knock-out ποντίκια με διπλή έλλειψη λουμικάνης-ινομοδουλίνης είναι μικρότερα συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά αντίστοιχα (Chakravarti, 2002).

Εκτός του γνωστού τους ρόλου στη δομική οργάνωση του οστεοειδούς, οι SLRP έχουν και ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας των αυξητικών παραγόντων, όπως του TGF-β. Είναι γνωστό ότι μεγάλες ποσότητες του TGF-β εκκρίνονται στο οστεοειδές, δίνοντας του ένα σημαντικό ρόλο στην δημιουργία και τον ανασχηματισμό των οστών. Οι SLRP έχουν την ικανότητα να προσδέουν το TGF-β (Hildebrand *et al*, 1994) και έχει βρεθεί σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος ότι ο πρωτεϊνικός κορμός της διακοσμιτίνης προσδέει με υψηλή συγγένεια το TGF-β1 αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την ικανότητά του να συνδέεται με τους υποδοχείς του με αποτέλεσμα αύξηση της δραστηριότητά του (Takeuchi *et al*, 1994). Επίσης, έχει δειχθεί ότι η διακοσμιτίνη που προσδέεται στο κολλαγόνο αδρανοποιεί μερικώς το TGF-β1 διατηρώντας επιλεκτικά συγκεκριμένες λειτουργίες του (Hausser *et al*, 1994, Markmann *et al*, 2000). Η κύρια επίδραση της αυξημένης σηματοδότησης του TGF-β στα κύτταρα του στρώματος μυελού των οστών knock out με έλλειψη διακοσμιτίνης /διγλυκάνης ήταν η προαγωγή της απόπτωσης αντί του πολλαπλασιασμού αυτών των κυττάρων, και ως εκ τούτου μειωμένη σύνθεση της οστικής μάζας (Bi *et al*, 2005). Κατά συνέπεια, η διακοσμιτίνη και η διγλυκάνη φαίνεται να είναι απαραίτητες για τη διατήρηση του κατάλληλου αριθμού ώριμων οστεοβλαστών μέσω της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών. Εκτός από το TGF-β1 η διγλυκάνη μπορεί να ρυθμίζει τη δράση και άλλων αυξητικών παραγόντων και κιτοκινών όπως του TGF-α (Hayashi Y, 2005), του TNF (Tufvesson *et al*, 2002) και του EGF (Kinsella *et al*, 2004). Επιπλέον, η διακοσμιτίνη μπορεί να αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς του EGFR ενεργοποιώντας και αυξάνοντας την φωσφορυλίωσή τους (Santra *et al*, 1997).

1.6.2 Υαλεκτάνες και οστεοσάρκωμα

Στα οστά εντοπίζονται οι μεγάλου μοριακού μεγέθους PGs που φέρουν γαλακτοζαμινογλυκάνες (CS και DS), όπως είναι η αγγρική και η βερσική (Kjellen, & Lindahl, 1991). Η έκφραση της αγγρικής είναι συνήθως περιορισμένη στο οστεοσάρκωμα. Οι παθολογικές καταστάσεις που δημιουργούνται από την υπερέκφραση του μεταφραστικού παράγοντα σκλήρυνσης οδηγούν στην αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της αγγρικής στα ROS17/2.8 κύτταρα του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος (Liu *et al*, 1997). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η βερσική ρυθμίζει την προσκόλληση των κυττάρων ανθρώπινου οστεοσαρκώματος (Yamagata & Kimata, 1994).

1.6.3 Πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαράνης και οστεοσάρκωμα

Ανοσολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι πρωτεογλυκάνες της θειϊκής ηπαράνης (HSPGs), είτε συνδεδεμένες στη κυτταρική μεμβράνη είτε ευρισκόμενες στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, εκφράζονται και στα οστά (Nakamura & Ozawa, 1994). Επιπρόσθετα, οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι οι HSPGs έχουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ινοβλαστών και των οστεοκλαστών διότι δεσμεύουν αυξητικούς παράγοντες και πρωτεΐνες, όπως η ινονεκτίνη, οι οποίες συμμετέχουν στη προσκόλληση των κυττάρων αυτών (Nakamura & Ozawa, 1994).

Οι HSPGs εκφράζονται στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος και φαίνεται να εμπλέκονται στην ανάπτυξή τους. Η οικογένεια των συνδεκανών έχει βρεθεί ότι στηρίζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος, καθώς η ρύθμιση της έκφρασης των συνδεκανών σ' αυτά τα κύτταρα διαφέρει συγκρινόμενη με την ρύθμιση της έκφρασής τους στους φυσιολογικούς οστεοβλάστες (Birch & Skerry, 1999). Η συνδεκάνη-2 μέσω του κυτταροπλασματικού της τμήματος ρυθμίζει την ανάπτυξη των φυσιολογικών ανθρώπινων οστεοβλαστών διότι εμποδίζει την απόπτωση τους μέσω JNK/Bax αποπτικού μονοπατιού (Modrowski *et al*, 2000, 2005) κάτι που απουσιάζει από τα κύτταρα του οστεοσαρκώματος. Οι HSPGs που απομονώθηκαν από τα UMR 106-01 κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος βρέθηκαν να είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες στη κυτταρική μεμβράνη με μια GPI δομή, γεγονός που δείχνει τη παρουσία των γλυπικανών στο οστεοσάρκωμα (McQuillan *et al*, 1992).

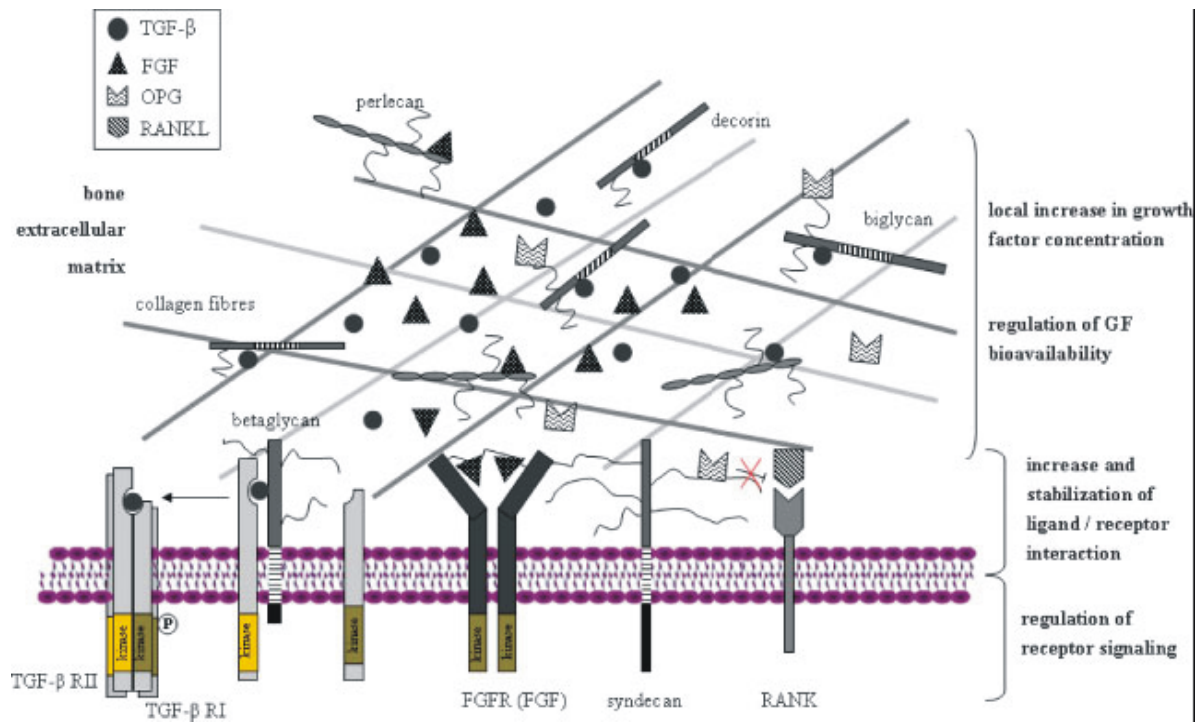
1.7. Αυξητικοί παράγοντες και καρκίνος των οστών

Τα τελευταία δεκαπέντε χρόνια έχει συσσωρευτεί αρκετή πληροφόρηση για τον ρόλο των εξωκυττάρων παραγόντων στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των

κυττάρων. Οι περισσότεροι υποδοχείς για τους αυξητικούς παράγοντες (GFs) είναι είτε μια επιφανειακή κυτταρική μεμβρανική πρωτεΐνη που περιέχει μια κυτταροπλασματική κινάση της τυροσίνης, είτε μια επιφανειακή πρωτεΐνη που συνδέεται με μια κυτταροπλασματική κινάση της τυροσίνης. Έτσι, η συνδυασμένη αντίδραση μεταξύ των διαφόρων GFs και των υποδοχέων έχει σαν αποτέλεσμα την μεταφορά πολλαπλών μηνυμάτων στον πυρήνα των κυττάρων που οδηγεί στην έναρξη της γονιδιακής μεταγραφής, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση (Schlessinger & Ullrich, 1992; Kishimoto *et al*, 1994; Tayler *et al*, 1995; Karin & Hunter, 1995). Έχει αναφερθεί σε μελέτες *in vitro* και *in vivo* ότι οι GFs παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανακατασκευή του οστού. Επιπρόσθετα, σε απάντηση στους GFs οι οστεοβλάστες συνθέτουν παράγοντες που μπορεί να είναι αυτοκρινείς/παρακρινείς ρυθμιστές του μεταβολισμού και της δραστηριότητας των οστεοβλαστών (Rodan & Noda, 1991) (Σχήμα 5).

Έχει βρεθεί ότι οι GFs όπως ο αυξητικός παράγον του μετασχηματισμού (TGF-β), ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (bFGF) και ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF) προάγουν την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος. Ο bFGF και ο PDGF έχουν ισχυρή μιτογονική δράση σε κύτταρα οστικής προέλευσης, ενώ ο ρόλος του TGF-β φαίνεται να είναι περισσότερο σύνθετος (Robken *et al*, 1987; Gebken *et al*, 1999).

Η οικογένεια του TGF-β αποτελείται από τις ισομορφές του TGF-β (1,2 και 3), τις ακτιβίνες (Activins), τις νόνταλς (Nodals), τις μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (BMPs), το παράγοντα ανάπτυξης και διαφοροποίησης (GDF) και τον ανασταλτικό παράγοντα του Mullerian. Η ενεργή μορφή του TGF-β είναι ένα διμερές 25 kDa, το οποίο αποτελείται από δύο πολυπεπίδια που ενώνονται μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και μιας διθειϊκής ένωσης. Εκκρίνεται σε μή ενεργή μορφή (TGF-β-LAP) και ενεργοποιείται με την δράση των πρωτεασών (Munger *et al*, 1997). Μετά τη ενεργοποίησή του, ο TGF-β



Σχήμα:5. Πρωτεογλυκάνες ως ρυθμιστές της δραστηριότητας των αυξητικών παραγόντων στα οστά (Πηγή: Mintz, 2006) .

προκαλεί τη σηματοδότηση, μέσω αλληλεπίδρασης και ένωσης του, με τους δύο αντίστοιχους υποδοχείς της κινάσης της σερίνης / θρεονίνης, που αναφέρονται σαν υποδοχείς τύπου I και II. Ο υποδοχέας II φωσφορυλιώνει τον τύπου I υποδοχέα που επάγει την ενεργοποίηση της κινάσης (Massague, 2005). Υπάρχουν και αναπληρωματικοί υποδοχείς για το TGF-β, στους οποίους περιλαμβάνεται ο τύπος III (TβR-III) υποδοχέας που ονομάζεται και μεταγλυκάνη (Σχήμα 5). Η μεταγλυκάνη είναι μια πρωτεογλυκάνη που λειτουργεί σαν συνυποδοχέας παρουσιάζοντας τους προσδέτες στο υποδοχέα τύπου II (Blobe *et al.* 2002). Ο κύριος μηχανισμός μετατροπής του σήματος του TGF-β πραγματοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Smad από τον υποδοχέα τύπου I. Οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες Smad συγκεντρώνονται στον πυρήνα, όπου συνεργάζονται με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων (Massague *et al.*, 2005). Είναι γνωστό ότι οι ισομορφές του TGF-β ενεργοποιούν τα Smad 1 και 2.

Ο TGF-β, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και την προέλευση του σήματος, μπορεί να προκαλεί διέγερση ή αναστολή στις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την διαφοροποίηση (Siegel & Massague, 2003). Είναι ενδιαφέρον ότι ο TGF-β επάγει όλες αυτές τις επιδράσεις μέσω των υποδοχέων του και των Smad πρωτεϊνών.

Ο TGF- β είναι άφθονος στο οστίτη ιστό (Seyedin *et al*, 198) και διεγείρει το σχηματισμό νέου οστού *in vivo* μετά από τοπική ή συστηματική χορήγηση (Critchlow *et al*, 1994; Noda & Camilliere, 1989). Υψηλού βαθμού κακοηθείας οστεοσαρκώματα εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα TGF- β συγκρινόμενα με εκείνα του χαμηλού βαθμού κακοηθείας, θέτοντας την πιθανότητα ο TGF- β να εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των όγκων των οστών (Franchi *et al*, 1989). Ενδιαφέρουσα είναι η πρόσφατη παρατήρηση που έγινε σε διάφορα πειραματικά μοντέλα κυτταρικών σειρών οστεοσαρκώματος, ότι η δράση του TGF- β πραγματοποιείται μέσω της αυξημένης βιοσύνθεσης της διγλυκάνης η οποία αναστέλλονταν από τη παρουσία μιας άλλης μικρής πρωτεογλυκάνης της διακοσμιτίνης (Hausser *et al*, 1994).

Τα ανθρώπινα κύτταρα των οστών εκφράζουν το βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (bFGF) και αποκρίνονται σε αυτόν (Wergedal *et al*, 1990). Ο bFGF εισάγει τη σηματοδότηση μέσω των αλληλεπιδράσεων με τους αντίστοιχους υποδοχείς της κινάσης της τυροσίνης, που αναφέρονται σαν υποδοχείς FGFR1, 2, 3 και 4 (Σχήμα 5). Η πρόσδεσή του στους αντίστοιχους υποδοχείς διευκολύνεται κυρίως από την παρουσία των αλυσίδων HS. Έχει αναφερθεί, ότι ο bFGF ενεργοποιεί την μεταγραφή του ανθρώπινου γονιδίου της οστεοκαλσίνης (σε ROS 17/2.8 κύτταρα) υποδηλώνοντας ότι μπορεί να διεγείρει την διαφοροποίηση των ανθρώπινων οστικών κυττάρων (Shedlich *et al*, 1994). Αντίθετα, σε οστεοβλάστες αρουραίων προκαλεί ελάττωση της οστεοκαλσίνης και αναστολή της διαφοροποίησής τους (Rodan *et al*, 1989). Επίσης, σε πειραματικές μελέτες οστεοπρογονικών κυττάρων αρουραίων έχει αναφερθεί ότι η τοπική παρουσία bFGF μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανακατασκευής των οστών, και η συνδυασμένη δράση του με άλλους αυξητικούς παράγοντες (PDGF, IGF-I) αυξάνει την επίδρασή του στο μεταβολισμό των οστικών κυττάρων (Tanaka *et al*, 1999). Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ο σημαντικός ρόλος του ενδογενώς παραγόμενου bFGF στη ρύθμιση διαφορετικών φαινότυπων του οστεοσρακώματος (Bodo *et al.*, 2002).

Η σηματοδότηση του PDGF-BB πραγματοποιείται μέσω των υποδοχέων του, PDGFR α και PDGFR β , ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια όπως είναι τα Src, φωσφατιδυλνινοσιτόλ 3 κινάση (P3K), φωσφολιπάση C γ (PLC γ) και Ras (Li & Erikson, 2003; Tallquist & Kazlauskas, 2004). Οι αντίστοιχοι υποδοχείς του είναι οι κινάσες της τυροσίνης. Ο PDGF είναι ένα ισχυρό μιτογόνο για τα κύτταρα του μεσεγχυματικού ιστού. Επιπλέον, οι ισομορφές του PDGF παίζουν σημαντικό ρόλο στον αυτοκρινή πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, στην ανάπτυξη της αγγειογένεσης και στη ρύθμιση της ανάπτυξης των μετασχηματισμένων ινοβλαστών (Board & Jayson, 2005). Μελέτες σε κυτταρική

σειρά ανθρώπινου οστεοσαρκώματος έδειξαν ότι η χορήγηση του PDGF προκάλεσε διέγερση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ενώ η συνδυασμένη χορήγησή του με TGF-β την αναστολή της ανάπτυξής τους (Hung *et al*, 1997).

1.8 Γενιστεΐνη (genistein) ως ειδικός αναστολέας της κινάσης της τυροσίνης

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι άνθρωποι από την Ανατολή έχουν μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη σε σχέση με τους ανθρώπους της Δύσης (Tomimaga, 1985). Εισηγούνται ότι η αυξημένη κατανάλωση σόγιας σχετίζεται με την ελαττωμένη συχνότητα ανάπτυξης αυτών των καρκίνων στον άνθρωπο. Ένα από τα κύρια συστατικά της σόγιας είναι το ισοφλαβονοειδές γενιστεΐνη, ένα διφαινολικό μόριο με αρωματικό Α-δακτύλιο. Έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί για τα αντικαρκινικά της αποτελέσματα όπως η αναστολή της τοποϊσομεράσης II, η επαγωγή της διαφοροποίησης, η αναστολή της δραστηριότητας της πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης και η αναστολή της αγγειογένεσης (Peterson, 1995; Fotsis *et al*, 1993; Murrill *et al*, 1996; Zava & Duwe, 1997). Η γενιστεΐνη αναφέρεται επίσης και ως φυτοοιστρογόνο, και σαν τέτοιο εξετάζεται τελευταία η επίδραση που έχει στα οστά. Τελευταίες μελέτες εστιάζονται στην ανάπτυξη οιστρογονικών σκευασμάτων που να δρουν εκλεκτικά στο μεταβολισμό των οστών χωρίς να έχουν οιστρογονική δράση στη μήτρα (Ishimi *et al*, 1999). Έχει αναφερθεί ότι δίαιτα πλούσια σε πρωτεΐνες σόγιας ανέστειλε την απώλεια οστού σε αρουραίους που είχαν υποστεί ωοθηκεκτομή (Arjmandi *et al*, 1996). Η δράση της γενιστεΐνης σαν αναστολέας της κινάσης της τυροσίνης έχει αναδειχθεί σε πολλές πειραματικές μελέτες. Είναι γνωστό ότι η γενιστεΐνη επηρεάζει τόσο το κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και τη σύνθεση των GAGs / PGs στις κυτταρικές σειρές ανθρώπινου μεσοθηλιώματος και καρκίνου του μαστού (Tzanakakis *et al*, 1997; Mítropoulou *et al*, 2002). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι η γενιστεΐνη αναστέλλει την ανάπτυξη των MG-63 κυττάρων του οστεοσαρκώματος, καθώς και τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών που προκαλείται από συγκεκριμένους αυξητικούς παράγοντες (Sandy *et al*, 1998).

Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ότι σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινων οστεοβλαστών (Hobs) και οστεοσαρκώματος (MG-63), η γενιστεΐνη ανέστειλε τη δράση του IGF-II και του PDGF στα Hobs, ενώ ανέστειλε τη δράση μόνο του PDGF στα MG-63 κύτταρα. (Sandy *et al*, 1998).

Σκοπός

Ο μετασχηματισμός των φυσιολογικών κυττάρων προς καρκινικά συνοδεύεται από μεταβολή των αλληλεπιδράσεων των κυττάρων του όγκου με τον εξωκυττάριο χώρο. Οι πρωτεογλυκάνες είναι μια από τις κύριες τάξεις μακρομορίων της κυτταρικής μεμβράνης και του εξωκυττάριου χώρου που ρυθμίζουν αυτές τις αλληλεπιδράσεις είτε μέσω των υδατανθρακικών τους αλυσίδων είτε μέσω του πρωτεϊνικού τους κορμού.

Το προτεινόμενο ερευνητικό έργο στοχεύει στην: i) λεπτομερή δομική ανάλυση των υδατανθράκων που παράγουν οι κυτταρικές σειρές του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος με σύγχρονες αναλυτικές μεθόδους υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας (HPLC και HPCE), ii) μελέτη της έκφρασης των πρωτεογλυκανών της κυτταρικής μεμβράνης και του εξωκυττάριου χώρου σε επίπεδο mRNA με τη μοριακή τεχνική Real time-PCR και σε επίπεδο πρωτεϊνών με τη ανάλυση κατά Western, iii) μελέτη της δράσης των αυξητικών παραγόντων και της κινάσης της τυροσίνης στην έκφραση των πρωτεογλυκανών / γλυκοζαμινογλυκανών, και iv) μελέτη των πυθανών βιολογικών ρολών των πρωτεογλυκανών / γλυκοζαμινογλυκανών σε οστεοσάρκωμα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής σαν στόχο έχουν να συμβάλλουν στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του οστεοσαρκώματος, ενός εκ των σημαντικότερων καρκίνων των οστών του ανθρώπου, την δημιουργία πιθανών δεικτών για την έγκαιρη και ασφαλή διάγνωση της νόσου, καθώς και του προσδιορισμού της βιολογικής τους συμπεριφοράς.

Υλικά & μέθοδοι

1.1 Κυτταρικές καλλιέργειες

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος, η MG-63 (ATCC No.:CRL-1427) (Rasheed *et al.*, 1974) και η Saos 2 (Thurzo *et al.*, 1976), καθώς και φυσιολογικές ανθρώπινες οστεοβλάστες του περιοδοντικού συνδέσμου (hPDL). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στους 37°C και σε ατμόσφαιρα CO₂ 5% (v/v) σε ειδικές φλάσκες καλλιέργειας ή τριβλία με την κατάλληλη επίστρωση. Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό DMEM παρουσία 10% (v/v) FBS, γλουταμίνης (4 mM), 2 gL⁻¹ (Na₂-δυκαρμπονάτης bicarbonate) (2 g/L), (Na₂ -πυρουβάτης pyruvate) (1% w/v), πενικιλίνης (100 units/ml) και στρεπτομυκίνης (100 μg/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 σε PBS 0.1% (w/v)]Na₂EDTA για 5 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν φυγοκέντρηση των κυττάρων για 10 λεπτά στα 1500 rpm, επαναδιάλυσή τους σε 1 ml θρεπτικού και με την κατάλληλη αραίωση, καλλιέργειά τους σε νέες φλάσκες.

1.2 Μελέτη της δράσης των PDGF-BB, bFGF και TGF-B2 αυξητικών παραγόντων

Για την μελέτη της δράσης των αυξητικών παραγόντων PDGF-BB, bFGF και TGF-B2 οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν παρουσία 10% FBS για 24 ώρες και στη συνέχεια σε θρεπτικό απουσία FBS για 24 ώρες πριν πραγματοποιηθεί η χορήγηση των αυξητικών παραγόντων. Μετά τη χορήγηση των αυξητικών παραγόντων PDGF-BB, bFGF και TGF-B2 (10 ng / ml) τα κύτταρα επωάζονταν σε θρεπτικό χωρίς FBS για 24 ώρες για τη μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων και για 48 ώρες για τη μελέτη των πρωτεϊνών και των γλυκοζαμινογλυκάνων .

1.3 Απομόνωση /Εκχύλιση RNA από τα κύτταρα

Σε όλες τις κυτταρικές σειρές η εκχύλιση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο Trizol (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν παρουσία του Trizol και η εκχύλιση του RNA έγινε με τη βοήθεια χλωροφορμίου. Το RNA των κυττάρων κατακρημνίστηκε με τη χρήση ισοπροπανόλης, στη συνέχεια καθαρίστηκε με απόλυτη αιθανόλη (100%) και τέλος

έγινε επαναδιάλυσή του σε 30 µl DEPC νερό.

1.4 Φωτομέτρηση του συνολικού RNA των κυττάρων

Η καθαρότητα και η ποσότητα του συνολικού RNA προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της φωτομέτρησης. Κάθε δείγμα φωτομετρήθηκε στα 260 και 280 nm. Από την απορρόφηση των δειγμάτων στα 260 nm, προσδιορίζεται η ποσότητα του RNA, ενώ ο λόγος των 260/280 nm καθορίζει την καθαρότητά του. Λόγοι από 1.8 έως 2.0 χρησιμοποιήθηκαν για την αντίστροφη μεταγραφή. Το RNA αποθηκεύτηκε στους -80°C.

1.5 Αντίστροφη Μεταγραφή

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

1.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real- Time PCR)

Η μέθοδος της Real- Time PCR χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του mRNA των γονιδίων που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Η ανίχνευση των προϊόντων της Real- Time PCR έγινε με τη χρήση της SYBR Green σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Αρχικά έγινε προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών της Real- Time PCR, όπως η συγκέντρωση των εκκινητών και η θερμοκρασία πρόσδεσής τους στο cDNA, όπου είναι οι παρακάτω: 1x SYBR Green Master Mix, 300 nM εκκινητές (primers) και 100 ng cDNA σε τελικό όγκο 20 µl. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο Mx3000 Real Time Thermal Cycler (Stratagene) με το παρακάτω πρόγραμμα: αρχική θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C για 10 λεπτά για την αποδιάταξη των δειγμάτων και την ενεργοποίηση της πολυμεράσης, 35 κύκλοι με θέρμανση στο 95°C για 30 δευτερόλεπτα, θερμοκρασία αναδιάταξης των εκκινητών (annealing

temperature) 55°C για 30 δευτερόλεπτα και πολυμερισμός (extension) των προϊόντων της PCR αντίδρασης στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα. Έπειτα, προσδιορίστηκε η καμπύλη αποδιάταξης (melting curve), όπου τα δείγματα υποβλήθηκαν σε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από τους 55°C έως τους 95°C. Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της GAPDH. Η ποσοτικοποίηση των γονιδίων στόχων και της GAPDH πραγματοποιήθηκε με καμπύλη έκφρασης (αντίγραφα/Ct). Στη συνέχεια, τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν με βάση τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς GAPDH και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους.

1.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

Τα δείγματα των πρωτεϊνών ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 8%. Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου αποτελείται από το πήκτωμα επιστοίβαξης των πρωτεϊνών (stacking gel) που εξασφαλίζει την ομοιόμορφη εισαγωγή των δειγμάτων στο δεύτερο τμήμα, το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). 25 µg συνολικής πρωτεΐνης από κάθε δείγμα αναμείχθηκε με ειδικό διάλυμα αποδιάταξης και μετά από 10 λεπτά βρασμού το μείγμα φορτώθηκε στο πήκτωμα ακρυλαμιδίου και ηλεκτροφορήθηκε στα 200 V για 1-2 ώρες (ανάλογα το μοριακό μέγεθος της υπό μελέτη πρωτεΐνης).

1.8 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα ακρυλαμιδίου σε μεμβράνη τύπου PVDF με τη βοήθεια ειδικής συσκευής ηλεκτροφόρησης και κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για 1,5-2 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 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C για 16-20 ώρες. Έπειτα, ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης για μισή ώρα με PBS/Tween (10 λεπτά η καθεμιά). Κατόπιν, προστίθεται διάλυμα ειδικής αραίωσης του πρώτου αντισώματος σε διάλυμα PBS/Tween που περιέχει 1% γάλα και επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρεις πλύσεις των 10 λεπτών και στη συνέχεια η 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, 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 με έναν ψηφιακό σαρωτή. 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.

1.9 Η ανάλυση των γλυκοζαμινογλυκανών

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες απομακρύνθηκαν από τον πρωτεϊνικό κορμό με χημικές μεθόδους (αλκαλική υδρόλυση) ή με τη χρήση ειδικών ένζυμων τα οποία τις αποικοδομούν. Οι δισακχαρίτικες μονάδες ταυτοποιήθηκαν με αναλυτικές τεχνικές υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και ευαισθησίας, τη υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης (HPLC) και η ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές (HPCE ή CE) (Karamanos, 1995, 1995a, 1996, 1997)

1.10 A) Μέτρηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με ενσωμάτωση [³H]-θυμιδίνης ([³H]-TdR)

Η μέτρηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης στο γενετικό υλικό των κυττάρων κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού. Φυσιολογικοί οστεοβλάστες και MG-63 ή Saos 2 κύτταρα οστεοσαρκώματος (20×10^3) καλλιεργήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 24 θέσεων παρουσία 10% FBS για 24 ώρες και στη συνέχεια σε θρεπτικό απουσία ορού για 24 ώρες πριν τη χορήγηση των παραγόντων. Μετά τη χορήγηση των παραγόντων τα κύτταρα επώαστηκαν σε θρεπτικό χωρίς FBS για 48 ώρες. 16 ώρες πριν τη μέτρηση γινόταν η προσθήκη ραδιενεργής θυμιδίνης σε συγκέντρωση 2 $\mu\text{C}/\text{ml}$. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε β-μετρητή ραδιενέργειας (LS-beta counter-Beckman, USA) ως κρούσεις ανά λεπτό (counts per min-CPM) παρουσία σπινθυριστικού διαλύματος (scintillation buffer).

1.11 B) Μέτρηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη μέθοδο CyQUANT

Η μέτρηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων στα κεφάλαια ()

πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο CyQUANT cell proliferation Assay Kit (Molecular Probes) σύμφωνα με τις οδηγίες του καστευαστή. MG-63 ή Saos 2 κύτταρα οστεοσαρκώματος καλλιεργήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 96 θέσεων παρουσία 10% FBS για 24 ώρες και στη συνέχεια σε θρεπτικό απουσία ορού για 24ώρες πριν τη χορήγηση των παραγόντων. Μετά τη χορήγηση των παραγόντων τα κύτταρα επώαστηκαν σε θρεπτικό χωρίς FBS για 48 ώρες μαζί με τους αυξητικούς παράγοντες. Στη συνέχεια ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων μετρήθηκε σε φλορόμετρο.

1.12 Τροποποίηση γενετικού υλικού με την εισαγωγή γενετικού τμήματος μέσω siRNA (Transfection)

Τα MG-63 και Saos 2 κύτταρα τροποποιήθηκαν γενετικά με την εισαγωγή του ειδικού siRNA (Invitrogen) για την καταστολή έκφρασης των γονιδίων της λουμικάνης και της διακοσμιτίνης, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, siRNA (100 pmol / 50 μl θρεπτικού) και η LipofectamineTM 2000 (Invitrogen) (1 μl/ 50 μl θρεπτικού) διαλύθηκαν σε OptiMEM I (Invitrogen) θρεπτικό καλλιέργειας και τοποθέτησαν σε πιάτα καλλιέργειας 24 θέσεων. Στη συνέχεια τοποθέτησαν σε οπές και τα MG-63 και Saos 2 κύτταρα (8×10^4) που προηγουμένως είχαν διαλύθει σε θρεπτικό χωρίς FBS και αντιβιοτικά. Μετά από 6 ώρες επώασης αφαιρέθηκε το θρεπτικό με siRNA και έγινε προσθήκη φρέσκου DMEM με FBS (10%) και αντιβιοτικά. Η έκφραση των γονιδίων της λουμικάνης και της διακοσμιτίνης μετρήθηκε σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (12, 24 και 48 ώρες) με τη μέθοδο Real- Time PCR.

1.13 Δοκιμή Ινώδους Ουλής (Wound Healing Assay)

Η ικανότητα των κυττάρων να κινούνται μετρήθηκε με την δοκιμή της ινώδους ουλής. Σε πιάτα καλλιέργειας 24 θέσεων έγινε εισαγωγή του siRNA ειδικού για το γονίδιο της λουμικάνης ή της διακοσμιτίνης όπως και το siRNA ελέγχου (siRNA scramble), στα MG-63 και Saos 2 κύτταρα (2×10^5), σε διάρκεια 6 ωρών. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το θρεπτικό με το siRNA, προστεθήκε φρέσκο DMEM με FBS (10%) και αντιβιοτικά και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε DMEM απουσία ορού για 24 ώρες. Έπειτα, αφαιρέθηκαν κύτταρα με ένα ρύγχος των 10μl κατά μήκος της επιφάνειας καλλιέργειας. Η κυτταρική κινητικότητα μετρήθηκε αναλύοντας την εικόνα σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα με τη βοήθεια του προγράμματος Jimage.

1.14 Δοκιμή κυτταρικής μετανάστευσης – χημειοταξίας

Μετρήθηκε η χημειοταξία των κυττάρων. Τα αμφότερα, MG-63 και Saos 2 κύτταρα οστεοσαρκώματος (5×10^4) γενετικά τροποποιημένα ή όχι, τοποθετήθηκαν στο πάνω μέρος της μεμβράνης ενός πιάτου καλλιέργειας με 96 οπές, (Chemicon QCMTM, ECM508) ενώ στο κάτω μέρος χρησιμοποιήθηκε ινονεκτίνη (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) σαν χημοτακτική ουσία.

Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα του οστεοσαρκώματος, που πέρασαν από την ημιδιαπερατή μεμβράνη μετρήθηκαν σε φλορόμετρο, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

1.15 Στατιστική Ανάλυση

Τα στατιστικά τεστ που χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων ήταν τα ANOVA, Chi-square και Student's T. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο $p < 0.05$.

1.16 Η ανάλυση των σιαλικών οξέων

Με οξύ υδρόλυση των εκκρινόμενων και κυτταρικά προσκολλημένων πρωτεϊνών απελευθερώνονται τα σιαλικά οξέα τα οποία στη συνέχεια αναλύονται με υψηλής ακριβείας και ευαισθησίας HPLC μέθοδο (Karamanos *et al.*, 1990).

1.17 Διαλύματα

- Φαινολικό διάλυμα απομόνωσης RNA και πρωτεϊνών TRIzol (Invitrogen)
- Ισοπροπανόλη 100% (Merck)
- Αιθανόλη 100% (Merck)
- Δις-απιονισμένο νερό με DEPC (Invitrogen)
- Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού πρωτεϊνών (separating buffer): 1.5M Tris.HCl, 4% SDS (w/v), pH 8.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα πυκτώματος επιστοιβαξης πρωτεϊνών (stacking buffer): 1M Tris.HCl, 1.6% SDS (w/v), pH 6.8
- Διάλυμα φόρτωσης-ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών: 0,25mM Tris base, 1% SDS (w/v), pH 8.3

- Διάλυμα αποδιάταξης πρωτεϊνών (RIPA): Tris/HCL 50 mM, EDTA 0.5 M, Triton X-100 1%, NaCl 0.1%, and protease/phosphatase inhibitors (PMSF 1 mM, NEM 5 mM, benzamidin 5 mM, sodium cholate 1%, orthovanadate 1 mM)
- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών: 10 mM CAPS, pH 11, containing 10% methanol
- Διάλυμα έκπλυσης μεμβρανών: PBS, Tween 1% (v/v)
- Διάλυμα χημειοφωταγούς ανίχνευσης πρωτεϊνών (ECL): ChemiLucent Western Blot Detection System (Pierce)

1.18 Αντισώματα

Πρώτα Αντισώματα	Εταιρία	Αραιώσεις
anti-p21WAF-1	Cell signaling	1:200
goat anti-Lumican	SantaCruz Biotechnology	1:800
goat anti-Smad 2	SantaCruz Biotechnology	1:200
goat anti-Actin	Cell signalling	1:200
anti-phospho Smad 2 (Ser465/467)	SantaCruz Biotechnology	1:1000
monoclonal anti-KS (clone 5D4)	Seigakaku	1:1000
Monoclonal anti-decorin	Seigakaku	1:200

Δεύτερα Αντισώματα	Εταιρία	Αραιώσεις
anti-goat antibody	Santa Cruz Biotechnology	1:4000
anti-mouse	Santa Cruz Biotechnology	1:2000
anti-rabbit	Santa Cruz Biotechnology	1:2000

1.19 Εκκινητές

Versican V0_F 5' GAC CTC AGG CGC TTT C 3'

Versican V0_R 5' CAG TGG TAA CGA GAT GCT TC 3'

Versican V1_F 5' GCG CCA CCC TGT GAC 3'

Versican V1_R 5' CAG TGG TAA CGA GAT GCT TC 3'

Versican V2_F 5' GAC CTC AGG CGC TTT C 3'

Versican V2_R 5' TAG CAC TGC CCT TGG A 3'

Versican V3_F 5' TGA GAA CCC TGT ATC GTT TTG AGA 3'

Versican V3_R 5' CGT TAA GGC ACG GGT TCA TT 3'

HA Synthase_1_F 5' TGT GTA TCC TGC ATC AGC GGT 3'

HA Synthase_1_R 5' CTG GAG GTG TAC TTG GTA GCA TAA CC 3'

HA Synthase_2_F 5' GTG TTA TAC ATG TCG AGT TTA CTT CC 3'

HA Synthase_2_R 5' GTC ATA TTG TTG TCC CTT CTT CCG C 3'

HA Synthase_3_F 5' GGT ACC ATC AGA AGT TCC TAG GCA GC 3'

HA Synthase_3_R 5' GAG GAG AAT GTT CCA GAT GCG 3'

GAPDH_F 5' GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA 3'

GAPDH_R 5' GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CAC T 3'

Lumican_F 5' CTTCAATCAGATAGCCAGACTGC 3'

Lumican_R 5' AGCCAGTTCGTTGTGAGATAAAC 3'

p21_F 5' TGGAGACTCTCAGGTCGAAA 3'

p21_R 5' AAGATCAGCCGGCGTTTG 3'

Αποτελέσματα

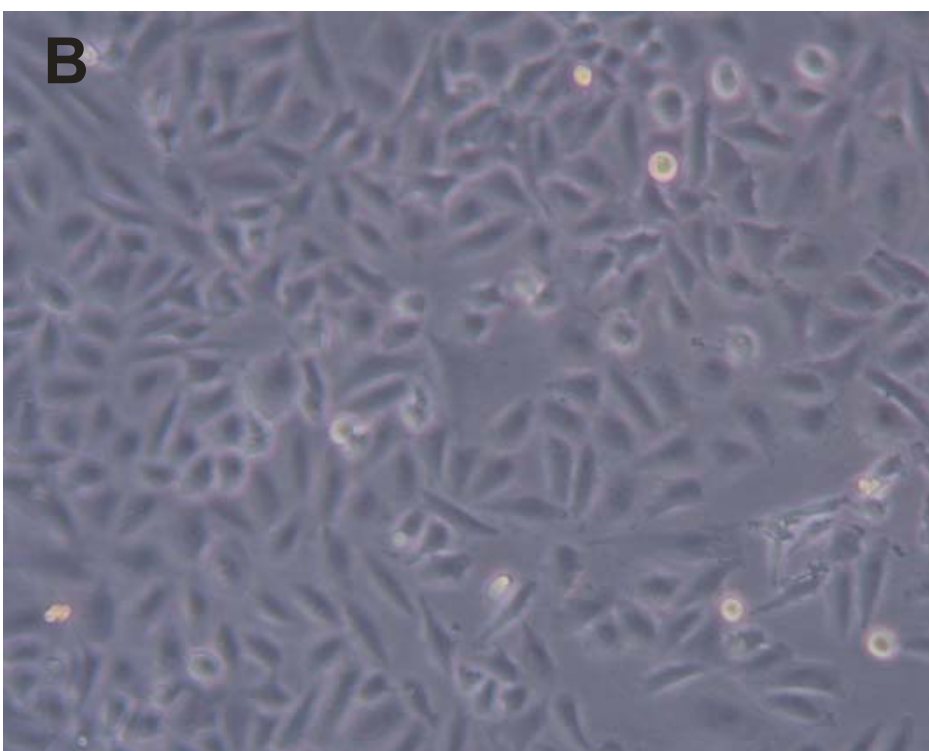
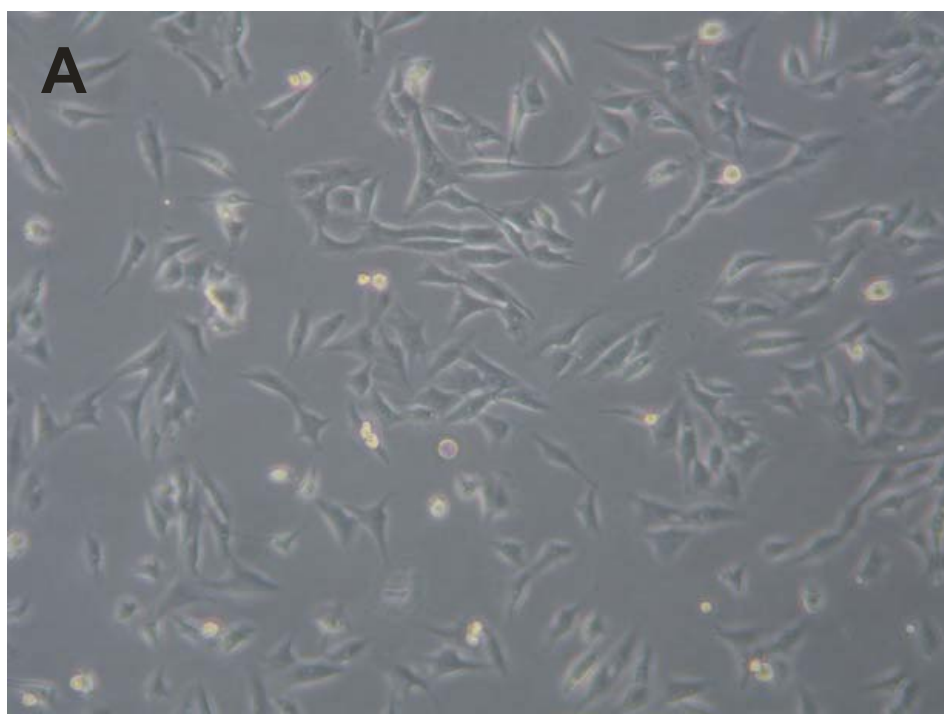
1.0 Μελέτη της σύνθεσης και της κατανομής των γλυκοζαμινογλυκανών/ πρωτεογλυκανών GAGs/PGs στις δύο κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος

1.1 Στοχός

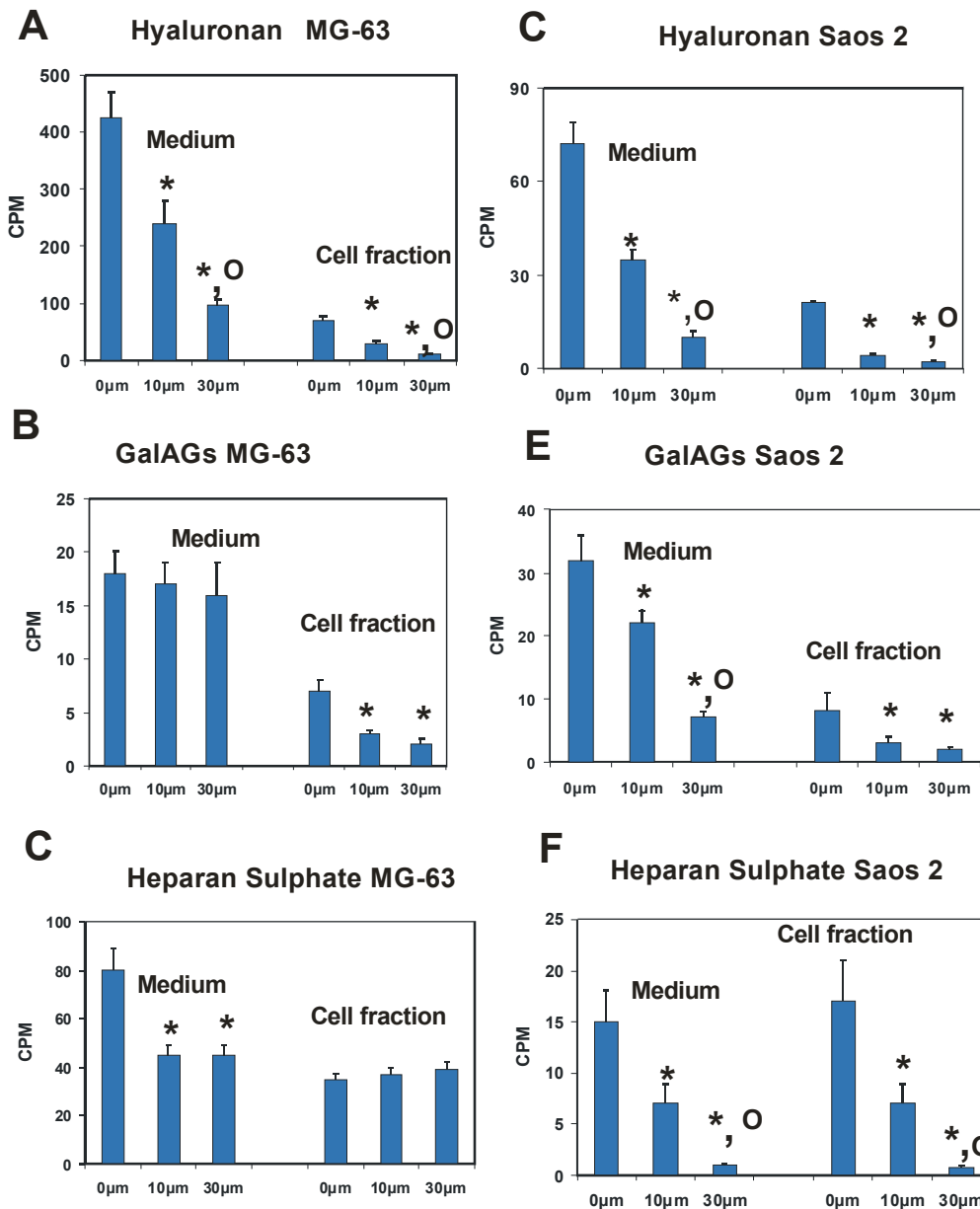
Αντικείμενο της πρώτης φάσης της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση με υψηλό βαθμό καθαρότητας, η λεπτομερής δομική ανάλυση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των GAGs σε δύο κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος MG-63 και Saos 2 σε συνθήκες καλλιέργειας. Επιπρόσθετα μελετήσαμε αν η σύνθεση και η κατανομή των GAGs / PGs μεταξύ του υλικού καλλιέργειας και της κυτταρικής μεμβράνης επηρεάζεται από τη γενιστεΐνη, ένα ειδικό αναστολέα της τυροσίνης της κίνησης.

1.2 Μελέτη της σύνθεσης και της κατανομής των GAGs / PGs

Οι δύο κυτταρικές σειρές MG-63 και Saos 2 του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος που μελετήσαμε διαφέρουν στην διαφοροποίησή τους, η μια είναι μέτρια και η άλλη καλά διαφοροποιημένη (Heremans *et al.*, 1978; & Trampe, 1975) (Σχήμα 1.1). Αρχικά ερευνήσαμε την σύνθεση και τη κατανομή των GAGs τόσο στο υλικό καλλιέργειας όσο και στην κυτταρική μεμβράνη αυτών των κυτταρικών σειρών. Οι βιοχημικές αναλύσεις των μεταβολικά σεσημασμένων γλυκοζαμινογλυκανών (metabolically labeled GAGs) έδειξαν ότι αμφότερες οι κυτταρικές σειρές συνθέτουν εξωκυττάρια εκκρινόμενο υαλουρονικό οξύ (HA), καθώς και εκκρινόμενες και κυτταρικά προσκολλημένες γαλακτοζαμινογλυκάνες (GalAGs) και θειϊκή ηπαράνη (HS) (Σχήμα, 1.1A έως F). Όπως παρουσιάζονται στο (Σχήμα, 1.1A έως F), το HA είναι η κύρια εκκρινόμενη GAG, ενώ οι GalAGs και το HS εντοπίστηκαν στο υλικό καλλιέργειας και στην κυτταρική μεμβράνη. Οι GalAGs είναι τα κύρια εκκρινόμενα προϊόντα σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές MG-63 και Saos 2 (80% και 75%, αντίστοιχα).



Σχήμα: 1.1. MG-63 (A) και Saos 2 (B) κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος που καλλιεργήθηκαν σε DMEM υλικό καλλιέργειας, που περιείχε 10% FCS.



Σχήμα: 1.2. Σύνθεση εκκρινόμενων και μεμβρανικά προσκολλημένων HA, GalAGs, HS από τα MG-63 (A, B, C) και Saos 2 (E,F G) κύτταρα και επίδραση της γενιστεΐνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως [³H]- επισημασμένη ραδιενέργεια ενσωματωμένη με τη μορφή της [³H]- γλυκοζαμίνης στα HA και HS, και ως [³H]- γαλακτοζαμίνη στα GalAGs. (Means +/- SEM plotted; n=9). Στατιστικά σημαντικό: (*) p<0.01 μεταξύ κυττάρων που έγινε χορήγηση της γενιστεΐνης και των κυττάρων ελέγχου και (°) μεταξύ δύο συγκεντρώσεων της γενιστεΐνης (10 και 30 μM).

Αντίθετα η HS είναι προσκολλημένη κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη (47%), ενώ στα Saos 2 κύτταρα η μεγαλύτερη ποσότητα (61%) βρίσκεται στο υλικό της καλλιέργειας. Επιπρόσθετα, όταν συγκρίναμε [³H]-επισημασμένη ραδιενέργεια ενσωματωμένη στις GAGs, ήταν εμφανές ότι τα MG-63 κύτταρα συνθέτουν HA και HS σε αρκετά υψηλότερα ποσοστά από αυτά των Saos 2 κυττάρων. Τα MG-63 κύτταρα συνθέτουν 6 και 5 φορές αντίστοιχα υψηλότερες ποσότητες εκκρινόμενων HA και HS, από αυτές των Saos 2 κυττάρων. Επιπλέον, τα MG-63 κύτταρα συγκρατούν στην κυτταρική τους μεμβράνη 1.9 φορές υψηλότερες ποσότητες του HS συγκρινόμενα με τα Saos 2. Είναι αξιοσημείωτο, ότι τα Saos 2 κύτταρα εκκρίνουν 1.6 φορές υψηλότερο ποσό GalAGs σε σχέση με τα MG-63 κύτταρα.

1.3 Μελέτη της δράσης της γενιστεΐνης, στη σύνθεση των GAGs / PGs

Στη συνέχεια ελέγξαμε τη δράση της γενιστεΐνης στη σύνθεση αυτών των μορίων. Ο μηχανισμός δράσης της γενιστεΐνης, μέσω της ειδικής αναστολής της πρωτεΐνης της κινάσης της τυροσίνης (PTK), στο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων διαφόρων τύπων είναι γνωστός. Όταν χορηγήσαμε την γενιστεΐνη στα MG-63 κύτταρα σε συγκέντρωση των 10 μM, τα κύτταρα αυτά ελάττωσαν σημαντικά την παραγωγή των εξωκυττάρια-εκκρινόμενων HA και HS ενώ η σύνθεση των εκκρινόμενων GalAGs δεν επηρεάστηκε σημαντικά (Σχήμα 1.1A,B και C). Όμως, όταν χορηγήσαμε την γενιστεΐνη σε πύο υψηλή συγκέντρωση 30 μM, η σύνθεση του εκκρινόμενου HA ήταν περισσότερο μειωμένη συγκρινόμενη με τη σύνθεση της HS (Σχήμα 1A και C). Η σύνθεση των κυτταρικά προσκολλημένων GalAGs από τα MG-63 κύτταρα ρυθμίζεται με διαφορετικό τρόπο σε σύγκριση με αυτό των εκκρινόμενων. Έτσι, η γενιστεΐνη προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη αναστολή στη σύνθεση των κυτταρικά προσκολλημένων GalAGs σε όλες τις συγκέντρωσεις που χορηγήθηκαν (Σχήμα 1B), ενώ δεν είχε επίδραση στη παραγωγή της HS (Σχήμα 1C). Η χορήγηση της γενιστεΐνης προκάλεσε ανασταλτική επίδραση στη σύνθεση των εξωκυττάρια εκκρινόμενων καθώς και των κυτταρικά προσκολλημένων GAGs/PGs στα Saos 2 κύτταρα. Σε όλες τις περιπτώσεις, η ανασταλτική επίδραση της γενιστεΐνης ήταν εμφανής σε συγκεντρώσεις ψηλότερες των 10 μM (Σχήμα 1D, E and F). Είναι αξιοσημείωτο ότι η χορήγηση υψηλής συγκέντρωσης γενιστεΐνης (30 μM) ανέστειλλε σχεδόν πλήρως τη σύνθεση των GAGs.

1.4 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αμφότερες οι κυτταρικές σειρές συνθέτουν εξωκυττάριο υαλουρονικό οξύ (HA) καθώς και εκκρινόμενες και κυτταρικά προσκολλημένες γαλακτοζαμινογλυκάνες (GalAGs) και θειϊκή ηπαράνη (HS). Αν και αμφότερες οι κυτταρικές σειρές συνθέτουν αξιοσημείωτες ποσότητες PGs, τα Saos 2 κύτταρα παράγουν HA, GalAGs και HS σε σημαντικά χαμηλότερες ποσότητες από αυτές των MG-63 κυττάρων.

Μελετήσαμε επίσης τη δράση της γενιστεΐνης στη σύνθεση αυτών των μορίων. Ο μηχανισμός δράσης της γενιστεΐνης, μέσω της ειδικής αναστολής της πρωτεΐνης της κινάσης της τυροσίνης (PTK), στο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων είναι γνωστός. Η ανασταλτική επίδραση της γενιστεΐνης στη σύνθεση των εξωκυττάρια εκκρινόμενων και των κυτταρικά προσκολλημένων GAGs/PGs στα Saos 2 κύτταρα βρέθηκε να είναι δοσοεξαρτώμενη, και πιο πιθανόν μέσω ενός PTK μηχανισμού. Η σύνθεση των GAGs/PGs από τα MG-63 κύτταρα με την παρουσία της γενιστεΐνης εξαρτάται από το τύπο και την κατανομή, υποδηλώνοντας ένα πιο σύνθετο μηχανισμό που ρυθμίζει την σύνθεση των PGs.

2.0 Η επίδραση των αυξητικών παραγόντων bFGF, TGF και PDGF στη σύνθεση και κατανομή των γλυκοζαμινογλυκανών/πρωτεογλυκανών στις δύο κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος

2.1 Στόχος

Έχει βρεθεί ότι οι GFs όπως ο TGF-β), ο bFGF και ο PDGF βοηθούν την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος. Οι bFGF και ο PDGF έχουν ισχυρή μιτογονική δράση σε κύτταρα οστικής προέλευσης ενώ ο ρόλος του TGF-β φαίνεται να είναι περισσότερο σύνθετος (Shedlich *et al*, 1994; Hung *et al*, 1997; Seyedin *et al*, 1985). Αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες έχουν δείξει ότι παίζουν σημαντικό ρολό στη ρύθμιση της παραγωγής και κατανομής των γλυκοζαμινογλυκανών/πρωτεογλυκανών σε άλλες κυτταρικές σειρές. Έτσι, θελήσαμε να εξετάσουμε την δράση των TGF-β2, bFGF και PDGF-BB στη σύνθεση και τη κατανομή των γλυκοζαμινογλυκανών /πρωτεογλυκανών στις δύο κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος.

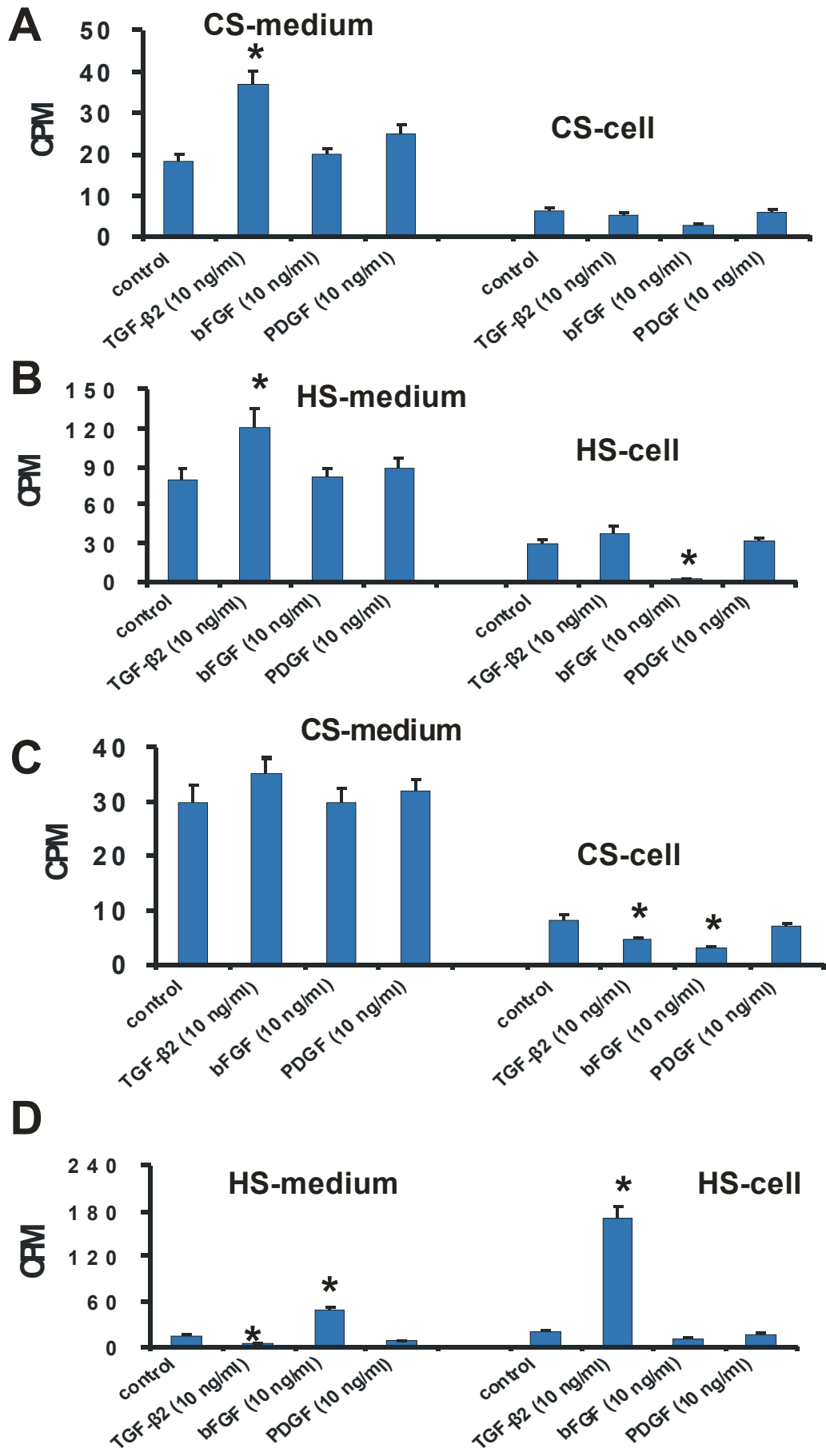
2.2 Μελέτη της δράσης των αυξητικών παραγόντων bFGF, TGF-β2 και PDGF στη σύνθεση και κατανομή των GAGs/PGs

Στις MG-63 και Saos 2 κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος χορηγήθηκαν οι αυξητικοί παράγοντες bFGF, TGF και PDGF και στην συνέχεια μελετήθηκε η σύνθεση και η κατανομή των GAGs. Οι βιοχημικές αναλύσεις των μεταβολικά σεσημασμένων (metabolically labeled) GAGs μετά την προσθήκη των αυξητικών παραγόντων παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.1A έως D. Όπως φαίνεται, η σύνθεση των εκκρινόμενων στον εξωκυττάριο χώρο CS και HS αυξάνεται κατά 2,2 και 1,5 φορές αντίστοιχα, μετά τη χορήγηση του TGF-β2 στα MG-63 κύτταρα (Σχήμα 2.1A και B), ενώ μειώθηκε η σύνθεση των προσδεμένων στη κυτταρική μεμβράνη HS μετά τη χορήγηση του bFGF (Σχήμα 2.1B). Ο TGF-β2 αύξησε στα Saos 2 κύτταρα κατά 9 φορές τη σύνθεση των προσδεμένων στη κυτταρική μεμβράνη HS ενώ, μείωσε τη σύνθεση των προσδεμένων στη κυτταρική μεμβράνη CS (Εικόνα 2.1C D).

2.3 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η δράση των αυξητικών παραγόντων διαφέρει μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών και η ρύθμιση της σύνθεσης των GAGs εξαρτάται από τον τύπο και την κατανομή τους.

Αποτελέσματα



Σχήμα 2.1. Επιδράση των bFGF, TGF-β2 και PDGF αυξητικών παραγόντων στη σύνθεση εκκρινόμενων και κυτταρικά προσκολλημένων GalAGs και HS από τα MG-63 (A, B) και Saos 2 κύτταρα (C, D). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως [³H]- επισημασμένη ραδιενέργεια ενσωματωμένη με τη μορφή της [³H]- γλυκοζαμίνης στα HS, και ως [³H]- γαλακτοζαμίνη στα GalAGs. (Means +/- SEM plotted; n=9). Στατιστικά σημαντικό: (*) p<0.01 μεταξύ κυττάρων που έγινε χορήγηση των αυξητικών παραγόντων και των κυττάρων ελέγχου.

3.0 Η επίδραση των γλυκοζαμινογλυκανών (GAG) στην ανάπτυξη των φυσιολογικών οστεοβλαστών και των καρκινικών κυττάρων του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος

3.1 Στόχος

Τροποποιήσεις της δομικής σύστασης των συστατικών των GAGs / PGs της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας μπορεί να έχει σημαντικές συνέπειες στο πολλαπλασιασμό ή και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Η χορήγηση των GAGs μπορεί να ρυθμίσει την ανάπτυξη των φυσιολογικών και των καρκινικών κυττάρων σε καλλιέργεια. Για την μελέτη της πιθανής επιδράσης των GAGs στο πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων οστεοβλαστών καθώς και των MG-63 και Saos 2 κυττάρων οστεοσαρκώματος, χορηγήθηκαν οι κυριότεροι τύποι αλυσίδων των GAGs,

3.2 Μελέτη της καθαρότητας και της χημικής σύνθεσης των GAGs

Η καθαρότητα των παρασκευασμάτων των GAGs εξετάστηκε με την εφαρμογή των μεμβρανών της οξικής κυτταρίνης (2-25) που έδειξε ότι όλες οι GAGs μετανάστευαν σαν όμοια φορτισμένα προϊόντα χωρίς μολυσμένα συστατικά.

Η χημική σύνθεση των GAGs που εξετάστηκαν παρουσιάζεται στο Πίνακα 3.1. Στην περίπτωση των αλυσίδων DS το IdoA βρίσκεται σε ποσοστό 71 % του ολικού ουρονικού οξέος, ενώ στο παρασκεύασμα CSA ανιχνεύθηκε μόνο το GlcA. Ο έλεγχος έδειξε ότι η γαλακτοζαμίνη (GalN) περιέχει τη N-ακετυλο ομάδα και στα δύο είδη GalAGs, π.χ. DS και CSA. Η ανάλυση HPLC μετά από τη χορήγηση χονδροϊτινικών έδειξε ότι η κύρια δισακχακχαριτική μονάδα, σε αμφοτέρες τις DS και CSA, είναι Δdi-mono4S (71% και 68%, αντίστοιχα). Η ανάλυση των δισακχακχαριτικών μονάδων με HPLC και HPCE μετά από πέψη της ηπαράνης με τις ηπαριτινάσες I, II και III μόνες ή/και σε συνδυασμό έδειξε ότι η κύρια

Αποτελέσματα

δισακχαριτική μονάδα είναι η τρις-θειωμένη Δdi-tri(2,6,N)S. Επιπρόσθετα, επικρατεί η L-IdoA μορφή του ουρονικού οξέος σε ποσοστό 67%.

Πίνακας 3.1. Η χημική σύνθεση των GAGs μετά από ειδικές πέψεις και HPLC / HPCE αναλύσεις.

Components/properties	CSA	DS	Heparin
<i>Uronic acid^a</i>			
IdoA / GlcA	0/100	71/29	67/33
<i>Hexosamines^b</i>			
N-acetylated	100	100	13.0
N-sulphated	ND	ND ^d	87.0
<i>Disaccharide composition^c</i>			
Δdi-nonS	5	2	≤0.5
Δdi-mono4S	68	71	-
Δdi-monoNS	-	-	≤0.5
Δdi-mono6S	17	1	6
Δdi-mono2S	-	-	2
Δdi-di(2,N)S	-	-	5
Δdi-di(2,4)S	≤1	24	-
Δdi-di(2,6)S	7	2	6
Δdi-di(6,N)S	-	-	12
Δdi-di(4,6)S	2	-	-
Δdi-tri(2,6,N)S	-	-	68

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν %: ^a του ολικού ουρονικού οξέος, ^b της ολικής εξοζαμίνης και ^c ολικών Δ-δισακχαριτών που ανιχνεύθηκαν από τις αναλύσεις με HPLC και HPCE. ^dμή-ανιχνεύσιμο.

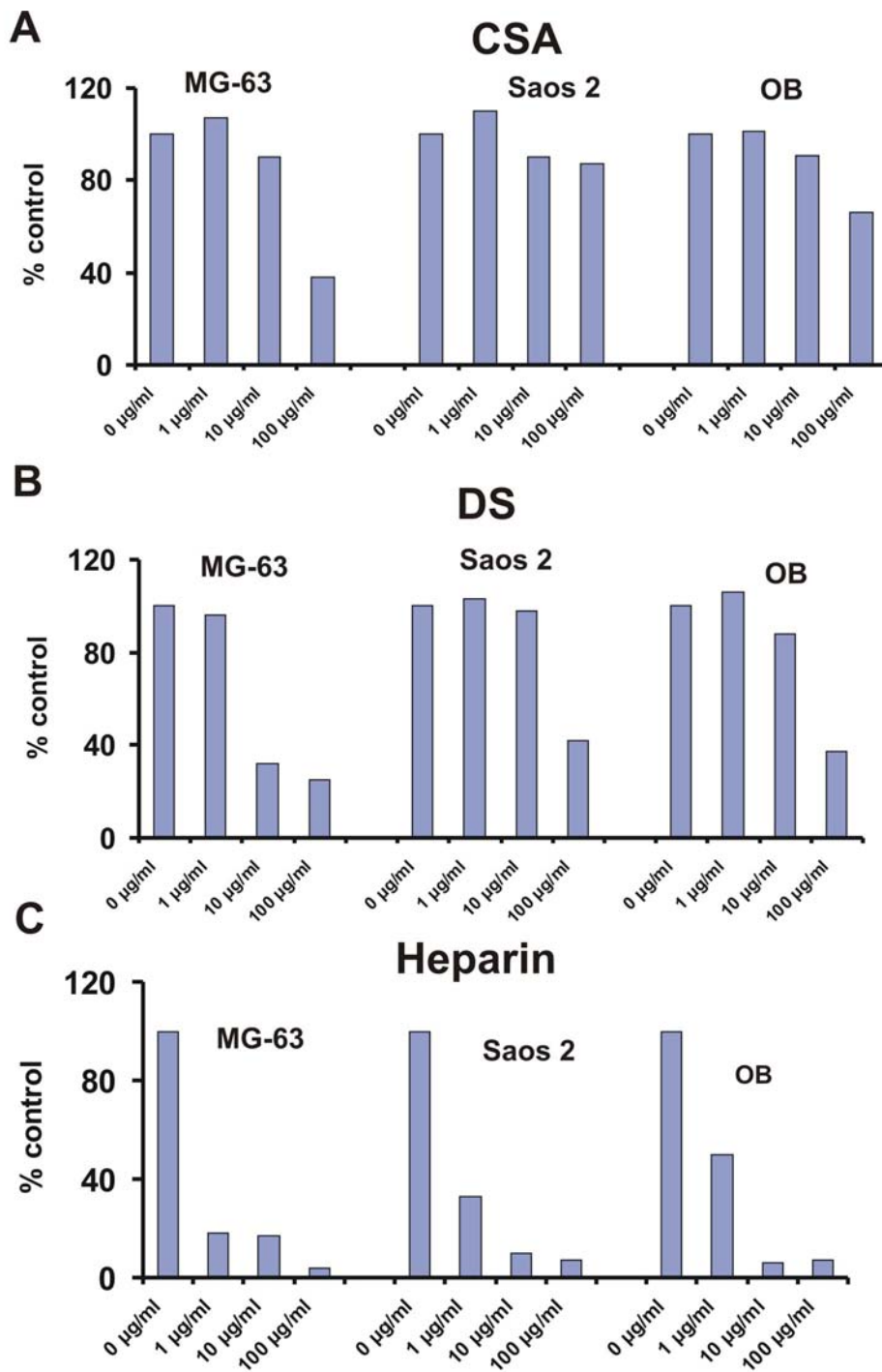
3.3 Μελέτη της επιδράσεως των GAGs στη ανάπτυξη φυσιολογικών και μετασχηματισμένων οστεοβλαστών

Η επίδραση των GAGs στη ανάπτυξη των φυσιολογικών οστεοβλαστών καθώς και των MG-63 και Saos 2 κυτταρικών σειρών ανθρώπινου οστεοσαρκώματος εξετάστηκε παρουσία ή/και απουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ποσοστό της ενσωμάτωσης της [³H]-θυμιδίνης σχετική με τα κύτταρα ελέγχου.

Η θειϊκή χονδροϊτίνη (CSA) και η θειϊκή δερματάνη (DS) ανέστειλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όλων των οστεοβλαστικών κυττάρων στην υψηλότερη συγκέντρωση (100 μg/ml) που χρησιμοποιήθηκε (Σχήμα 3.1A). Η DS είχε την ισχυρότερη ανασταλτική επίδραση, πιθανόν λόγω της παρουσίας εύκαμπτων μονάδων IdoA που προσφέρουν μεγαλύτερη ποικιλία στη διάταξη αυτών των μακρομορίων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των MG-63 κύτταρων σε συγκέντρωση 10 μg/ml (Σχήμα 3.1B). Η ηπαρίνη ανέστειλε σημαντικά το πολλαπλασιασμό τόσο των φυσιολογικών οστεοβλαστών όσο και των μετασχηματισμένων οστεοβλαστικών κυττάρων σε συγκέντρωση ≥ 1 μg/ml. Η παρουσία μεγάλης ποσότητας τρις-θειωμένων δισακχαριτών που περιέχουν IdoA είναι υπεύθυνη για το αρνητικό φορτίο της ηπαρίνης και θα πρέπει να θεωρείται σαν ένας σημαντικός παράγοντας της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι GAGs που χορηγήθηκαν είναι παράγοντες που επηρεάζουν τη κυτταρική ανάπτυξη των κακοήθων και των φυσιολογικών κυττάρων οστεοβλαστικής αρχής με δόσοεξαρτώμενη συμπεριφορά. Αυτή η επίδραση φάνηκε να σχετίζεται στενά με τη λεπτομερή χημική δομή των GAGs, όπως για π.χ. είναι η παρουσία L-ιδουρονικού οξέος και ο βαθμός της θείωσής τους (Volpi & al, 1994).

3.4 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι οι GAGs της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας είναι μακρομόρια που επηρεάζουν τη κυτταρική ανάπτυξη των κακοήθων και των φυσιολογικών κυττάρων οστεοβλαστικής αρχής με μια δόσοεξαρτώμενη συμπεριφορά. Αυτή η επίδραση σχετίζεται στενά με τη λεπτομερή χημική δομή των GAGs, όπως για π.χ. είναι η παρουσία L-ιδουρονικού οξέος και ο βαθμός της θείωσής τους.



Σχήμα 3.1. Επιδράσεις του CSA (A), DS (B) και της ηπαρίνης (C) στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό των MG-63 και Saos 2 κυττάρων καθώς και των OB οστεοβλάστων όπως καθορίστηκε με την ενσωμάτωση της $[^3\text{H}]$ - θιμιδίνης . Τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν ως ποσοστό επί τοις εκατό της ενσωματωμένης $[^3\text{H}]$ - θιμιδίνης συγκρινόμενα με τα κύτταρα ελέγχου.

4.0 Μελέτη της επίδρασης του αυξητικού παράγοντα του μετασχηματισμού (TGFβ2) στη έκφραση των ισομορφών της βερσικάνης, των συνθασών του υαλουρονικού οξέος καθώς και στην παραγωγή του υαλουρονικού οξέος από τα κακοήθη κύτταρα του οστεοσαρκώματος

4.1 Στόχος

Η βερσικάνη, μια μεγάλου μεγέθους PG θειϊκής χονδροϊτίνης και το συνδεδεμένο σε αυτή HA είναι συστατικά της ECM που παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην συμπεριφορά των μετασχηματισμένων κυττάρων (Iozzo & Murdoch, 1996). Η έκφραση συγκεκριμένων ισομορφών της βερσικάνης ενοχοποιείται για την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Rahmani, *et al*, 2006). Επίσης η διακοπή της σύνθεσης HA μέσω της αναστολής της έκφρασης της συνθάσης 2 (HAS2) στα κύτταρα οστεοσαρκώματος καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα και την διηθητική ικανότητά τους (Nishida *et al*, 2005). Η ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος μπορεί να επηρεαστεί από τους αυξητικούς παράγοντες που εκφράζονται από τα οστά μέσω αυτοκρινών και παρακρινών μηχανισμών (Robken *et al*, 1987; Gebken *et al*, 1999). Επειδή οι αυξητικοί παράγοντες TGF-β2, bFGF και PDGF-BB, είναι σημαντικοί ρυθμιστές της έκφρασης των μακρομορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, προχωρήσαμε στη μελέτη της επίδρασης αυτών των αυξητικών παραγόντων στην έκφραση των διαφόρων ισομορφών της βερσικάνης, στην σύνθεση της συνθάσης του HA από τα MG-63 κύτταρα του οστεοσαρκώματος αλλά και από τους φυσιολογικούς ανθρώπινους οστεοβλάστες του περιοδοντικού συνδέσμου (hPDL).

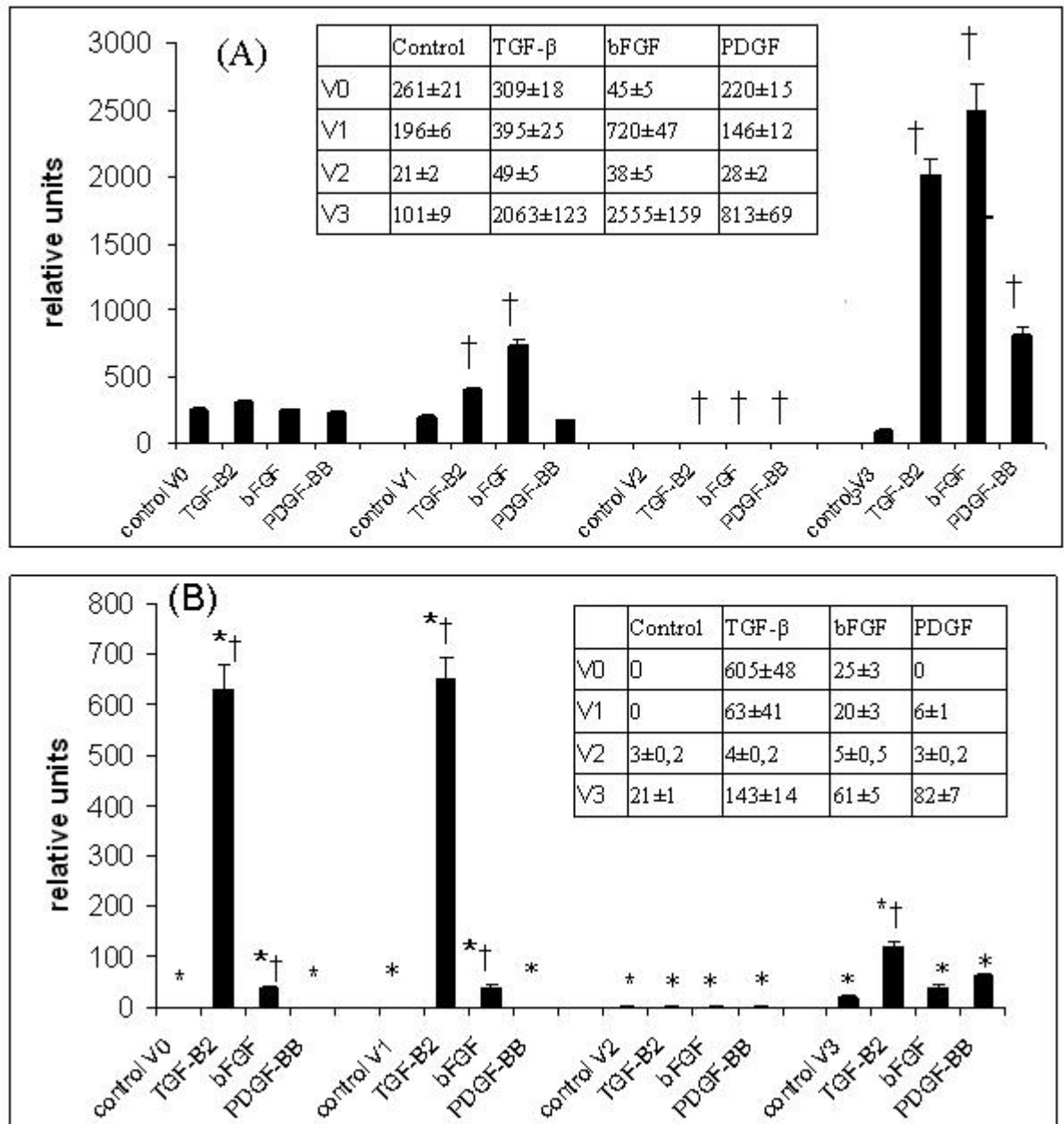
4.2. Μελέτη της επίδρασης των αυξητικών παραγόντων στη γονιδιακή έκφραση της βερσικάνης

Στη πρώτη φάση της μελέτης αυτής εξετάσαμε την έκφραση των ισομορφών της βερσικάνης σε επίπεδο mRNA στους hPDL οστεοβλάστες και στα MG-63 καρκινικά κύτταρα. Στο Σχήμα 4.1A, φαίνεται ότι τα φυσιολογικά hPDL κύτταρα εκφράζουν όλες τις ισομορφές αλλά σε διαφορετικές ποσότητες. Αντίθετα, τα MG-63 κύτταρα του οστεοσαρκώματος δεν εκφράζουν τις V1 και V0 ισομορφές, ενώ εκφράζουν σε ανιχνεύσιμα επίπεδα τις V2 και V3 (Σχημα 1A και B). Η χορήγηση των αυξητικών παραγόντων στα hPDL κύτταρα έδειξε ότι ο καθένας από αυτούς είχε ξεχωριστή

Αποτελέσματα

επίδραση. Ο TGF- β 2 αύξησε μέτρια την έκφραση των V1, V2 και έντονα της V3. Στα MG-63 κύτταρα η διεγερτική επίδραση του TGF- β 2 ήταν έντονη στην έκφραση των V1 και V0, οι οποίες

Figure 1.

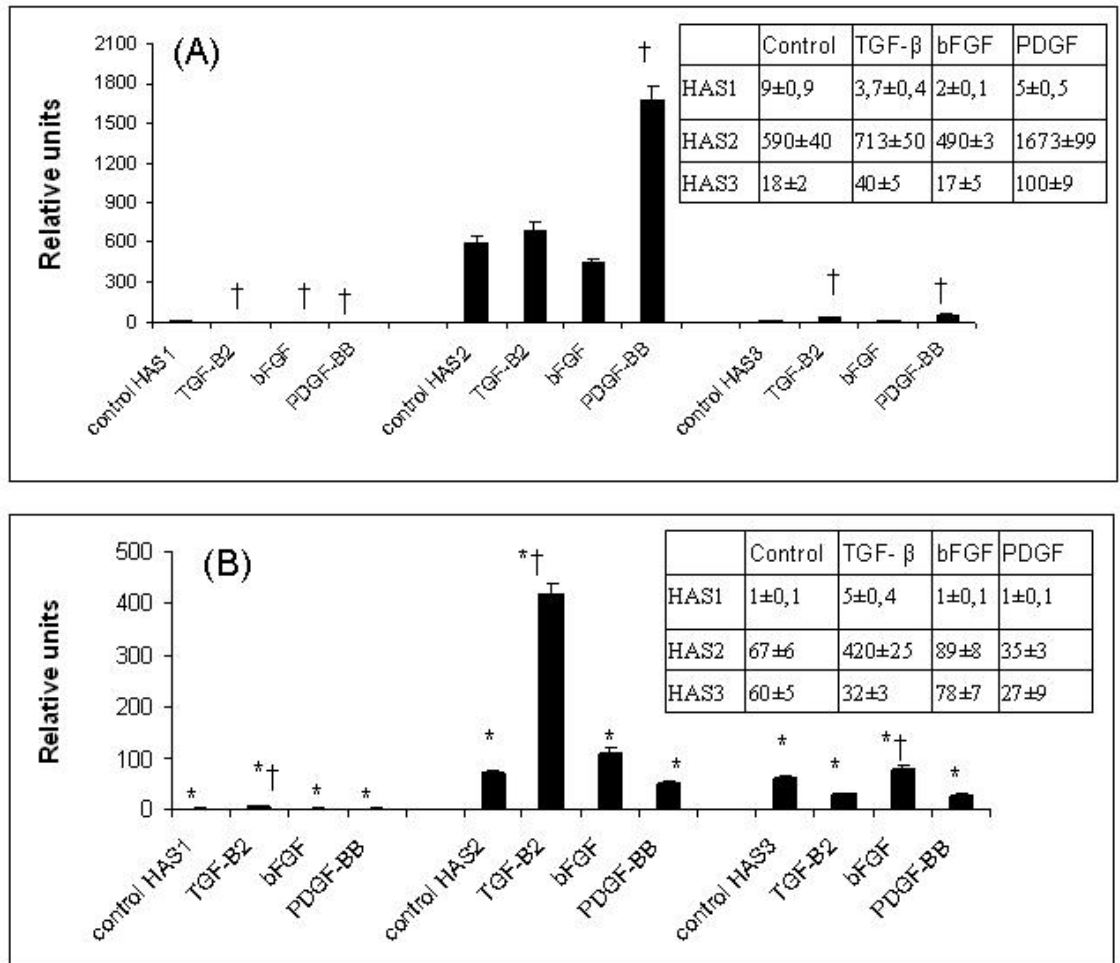


Σχήμα: 4.1. Επίδραση των TGF- β 2, bFGF και PDGF-BB στα επίπεδα έκφρασης του mRNA των V0, V1, V2 και V3 ισομορφών σε hPLD (A) και MG-63 (B) κύτταρα που εκφράζονται σαν ανεξάρτητες μονάδες. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές σε τριπλέτες. (Means \pm SEM plotted; n=9). * αντιστοιχεί σε $p < 0.01$ όταν συγκρίνουμε τα MG-63 με τα hPLD κύτταρα; † αντιστοιχεί σε $p < 0.01$ σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς.

Αποτελέσματα

όμως δεν εκφράζονται στα βασικά επίπεδα των MG-63 κυττάρων. (Σχήμα 1B). Επίσης, παρατηρήθηκε μια μέτρια διέγερση της έκφρασης της V3. Επιπρόσθετα, παρ'όλο που ο

Figure 2



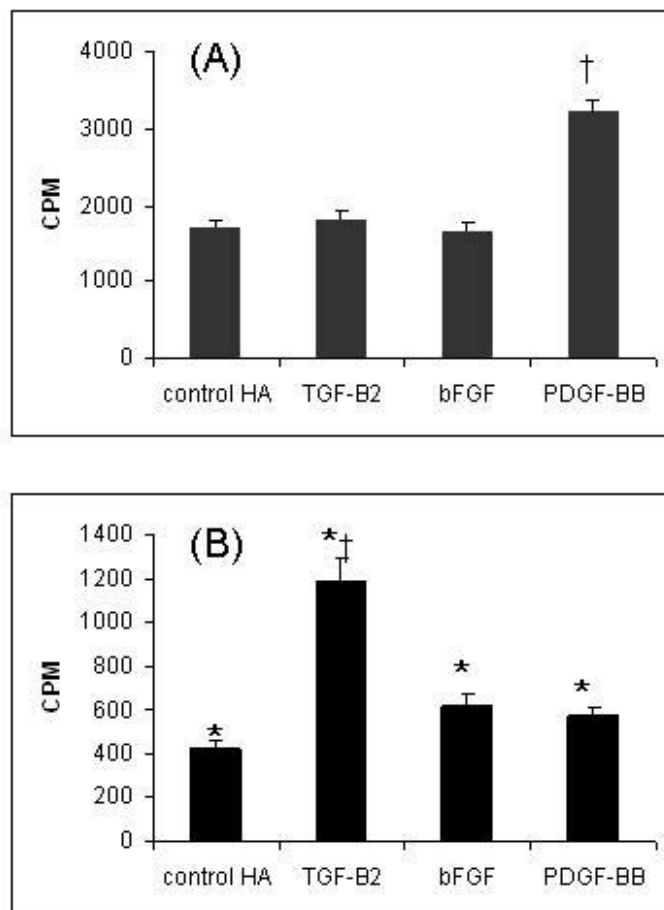
Σχήμα: 4.2. Επιδράση των TGF-β2, bFGF και PDGF-BB στη έκφραση του mRNA των HAS1, HAS2 και HAS3 ισομορφών σε hPLD (A) και MG-63 (B) κύτταρα που εκφράζονται σαν ανεξάρτητες μονάδες. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές σε τριπλέτες. (Means +/- SEM plotted; n=9). * αντιστοιχεί σε $p < 0.01$ όταν συγκρίνουμε τα MG-63 με τα hPLD κύτταρα; † αντιστοιχεί σε $p < 0.01$ σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου.

PDGF-BB διεγείρει την εκφράση των V2 / V3 στα hPDL κύτταρα δεν φάνηκε να έχει επίδραση στα MG-63 κύτταρα. Παρόμοια με τον PDGF-BB, είδαμε ότι ο bFGF δρά κυρίως στα φυσιολογικά κύτταρα στα οποία διεγείρει την έκφραση των V1, V2 και πίο έντονα την V3. Η επίδραση των αυξητικών παραγόντων στην έκφραση των ισομορφών της βερσικάνης είναι διαφορετική στους φυσιολογικούς οστεοβλάστες από εκείνη στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος. Αναλυτικά, οι TGF-β2, bFGF και PDGF-BB αυξητικοί παράγοντες, διεγείρουν την έκφραση των ισομορφών της βερσικάνης στα hPDL κύτταρα, ιδιαίτερα την V3 ισομορφή, ενώ ο TGF-β2 έδειξε σημαντική διεγερτική επίδραση στις V0 και V1 ισομορφές των MG-63 κύτταρων.

4.3 Μελέτη της επίδρασης των αυξητικών παραγόντων στην έκφραση των HAS και στην σύνθεση του HA

Τα βασικά επίπεδα των μεταγράφων των διαφόρων HAS ισομορφών των φυσιολογικών οστεοβλαστών είναι υψηλότερα συγκρινόμενα με αυτά των κυττάρων του οστεοσαρκώματος. Η κύρια HAS ισομορφή που βρέθηκε να εκφράζεται από τα φυσιολογικά hPDL κύτταρα ήταν η HAS2, ενώ τα επίπεδα των HAS1 και HAS3 ήταν μόλις ανιχνεύσιμα (Σχήμα 4.2A και B). Παρ'όλο που και στα MG-63 κύτταρα η HAS2 ήταν η κύρια ισομορφή, τα μεταγραφικά της επίπεδα ήταν σημαντικά χαμηλότερα συγκρινόμενα με αυτά των hPDL κύτταρων. Η χορήγηση του TGF-β2 διεγείρει αισθητά (7 φορές) τα HAS2 μετάγραφα στα MG-63 κύτταρα, όχι όμως και στα hPDL (Σχήμα 2B). Ο PDGF-BB αντίθετα αύξησε την έκφραση των HAS2 και 3 μόνο στα hPDL κύτταρα (Σχήμα 2A), ενώ στα MG-63 ανέστειλε τα επίπεδα της HAS3 (Σχήμα 4.2 B). Λόγω της παρατηρούμενης επίδρασης των αυξητικών παραγόντων στην παραγωγή του HA θελήσαμε να μετρήσουμε τα επίπεδα του νεο-συντιθέμενου HA, χρησιμοποιώντας ραδιενεργό επισήμανση και λεπτομερή HPLC βιοχημική ανάλυση. Αυτή η ποσοτικοποίηση έδειξε 4 φορές υψηλότερη βασική παραγωγή HA από τα hPDL κύτταρα συγκρινόμενη με αυτή των MG-63 κύτταρων, που σχετίζεται άμεσα με τα αποτελέσματα της HAS έκφρασής τους (Σχήμα 4.3A και B). Η χορήγηση του TGF-β2 προκάλεσε σημαντική αύξηση της παραγωγής του HA στα MG-63 κύτταρα, ενώ αντίθετα ο PDGF-BB προκάλεσε σημαντική διέγερση της παραγωγής του HA στα φυσιολογικά hPDL κύτταρα (Σχήμα 4.3A και B).

Figure 3



Σχήμα 4.3. Επίδραση των TGF-β2, bFGF και PDGF-BB στη σύνθεση του HA σε hPLD (A) και MG-63 (B) κύτταρα που εκφράζονται σαν (CPM x 1000) της D-γλυκοζαμίνης- [6-³H(N)] που ενσωματώθηκε από τα κύτταρα. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές σε τριπλέτες. (Means +/- SEM plotted; n=9). * αντιστοιχεί σε p<0.01 όταν συγκρίνουμε τα MG-63 με τα hPLD κύτταρα; † αντιστοιχεί σε p<0.01 σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου.

4.4 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος ο TGF-β2 επιδρά στην έκφραση της βερσικάνης και του υαλουρονικού οξέος, ενώ στους οστεοβλάστες ο PDGF-BB είναι εκείνος από τους αυξητικούς παράγοντες που είχε την σημαντικότερη επίδραση στην έκφραση της HAS2 ισομορφής και στην βιοσύνθεση του υαλουρονικού οξέος.

Η βερσικάνη (versican), μια μεγάλου μεγέθους πρωτεογλυκάνη θειϊκής χονδροϊτίνης (PG) και το συνδεδεμένο σε αυτή υαλουρονικό οξύ (HA), είναι συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM) που παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην συμπεριφορά των μετασχηματισμένων κυττάρων. Η έκφραση συγκεκριμένων ισομορφών της βερσικάνης έχει ενοχοποιηθεί για την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Επίσης η διακοπή της σύνθεσης HA μέσω της αναστολής της έκφρασης της συνθάσης 2 (HAS2) στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος κατέστειλλε τον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα και την διηθητική ικανότητά τους. Επιπρόσθετα, επειδή οι αυξητικοί παράγοντες ο TGF-β2, ο bFGF και ο PDGF-BB, είναι σημαντικοί ρυθμιστές της έκφρασης των μακρομορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, προχωρήσαμε στην μελέτη της επίδρασής τους στην έκφραση των διαφόρων ισομορφών της βερσικάνης, στην σύνθεση της συνθάσης του HA από τα MG-63 κύτταρα του οστεοσαρκώματος αλλά και από φυσιολογικούς ανθρώπινους οστεοβλάστες του περιοδοντικού συνδέσμου (hPDL). Χρησιμοποιήθηκαν RT-PCR, ραδιενεργή σήμανση και χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης (HPLC). Από την μελέτη μας βρέθηκε ότι, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά hPDL κύτταρα, τα MG-63 κύτταρα του οστεοσαρκώματος δεν εκφράζουν τις V0 και V1 ισομορφές της βερσικάνης. Η εξωγενής πρόσθεση του TGF-β2 διέγειρε το μεταγραφικό επίπεδο της βερσικάνης οδηγώντας κυρίως τα κύτταρα του οστεοσαρκώματος να εκφράσουν τις V1 και V0 ισομορφές. Ο PDGF-BB και ο bFGF είχαν ελάχιστη επίδραση σ' αυτά τα κύτταρα. Στα hPDL κύτταρα παρατηρήθηκε μια μεγάλη διέγερση του V3 αντίγραφου από όλους τους αυξητικούς παράγοντες. Ο TGF-β2 ήταν ο μεγαλύτερος διεγέρτης της έκφρασης της HAS2 ισομορφής καθώς και της σύνθεσης του υαλουρονικού οξέος από τα κύτταρα του οστεοσαρκώματος, ενώ ο PDGF-BB είχε την κύρια επίδραση του στην έκφραση της HAS2 ισομορφής και στην βιοσύνθεση του υαλουρονικού οξέος από τους οστεοβλάστες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο TGF-β2 προκαλεί την έκφραση της βερσικάνης και του υαλουρονικού οξέος από τα κύτταρα του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος και ότι

αυτός ο αυξητικός παράγοντας μπορεί να έχει ρόλο για τη μεταστατική ικανότητα αυτών των κυττάρων.

5.0. Μελέτη της έκφρασης της λουμικάνης και συσχέτιση αυτής με τη διαφοροποίηση και ανάπτυξη των κυττάρων του οστεοσαρκώματος

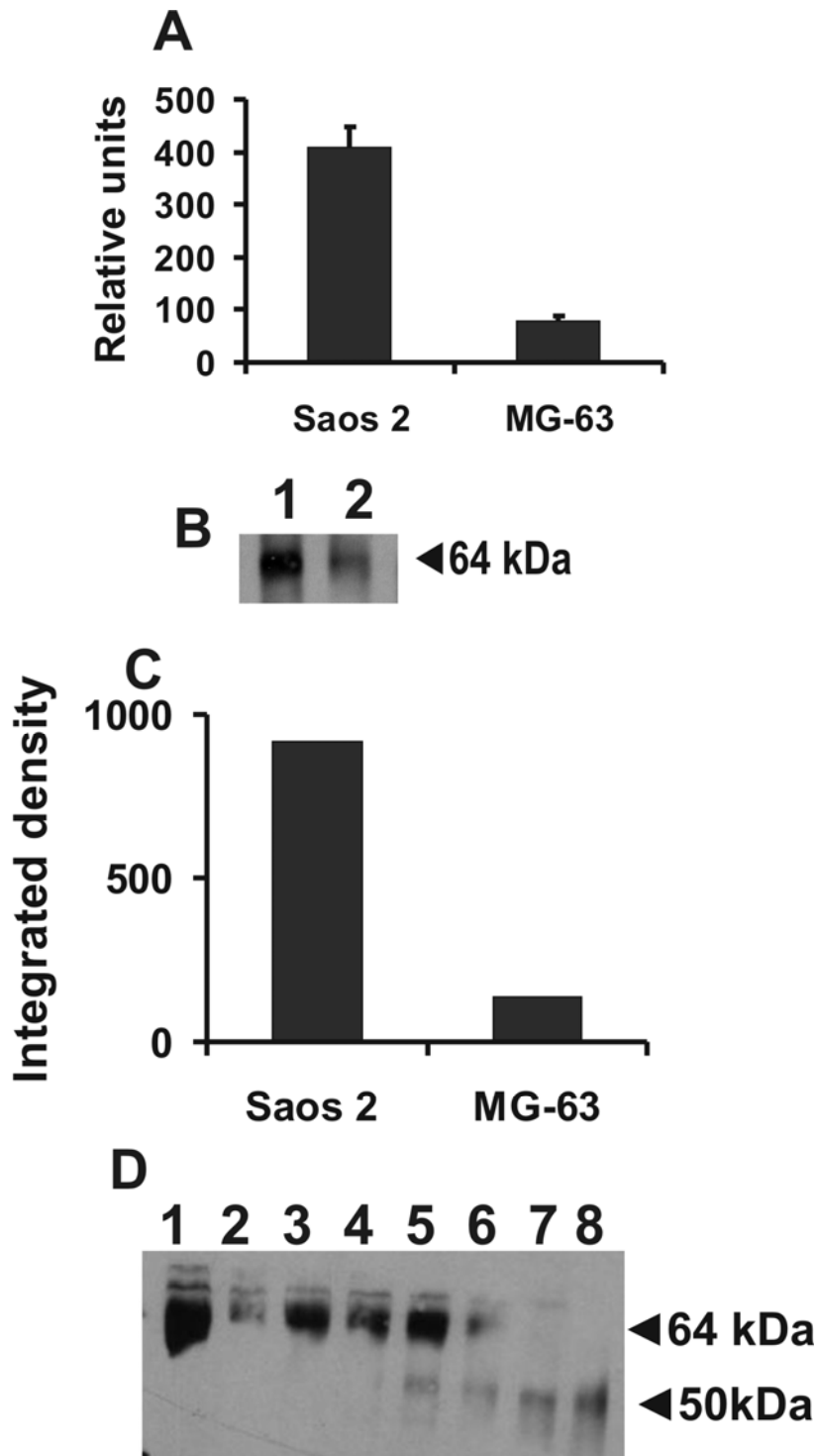
5.1 Στόχος

Οι μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRP) όπως είναι η διγλυκάνη, η διακοσμιτίνη, η ινομοδουλίνη, η λουμικάνη και η οστεοαδχερίνη (Ameys & Young, 2002) είναι οι πιο άφθονες πρωτεογλυκάνες του οστεοειδούς. Το χαρακτηριστικό σε σχήμα πετάλου αλόγου του πρωτεϊνικού τους κορμού τους επιτρέπει να αλληλεπιδρούν με άλλα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας (κυρίως με ίνες κολλαγόνου), αλλά και με την ανόργανη φάση στη διάρκεια της ασβεστοποίησης. Έχει αναφερθεί, μετά από απομόνωση και χαρακτηρισμό των PGs, η παρουσία διγλυκάνης και διακοσμιτίνης σε ανθρώπινα κύτταρα εμβρυϊκού οστού, ενώ σε κύτταρα ώριμου οστού απουσίαζε η διγλυκάνη (Waddington *et al*, 1999). Η λουμικάνη έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στη ρύθμιση του σχηματισμού των ιών κολλαγόνου στο οστεοειδές (Rauf *et al*, 2002). Επίσης, βρέθηκε σε πρόσφατη μελέτη ότι η λουμικάνη είναι μία κύρια PG του ώριμου οστεοειδούς (Rauf *et al*, 2002). Βάση των πληροφοριών αυτών, θελήσαμε αρχικά να εξετάσουμε την έκφραση της λουμικάνης στις δύο κυτταρικές σειρές MG-63 και Saos 2 οστεοσαρκώματος που έχουν διαφορετική διαφοροποίηση και μεταστατική δυνατότητα και στην συνέχεια να μελετήσουμε το ρόλο της λουμικάνης στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι Real time PCR και western blotting με αντισώματα για τον πρωτεϊνικό κορμό και τη θειϊκή κερατάνη (KS) καθώς και ειδικές ενζυμικές πέψεις. Οι κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος, που χρησιμοποιούνται στη παρούσα μελέτη, βρέθηκε ότι εκφράζουν και εκκρίνουν την λουμικάνη μερικώς γλυκοζυλιωμένη με τις αλυσίδες θειϊκής κερατάνης. Είναι ενδιαφέρον ότι τα μη μεταστατικά καλώς διαφοροποιημένα Saos 2 κύτταρα παρήγαγαν λουμικάνη επτά φορές περισσότερη συγκρινόμενη με εκείνη που παρήγαγαν τα υψηλής μεταστατικής ικανότητας κύτταρα της MG-63 σειράς. Η

Αποτελέσματα

χρησιμοποίηση ειδικού siRNA για το γονίδιο της λουμικάνης κατέστειλε τα επίπεδα



Σχήμα 5.1. Έκφραση της λουμικάνης σε επίπεδο mRNA, πρωτεϊνών και γλυκανών. (A) Τα mRNA επίπεδα της λουμικάνης στα Saos 2 και MG-63 κύτταρα προσδιορίστηκαν με την μέθοδο real-time PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο της λουμικάνης (B) Έκφραση της λουμικάνης σε επίπεδο πρωτεΐνης στα Saos 2 (λωρίδα 1) και MG-63 (λωρίδα 2) κύτταρα, με ανάλυση κατά Western. (C) Πυκνομετρική ανάλυση των ζωνών της

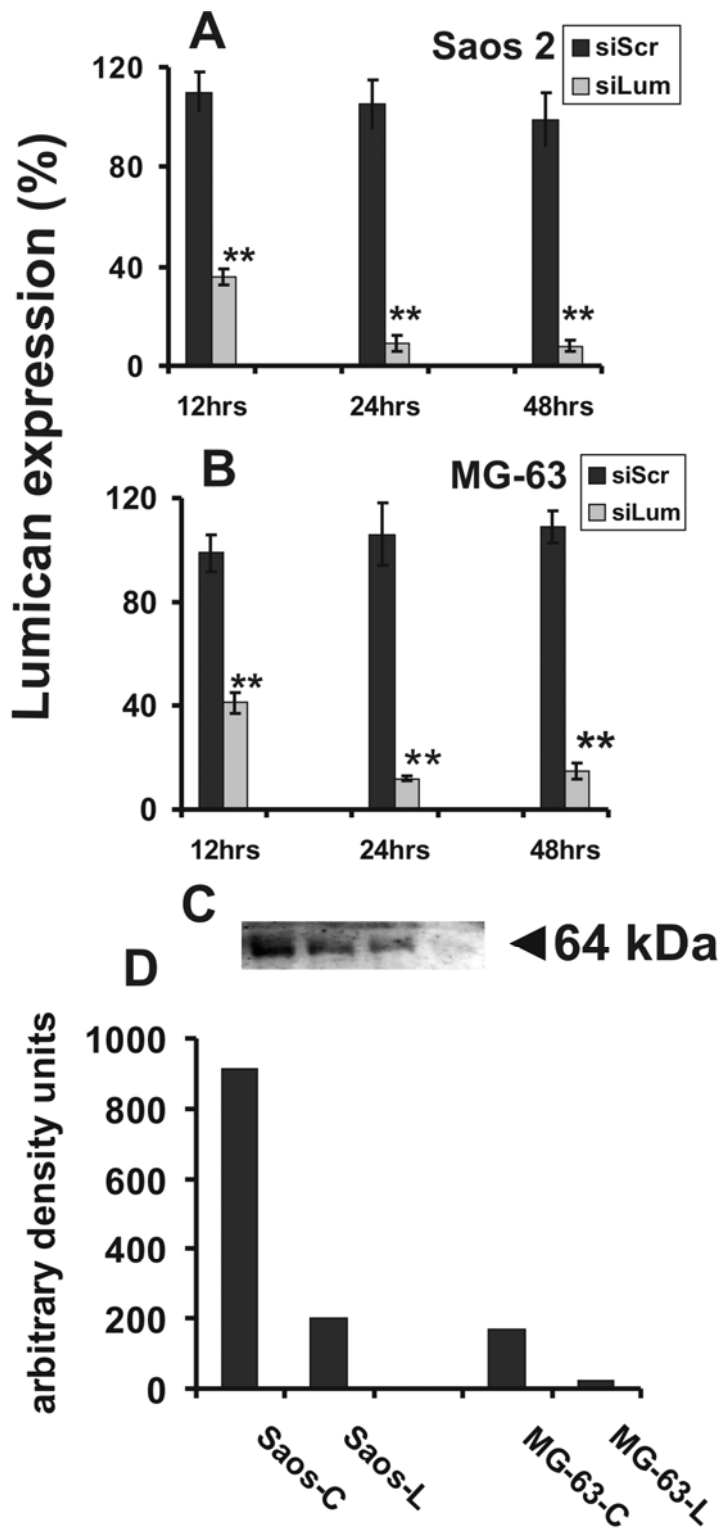
λουμικάνης. (D) 10 μg ολικών πρωτεϊνών από τα Saos 2 και MG-63 κύτταρα, έπειτα από πέψη με PNGase F (λωρίδες 2 και 4, αντίστοιχα) ή κερατανάση (λωρίδες 5 και 6, αντίστοιχα) και ανίχνευση κατά Western με αντίσωμα ειδικό για την KS. Σε περίπτωση που χορηγηθήκαν και τα δύο ένζυμα εξαφανίστηκε τη 64 kDa ζώνη στα Saos 2 και MG-63 κύτταρα (λωρίδα 7 και 8, αντίστοιχα).

κυτταρικές σειρές εκφράζουν την λουμικάνη σε επίπεδο mRNA και ότι τα μετάγραφα στα Saos 2 κύτταρα είναι 7 φορές περισσότερα σε σχέση με εκείνα των MG-63 κύτταρων (Σχήμα 5.1A). Με σκοπό τον χαρακτηρισμό της λουμικάνης που εκφράζεται από αμφότερες τις κυτταρικές σειρές, συγκεντρώθηκε η ολικώς εκκρινόμενη πρωτεΐνη από το υλικό της καλλιέργειας των Saos 2 και MG-63 κύτταρων. Η ανάλυση κατά Western με ειδικό αντίσωμα για τον πρωτεϊνικό κορμό της λουμικάνης έδειξε ότι η λουμικάνη εκκρίνεται και από τις δύο κυτταρικές σειρές (Σχήμα 5.1B). Το μέγεθος της ειδικής ζώνης (64 kDa) υποδηλώνει ότι η εκκρινόμενη λουμικάνη από τα Saos 2 και MG-63 κύτταρα ήταν γλυκοζυλιωμένη. Πυκνομετρική ανάλυση των ζωνών έδειξε ότι τα Saos 2 κύτταρα εκκρίνουν 7.3 φορές περισσότερη πρωτεΐνη από ότι τα MG-63 κύτταρα (Σχήμα 5.1C). Για τον καθορισμό του τύπου της γλυκοζυλίωσης της λουμικάνης χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της KS (κλώνος 5D4). Ανοσοκατακρήμιση με 5D4 έδωσε τη χαρακτηριστική για τις πρωτεογλυκάνες ζώνη 60-90 kDa (Σχήμα 5.1D, λωρίδα 1, Saos 2, λωρίδα 2, MG-63), δείχνοντας ότι η λουμικάνη που εκφράζεται από τα κύτταρα του οστεοσαρκώματος ήταν μερικώς γλυκοζυλιωμένη με αλυσίδες KS. Επιπρόσθετα, έγινε πέψη των εκκρινόμενων πρωτεϊνών με τη κερατινάση II και με τη PNGaseF και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με το αντίσωμα έναντι των αλυσίδων KS για να χαρακτηρισθούν οι προσδεμένες GAGs (L-18). Η ανοσοαποτύπωση κατά Western έδειξε σημαντική μείωση των ειδικών ζωνών για τη KS και στις δύο περιπτώσεις (Σχήμα 5.1D). Η ειδική ζώνη για το KS εξαφανίστηκε όταν χορηγηθήκαν και τα δύο ένζυμα ταυτόχρονα (Σχήμα 5.1D).

5.2 Αναστολή των mRNA επιπέδων της λουμικάνης μετά από εισαγωγή του siRNA

Αποτελέσματα

Με σκοπό τη διερεύνηση του πιθανού ρόλου της λουμικάνης στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος έγινε εισαγωγή γενετικού υλικού με siRNA ειδικό για το γονίδιο



Σχήμα 5.2. Εισαγωγή γενετικών τμημάτων με siRNA. Στα Saos 2 (A) και MG-63 (B) κύτταρα έγινε εισαγωγή του siRNA της λουμικάνης (siLum) και του scramble siRNA (siScr) που χρησιμοποιήθηκαν σαν κύτταρα ελέγχου και μετρήθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός

τους (Σχήμα 5.3A και B). Η αναστολή της έκφρασης της λουμικάνης επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο real-time PCR και παρουσιάζεται σαν ποσοστό της έκφρασης των κυττάρων ελέγχου στις 12, 24 και 48 ώρες (h). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές σε τριπλέτες. (Means +/- SEM plotted; n=5). ** αντιστοιχεί σε $p < 0.001$). (C) Ίσες ποσότητες πρωτεϊνών απομονώθηκαν από το θρεπτικό υλικό των καλλιέργειών των Saos 2 siScr (λωρίδα 1)/siLum (λωρίδα 2) και MG-63 siScr (λωρίδα 3) /siLum (λωρίδα 4) και έγινε ανοσοαποτύπωση με το ειδικό αντίσωμα για τη λουμικάνη. (D) Πυκνομετρική ανάλυση των ειδικών ζωνών για τη λουμικάνη.

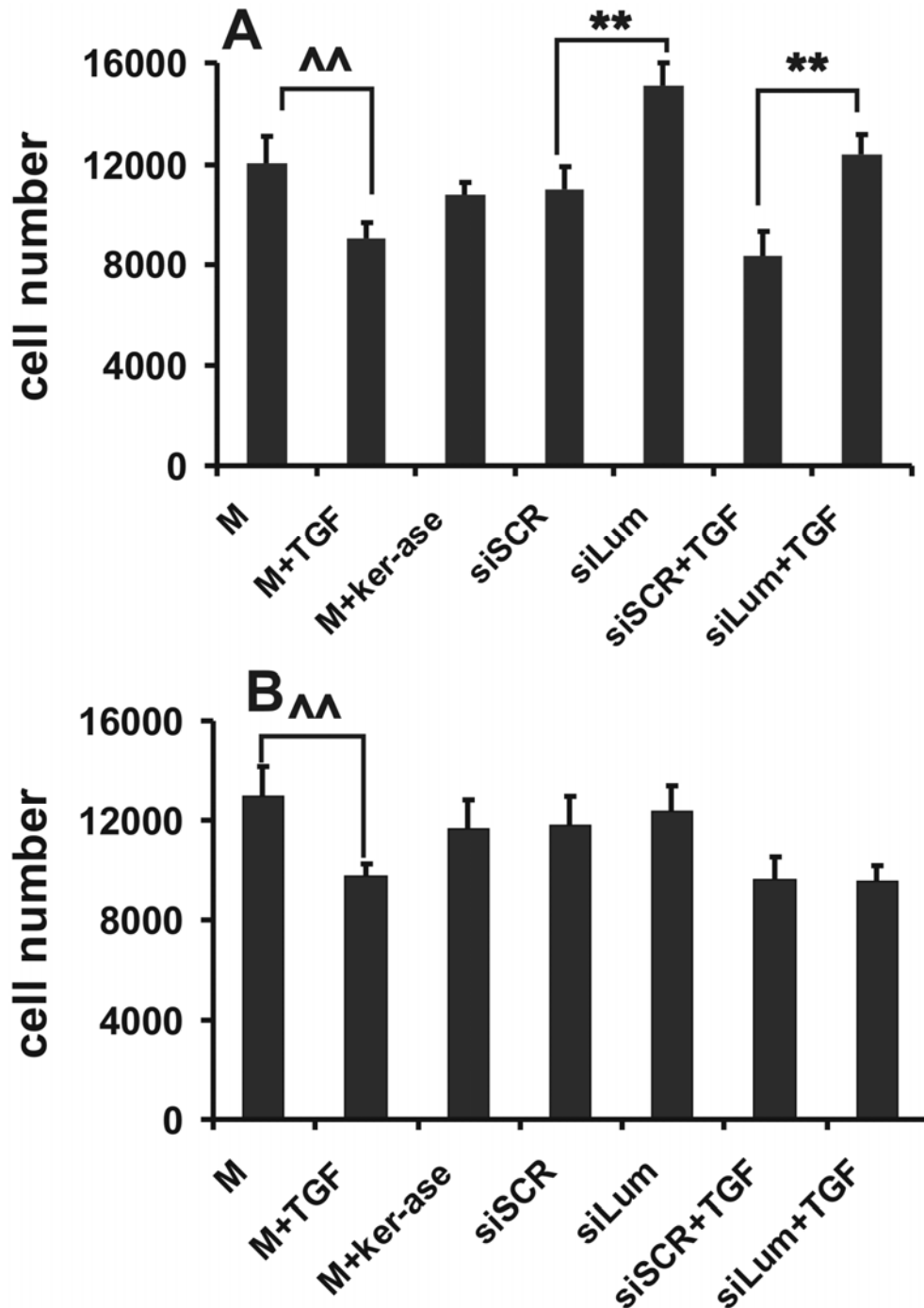
της λουμικάνης στα Saos 2 και MG-63 κύτταρα. Η αναστολή των επίπεδων έκφρασης του γονιδίου επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο του Real-time PCR (Σχήμα 5.2). Η χορήγηση του siRNA για 12 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης της λουμικάνης κατά 35% και 46% αντίστοιχα, συγκρινόμενη με τα κύτταρα ελέγχου στα οποία χορηγήθηκε το scramble siRNA (Σχήμα 5.2A και B). Στις 24 ώρες έγινε περαιτέρω αναστολή της έκφρασης της λουμικάνης που έφτασε 87% για τα Saos 2 και 80% για τα MG-63 συγκρινόμενα με τα κύτταρα ελέγχου, ενώ στις 48 ώρες παρέμεινε σταθερή η αναστολή της έκφρασης της λουμικάνης (Σχήμα 2A και B). Η αναστολή των επιπέδων των μεταγράφων συνοδεύτηκε με σημαντική μείωση της έκκρισης της λουμικάνης (Σχήμα 5.2C και D).

5.3 Μελέτη της επίδρασης του siRNA της λουμικάνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Η αναστολή της σύνθεσης της λουμικάνης, μετά από τη χορήγηση του siRNA είχε σαν αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ελέγχου (Σχήμα 5.3A). Η αναστολή της χαμηλής έκφρασης της λουμικάνης στα MG-63 κύτταρα δεν επηρέασε την ανάπτυξή τους (Σχήμα 5.3B). Ο TGF- β 2 είναι γνωστός ως ένας ήπιος αναστολέας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των Saos 2 και MG-63 κυττάρων, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και στη δική μας μελέτη, όταν τον χρησιμοποιήσαμε σαν ανεξάρτητο διεγέρτη της ανάπτυξης των κυττάρων του οστεοσαρκώματος (Σχήμα 5.3A και B). Σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές στις οποίες έγινε εισαγωγή του γενετικού τμήματος της λουμικάνης (siLum) ή του γενετικού τμήματος ελέγχου (siScr), χορηγήθηκε ο

Αποτελέσματα

TGF- β 2 και εξετάστηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός τους, επειδή οι SLRP μπορούν να επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της ρύθμισης της σηματοδότησης του TGF- β 2. Τα siLum Saos 2 κύτταρα έδειξαν μεγαλύτερη



Σχήμα 5.3. Επίδραση του siRNA της λουμικάνης στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό των Saos 2 (A) και MG-63 (B). Κύτταρα χωρίς εισαγωγή γενετικού τμήματος (M), siLum και siScr κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία και απουσία του TGF- β 2 (10 ng/ml) και

μέτρηση του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού. Σε κύτταρα χωρίς εισαγωγή γενετικού τμήματος χορηγήθηκε κερατανάση (M + Ker-ase) και μετρήθηκε ο κυτταρικός τους πολλαπλασιασμός. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές σε τριπλέτες. (Means +/- SEM plotted; n=5). ** αντιστοιχεί σε $p < 0.001$), συγκρινόμενο με κύτταρα στα οποία δεν χορηγήθηκε TGF- β 2; ^^^ αντιστοιχεί σε $p < 0.001$), μεταξύ siLum και siScr κυττάρων.

ανάπτυξη σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, καταδεικνύοντας έτσι τη συμμετοχή της λουμικάνης στη σηματοδότηση του TGF- β 2. Η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τη λουμικάνη είναι ανεξάρτητη από τον TGF- β 2 διότι προκάλεσε παρόμοια αναστολή αμφοτέρων των siLum και siScr Saos 2 κυττάρων. Με στόχο να εξεταστεί η πιθανή συμμετοχή των αλυσίδων της KS στη ανάπτυξη των κυττάρων του οστεοσαρκώματος χορηγήθηκε κερατανάση στα Saos 2 και MG-63 κύτταρα και μετρήθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός τους (Σχήμα 5.3A και B).

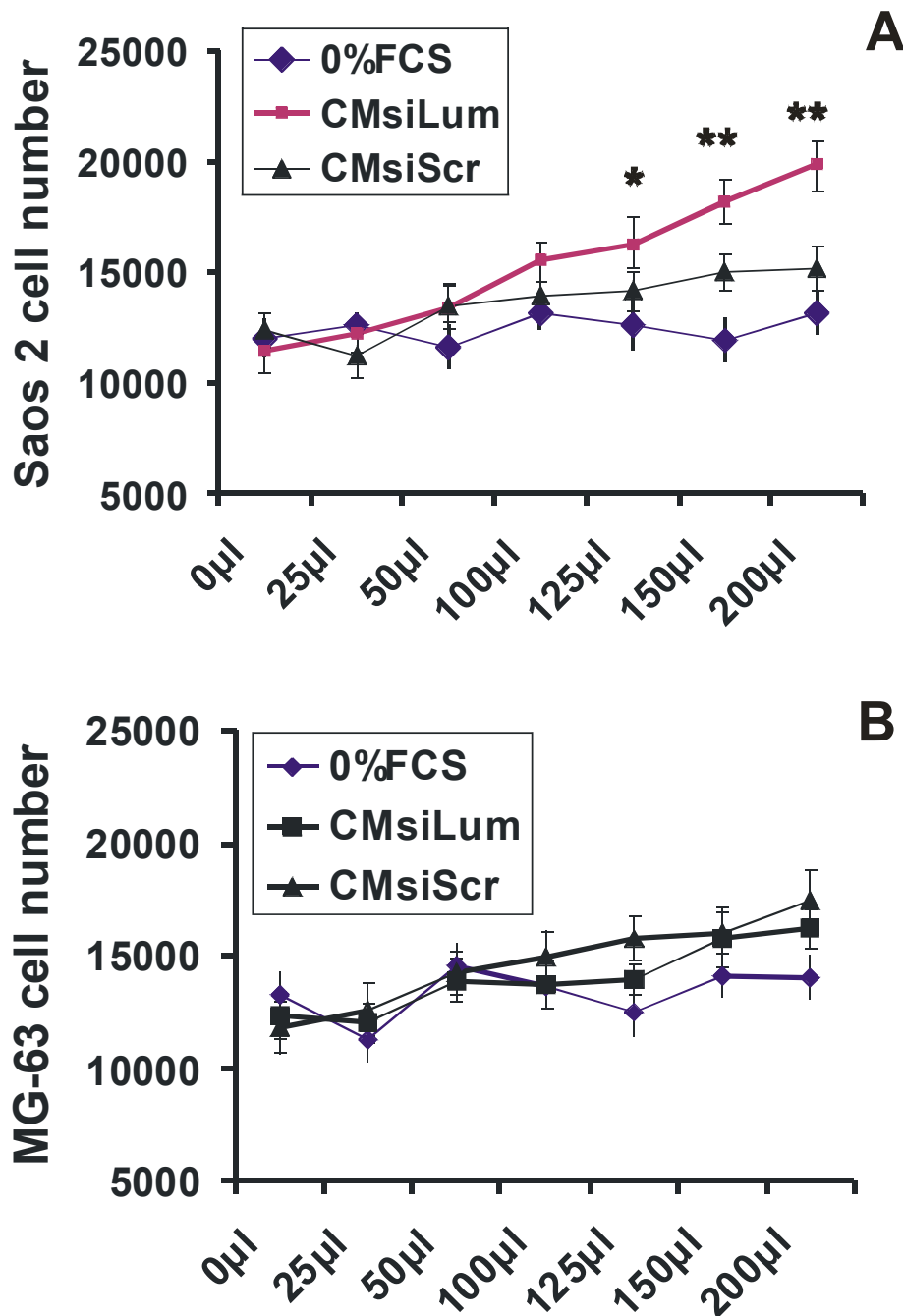
Η χορήγηση της κερατανάσης δεν επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη αμφοτέρων των κυτταρικών σειρών, υποδηλώνοντας ότι η λουμικάνη δεν δρά μέσω των αλυσίδων KS στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του οστεοσαρκώματος (Σχήμα 5.3A και B). Για να επιβεβαιώσουμε την επίδραση που παρατηρήσαμε, της μειωμένης έκκρισης της πρωτεΐνης λουμικάνης στα Saos 2 κύτταρα, χορηγήσαμε στα κύτταρα αυτά υλικό καλλιέργειας που είχαμε μαζέψει από siLum και siScr κύτταρα. (Σχήμα 5.4A και B). Τα Saos 2 κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε θρεπτικό υλικό από siScr κυτταροκαλλιέργειες είχαν μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης συγκρινόμενο με τα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε θρεπτικό υλικό που συλλέχθηκε από siLum κυτταροκαλλιέργειες, δείχνοντας ότι η εκκρινόμενη λουμικάνη αναστέλλει την ανάπτυξή τους.

5.4 Μελέτη της επίδρασης της αναστολής της λουμικάνης στη σηματοδότηση των Smad

Η Smad 2, σε σχέση με τις άλλες Smad, ενεργοποιείται περισσότερο από τον υποδοχέα του TGF- β 2 στα Saos 2 κύτταρα (Yu *et al*, 2004). Έτσι μελετήσαμε το πώς η αναστολή στην έκφραση της λουμικάνης επηρεάζει τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της Smad 2. Ειδικά αντί-Smad και αντί-φωσφο- Smad 2 αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν για να προσδιορίσουν τα επίπεδα έκφρασης της Smad 2 καθώς και τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της. Η ολική ποσότητα των πρωτεϊνών προσδιορίστηκε έναντι της ακτίνης. Η ανάλυση κατά Western έδειξε ότι τα επίπεδα

Αποτελέσματα

έκφρασης της πρωτεΐνης Smad 2 (ειδική 65 kDa ζώνη) δεν επηρεάστηκαν με την αναστολή της λουμικάνης (Σχήμα 5.5A). Είναι αξιοσημείωτο ότι τα βασικά επίπεδα



Σχήμα 5.4. Επίδραση του θρεπτικού προκαλλιέργειας που συλλέχθηκε μετά από χορήγηση siRNA της λουμικάνης ή του scramble siRNA (το υλικό προκαλλιέργειας του siLum είναι ελλειπές σε λουμικάνη συγκρινόμενο με το υλικό προκαλλιέργειας του scramble siRNA) στον πολλαπλασιασμό των Saos 2 (A) και MG-63 (B) κυττάρων. Στα Saos 2 και MG-63 κύτταρα έγινε αγωγή με αυξανόμενες ποσότητες υλικού προκαλλιέργειας (0-200 μl) στη διάρκεια 48 ωρών, και μετρήθηκε ο κυτταρικός τους πολλαπλασιασμός. Τα αποτελέσματα δείχνουν τη γραμμική εξάρτηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στη

Αποτελέσματα

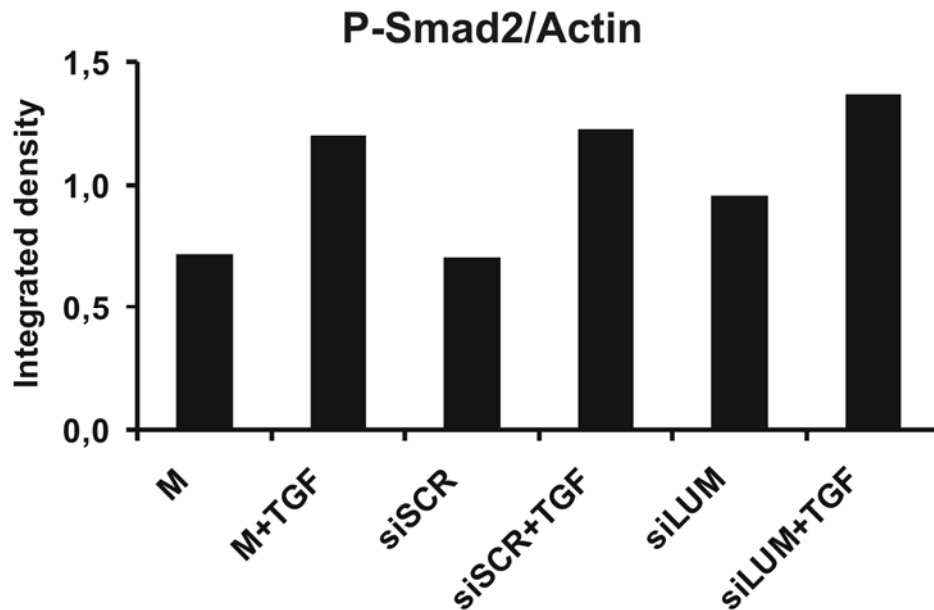
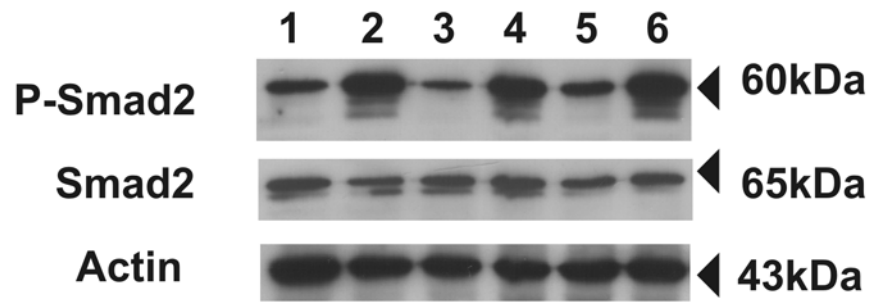
ποσότητα του επαγόμενου υλικού προκαλλιέργειας. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές σε τριπλέτες. (Means +/- SEM plotted; n=9). ** αντιστοιχεί σε $p < 0.001$), μεταξύ των αντιστοιχών δύο αγωγών.

φωσφοριλίωσης της Smad 2 (ειδική 60 kDa ζώνη) ήταν υψηλότερα στα siLum σε σχέση με τα siScr Saos 2 κύτταρα (Σχήμα 5.5A), γεγονός που εισηγείται ότι ο μηχανισμός δράσης της λουμικάνης στη ανάπτυξη των Saos 2 κυττάρων χρησιμοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης των Smad. Αντίθετα, ο εξωγενώς προστιθέμενος TGF- β 2 ενέτεινε την φωσφορυλίωση της Smad 2 σε παρόμοιο βαθμό σε αμφοτέρα τα κύτταρα έλεγχου και τα κύτταρα ελλειπή σε λουμικάνη (Σχήμα 5.5A). Πυκνομετρική ανάλυση των αντίστοιχων ζωνών παρουσιάζονται στο Σχήμα 5B. Οι ποσότητες των πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν έναντι της ακτίνης. Επίσης, εξετάστηκε ο πιθανός ρόλος του TGF- β 2 στη ρύθμιση της σύνθεσης της λουμικάνης. Η εξέταση με Real-time PCR έδειξε ότι ο TGF- β 2 προκάλεσε μέτρια μείωση των επιπέδων του mRNA (Σχήμα 5.6).

5.5 Μελέτη της επίδρασης της αναστολής της λουμικάνης στη έκφραση του p21WAF-1

Για την εξέταση της έκφρασης του p21WAF-1 καλλιεργήθηκαν τα κύτταρα του οστεοσαρκώματος σε συνθήκες απουσίας ορού και μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA του p21WAF-1 μετά από 48 ώρες. Έκφραση mRNA του p21WAF-1 παρατηρήθηκε σε αμφοτέρα τα Saos 2 και MG-63 κύτταρα και αυξήθηκε σε συνθήκες απουσίας ορού. Τα Saos 2 siLum κύτταρα είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα mRNA του p21WAF-1 σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου Saos 2 siScr (Σχήμα 5.7A). Δεν παρατηρηθήκαν αλλαγές των επιπέδων mRNA του p21WAF-1 στα MG-63 κύτταρα. Επειδή τα βασικά επίπεδα της πρωτεΐνης p21WAF-1 ήταν πολύ χαμηλά στα κύτταρα αυτά (Hanaoka *et al*, 2000), χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που υπερεκφράζουν το p21WAF-1 σαν κύτταρα θετικού ελέγχου. Μόνο τα κύτταρα ελέγχου έδειξαν τη αναμενόμενη 21 kDa ζώνη (Σχήμα 5.7B). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η παρατηρούμενη μείωση του mRNA του p21WAF-1 στα Saos 2 siLum κύτταρα δεν μεταφράστηκε σε μείωση έκφρασης της πρωτεΐνης p21WAF-1.

Αποτελέσματα



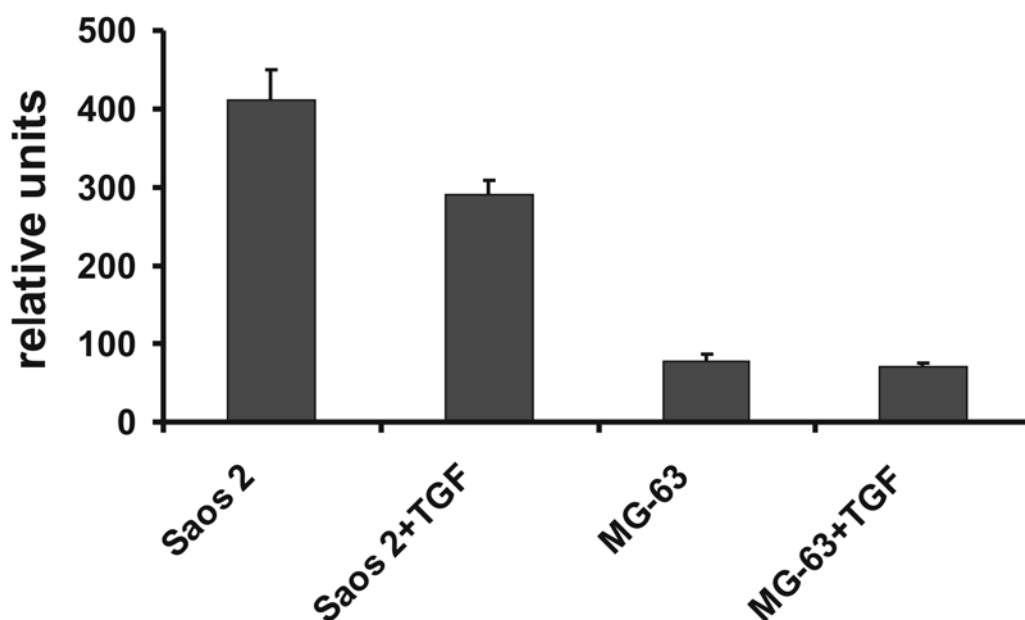
Σχήμα 5.5. Ανάλυση των επιπέδων φωσφορυλίωσης του Smad 2 στα Saos 2 κύτταρα (A). Τα πρωτεϊνικό περιεχόμενο του Smad 2, (P-Smad 2) και ακτίνης εξετάστηκαν με την ανάλυση κατά Western. (B) Η ημιποσοτικοποίηση των ζωνών και υπολογισμός του λόγου.P-Smad 2/ακτίνη. (1), κύτταρα ελέγχου ; (2) κύτταρα ελέγχου στα οποία χορηγήθηκε ο TGF-β2; (3) κύτταρα siScr ; (4) κύτταρα siScr στα οποία χορηγήθηκε ο TGF-β2; (5) siLum κύτταρα; (6) siLum κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε ο TGF-β2. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές σε τριπλέτες. Παρουσιάζετε μια αντιπροσωπευτική ανοσοαποτύπωση.

5.6 Μελέτη της επίδρασης siRNA της λουμικάνης στη κυτταρική μετανάστευση και χημειοταξία

Έχει αναφερθεί ότι η λουμικάνη επηρεάζει την κυτταρική κινητικότητα μέσω της αλληλεπίδρασης της ECM και των κυττάρων (Kao, 2006; Saika *et al*, 2006). Για το λόγο αυτό, εξετάσαμε την επίδραση που έχει η παραγόμενη από τα κύτταρα

Αποτελέσματα

λουμικάνη στη κυτταρική μετανάστευση των Saos 2 και MG-63 κυττάρων, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο δοκιμής της κυτταρικής κινητικότητας (wound scratch assay). Τα κύτταρα στρώθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια αναιρέθηκαν κύτταρα (δημιουργήθηκε πληγή) με ρύγχος των 10 μ l και παρακολούθηθηκε η ικανότητα των κυττάρων να κλείσουν τη πληγή. Η κυτταρική κινητικότητα μετρήθηκε αναλύοντας την εικόνα σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Τα Saos 2 κύτταρα, στα οποία χορηγήθηκε το siRNA της λουμικάνης, έκλεισαν το 21% της πληγής ενώ τα κύτταρα ελέγχου έκλεισαν το 48% αντίστοιχα μετά από 12 ώρες, δείχνοντας ότι η λουμικάνη βοηθάει τη μετανάστευση αυτών των κυττάρων (Σχήμα 5.8A και C). Αντίθετα, τα MG-63 κύτταρα μετανάστευαν με την ίδια αποτελεσματικότητα παρουσία και απουσία της siRNA της λουμικάνης,

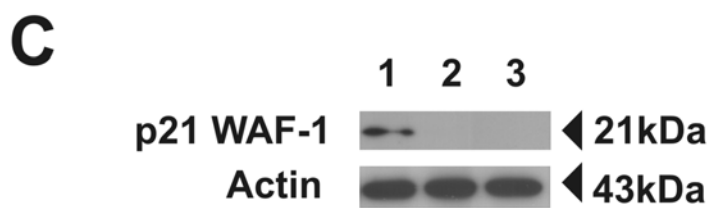
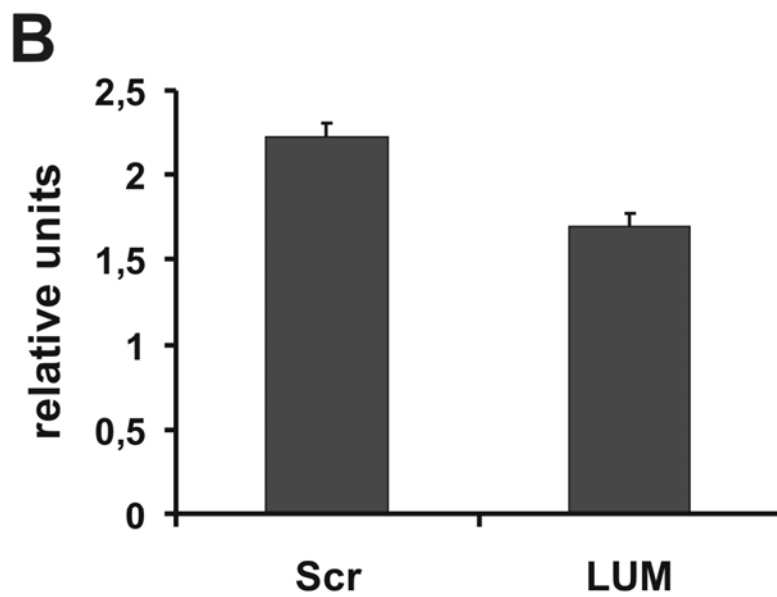
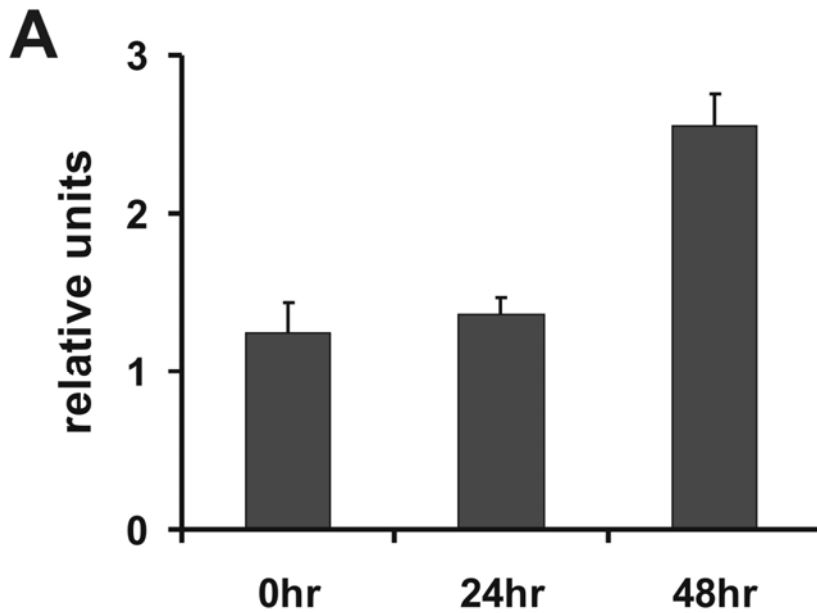


Σχήμα 5.6. Επίδραση του TGF- β 2 στη mRNA έκφραση της λουμικάνης. Στα Saos 2 και MG-63 χορηγήθηκε ο TGF- β 2 (10 ng/ml) για 48 ώρες και τα επίπεδα του mRNA της λουμικάνης μετρήθηκαν με την real-time PCR και έγινε κανονικοποίηση κανονίστηκαν με το γονίδιο της GAPDH. Τα αποτελέσματα δείχνουν το μέσο όρο τριών πειραμάτων σε τριπλέτες. (Means \pm SEM plotted; n=9).

υποδηλώνοντας ότι η λουμικάμη δεν επηρεάζει την ικανότητά τους για μετανάστευση (Σχήμα 5.8B). Η χημειοτακτική κινητικότητα των κυτταρικών σειρών αυτών εξετάστηκε με τη μέθοδο δοκιμής της χημειοταξίας (Chemicon, Millipore, USA). Στο

Αποτελέσματα

πάνω μέρος της μεμβράνης ενός πιάτου καλλιέργειας με 96 οπές τοποθετήθηκαν κύτταρα, ενώ στο κάτω μέρος



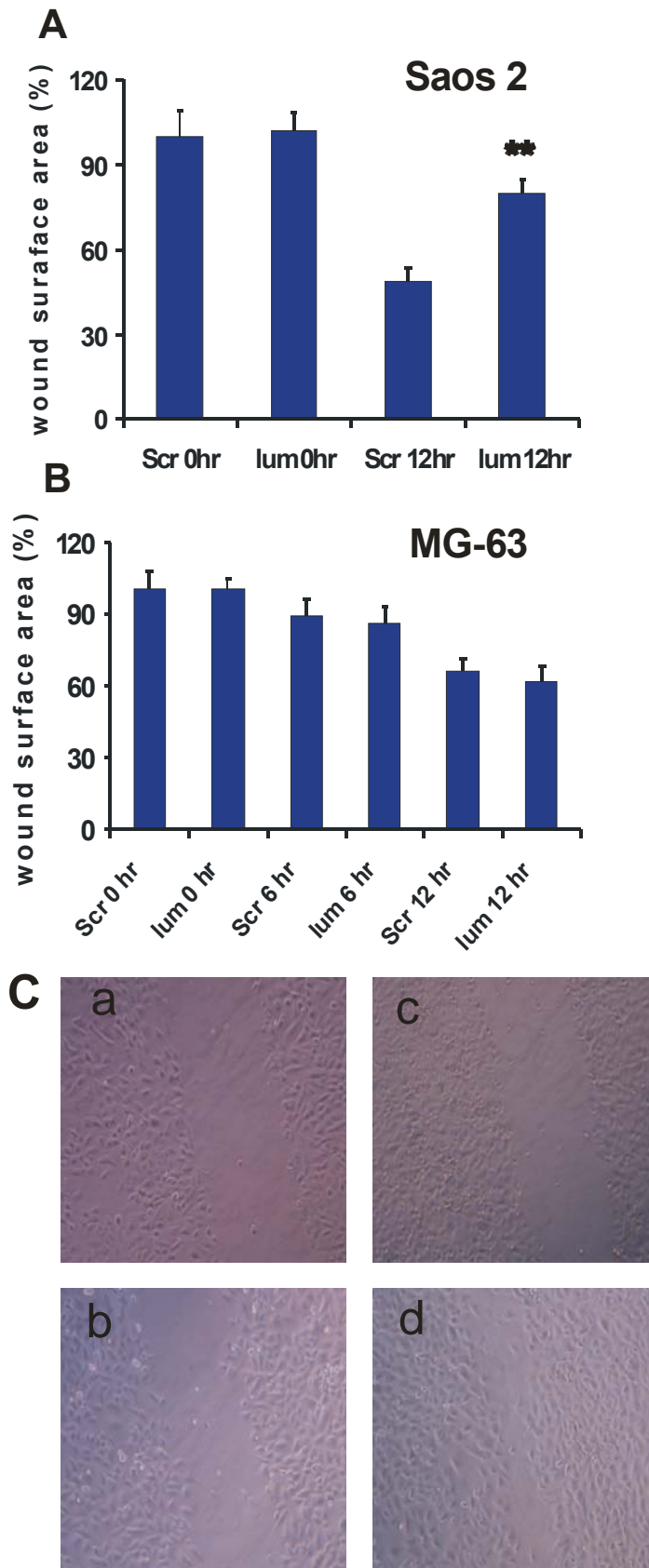
Σχήμα 5.7. Επίδραση της αναστολής της λουμικάνης στην έκφραση του p21WAF-1. (A) Τα Saos 2 κύτταρα καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε συνθήκες απουσίας ορού για 24 και 48 ώρες. (B) Ανάλυση της έκφρασης του p21WAF-1 μετά από 48 ώρες σε Saos 2 κύτταρα που χορηγήθηκε το siLum και το siScr (C) Ανάλυση κατά Western της έκφρασης p21WAF-1 πρωτεΐνης με το ειδικό αντίσωμα για p21WAF-1 στα κύτταρα που υπερέκφραζουν p21WAF-1 (λωρίδα 1), κύτταρα που χορηγήθηκε siScr (λωρίδα 2) και κύτταρα που χορηγήθηκε siLum (λωρίδα 3). Παρουσιάζεται μια αντιπροσωπευτική ανοσοαποτύπωση. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές σε τριπλέτες. (Means +/- SEM plotted; n=9). ** αντιστοιχεί σε $p < 0.001$), μεταξύ διαφορετικών χρονικών στιγμών; * αντιστοιχεί σε $p < 0.05$ μεταξύ κυττάρων που χορηγήθηκε siScr ή siLum.

χρησιμοποιήθηκε σαν χημειοτακτική ουσία η ινονεκτίνη (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η αγωγή του siRNA της λουμικάνης στα MG-63 κύτταρα δεν επηρέασε τη χημειοτακτική τους ικανότητα, ενώ η έλλειψη της λουμικάνης στα Saos 2 κύτταρα ανέστειλλε την χημειοταξία τους έως και 30% σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε siRNA έλεγχου για 24 ώρες (Σχήμα 9).

5.7 Συμπεράσματα

Οι SLRP όπως είναι η διγλυκάνη, η διακοσμιτίνη, η φιμπρομοδουλίνη, η λουμικάνη και η οστεοαδχερίνη (Iozzo, 1997) είναι οι πιο άφθονες πρωτεογλυκάνες του οστεοειδούς. Η λουμικάνη έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στη ρύθμιση του σχηματισμού των ινών κολλαγόνου στο οστεοειδές (Raouf *et al*, 2002). Επίσης βρέθηκε σε πρόσφατη μελέτη, ότι η λουμικάνη είναι μία κυρία PG του ώριμου οστεοειδούς (Raouf *et al*, 2002).. Η έκφραση της λουμικάνης δεν ήταν γνωστή στο ανθρώπινο οστεοσάρκωμα μέχρι την ανάδειξή της από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Η έκφραση της λουμικάνης εξετάστηκε στα MG-63 κύτταρα που είναι μετρίως και στα Saos 2 που είναι καλώς διαφοροποιημένα κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος με υψηλή και χαμηλή μεταστατική ικανότητα, αντίστοιχα. Αυτές οι κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος εκφράζουν και εκκρίνουν την λουμικάνη μερικώς γλυκοζυλιωμένη με τις αλυσίδες θειικής κερατάνης. Είναι

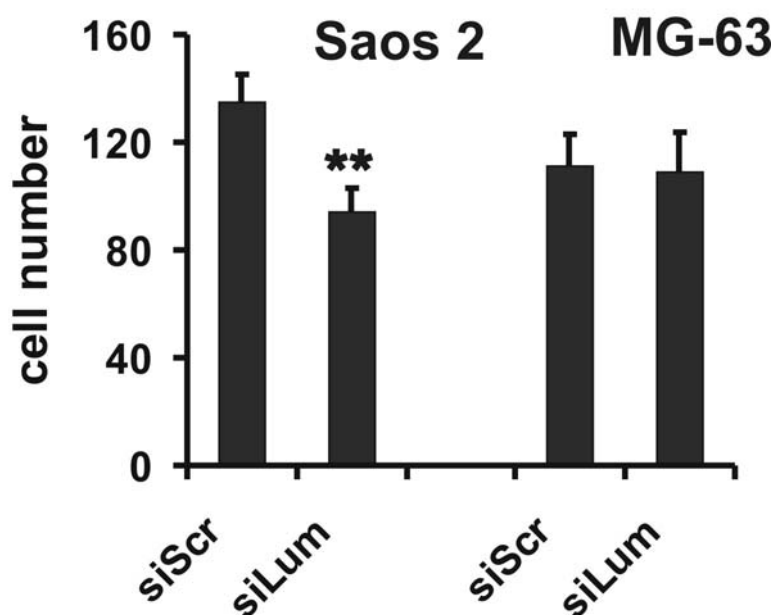


Σχήμα 5.8. Η επίδραση του siLum στη κυτταρική μετανάστευση. Σε κύτταρα Saos 2 (A) και MG-63 (B) έγινε εισαγωγή του siRNA της λουμικάνης (siLum) και του scramble siRNA (siScr) και στη συνέχεια αναιρέθηκαν κύτταρα (δημιουργήθηκε πληγή) με ρύγχος των 10 μ l.

Αποτελέσματα

Η επιφάνεια της πληγής μετρήθηκε αναλύοντας την εικόνα σε 0, 6, 12 και 24 ώρες. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές σε τριπλέτες. (Means +/- SEM plotted; n=9). ** αντιστοιχεί σε $p < 0.001$) μεταξύ κυττάρων που χορηγήθηκε το siScr ή το siLum. (C) Τα Saos 2 κύτταρα με siLum στις 0 ώρες (a) 12 ώρες (b) και τα Saos 2 κύτταρα με siScr στις 0 ώρες (c) και 12 ώρες (d).

ενδιαφέρον ότι τα μη μεταστατικά καλώς διαφοροποιημένα Saos 2 κύτταρα παρήγαγαν λουμικάνη επτά φορές περισσότερη συγκρινόμενη με εκείνη που παρήγαγαν τα υψηλής μεταστατικής ικανότητας κύτταρα της MG-63 σειράς. Η χρησιμοποίηση ειδικού siRNA για το γονίδιο της λουμικάνης κατέστειλλε τα επίπεδα mRNA και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η ανάπτυξη των Saos 2 κυττάρων ανεστάλλει, ενώ η μετανάστευση και η χημειοτακτική απάντηση στην ινονεκτίνη αυξήθηκε από την λουμικάνη. Η έκφραση της λουμικάνης είχε αρνητική συσχέτιση με το βασικό επίπεδο της Smad 2 ενεργοποίησης. Από την άλλη μεριά, αυτές οι



Σχήμα 5.9. Επίδραση του siLum στη χημειοταξία. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την εισαγωγή των siRNA, τα Saos 2 siLum και τα MG-63 siLum κύτταρα συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν (5×10^4 κύτταρα) στο πάνω μέρος της μεμβράνης (5 μ M) ενός πιάτου καλλιέργειας με 96 οπές. Τα MG-63 και Saos 2 κύτταρα μετρήθηκαν με φλουορόμετρο μετά από 24 ώρες, ενώ στο κάτω μέρος της μεμβράνης χρησιμοποιήθηκε σαν χημειοτακτική ουσία η ινονεκτίνη (10 μ g / ml). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές σε τριπλέτες. (Means +/- SEM plotted; n=9). ** αντιστοιχεί σε $p < 0.01$) μεταξύ κυττάρων που χορηγήθηκε το siScr ή το siLum.

κυτταρικές λειτουργίες στα υψηλής επιθετικότητας MG-63 κύτταρα δεν ήταν ευαίσθητες στην καταστολή των ενδογενώς παραγόμενων χαμηλών επιπέδων λουμικάνης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η έκφραση της λουμικάνης μπορεί να σχετίζεται θετικά με την διαφοροποίηση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος και αρνητικά με την εξέλιξη τους (Raouf *et al*, 2002).

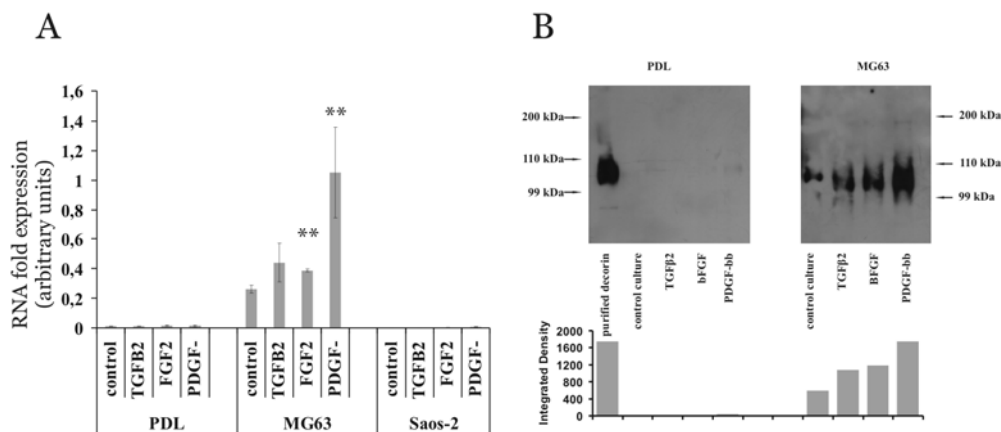
6.0 Η διακοσμιτίνη αποτρέπει την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων του οστεοσαρκώματος με την διατηρημένη σύνθεση και ενεργοποίηση των EGFR

6.1 Στόχος

Η διακοσμιτίνη είναι μια καλά μελετημένη μικρή, πλούσια σε λευκίνη πρωτεογλυκάνη για την οποία έχει αναφερθεί ότι έχει ανασταλτική δράση στο πολλαπλασιασμό διαφόρων κυτταρικών σειρών. Η διακοσμιτίνη επιδρά μέσα από το μονοπάτι του EGFR προκαλώντας απόπτωση / αναστολή της ανάπτυξης (Moscatello *et al.*, 1998). Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξετασθεί η ρύθμιση της σύνθεσης της διακοσμιτίνης μετά από χορήγηση TGF- β 2, PDGF-BB και bFGF στις MG-63 και Saos 2 κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος και στους ανθρώπινους φυσιολογικούς οστεοβλάστες (hPDL). Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της διακοσμιτίνης στην ανάπτυξη των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

6.2 Τα MG-63 κύτταρα παράγουν σημαντικά ποσά της διακοσμιτίνης

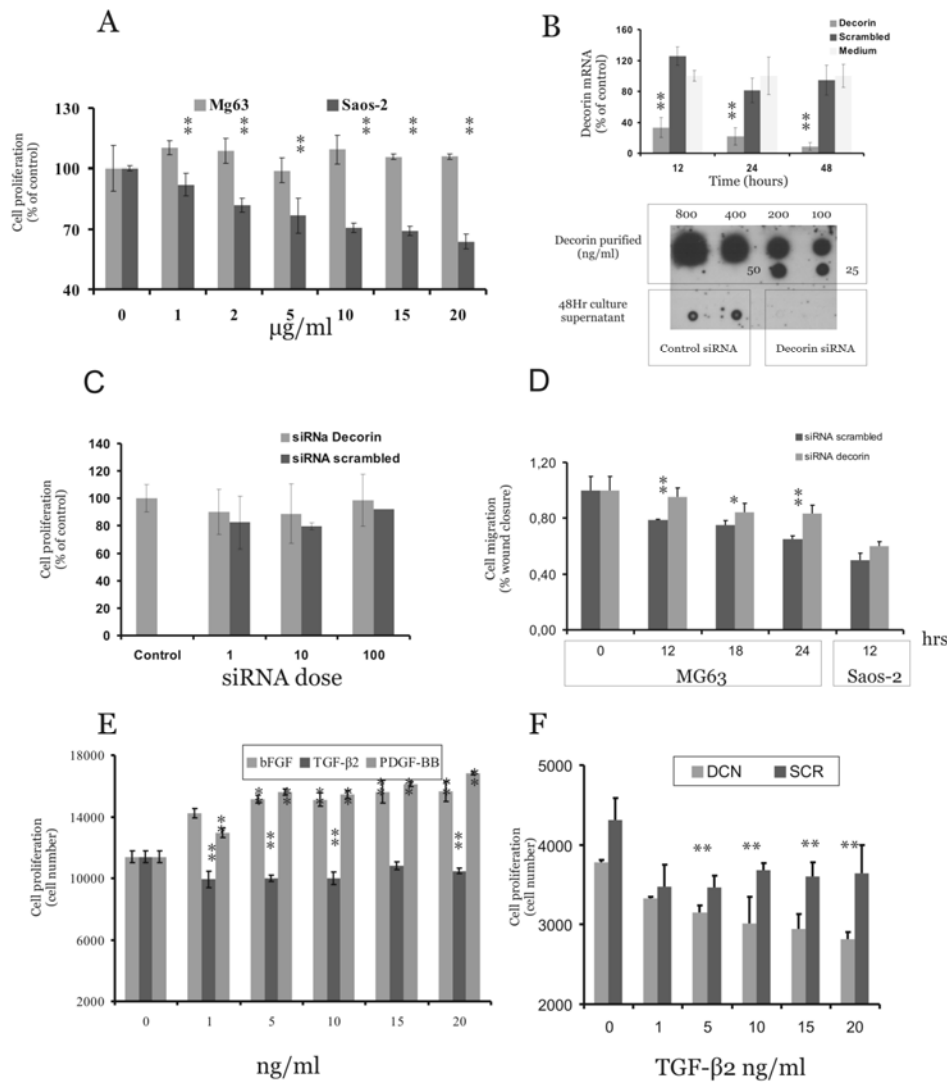
Ο στόχος μας στη πρώτη φάση ήταν να αναλύσουμε την έκφραση της διακοσμιτίνης στα ανθρώπινα κύτταρα της οστεοβλαστικής προέλευσης. Σημαντικά ποσά του mRNA της διακοσμιτίνης βρέθηκαν στα MG-63 κύτταρα ενώ στα Saos 2 και hPDL κύτταρα ήταν απόντα (Σχήμα 6.1a). Η ανάλυση του συγκεντρωμένου υλικού των κυτταροκαλλιιεργειών με την ανοσοαποτύπωση έδειξε την έκκριση της γλυκοζυλιομένης διακοσμιτίνης (Σχήμα 6.1b). Μια προηγούμενη μελέτη των



Σχήμα 6.1. Έκφραση του mRNA (A) και της πρωτεΐνης της διακοσμιτίνης (B) στα Saos 2, MG-63 και hPDL κύτταρα. Χορήγηση των TGF-β2, PDGF-BB και bFGF για 48 ώρες και μέτρηση του mRNA της διακοσμιτίνης με Real-time PCR (σε τριπλές). Η πρωτεΐνη της διακοσμιτίνης προσδιορίστηκε με Western ανάλυση, χρησιμοποιώντας το 6B6 αντίσωμα. Η πυκνότητα των ζωνών μετρήθηκε και παρουσιάζεται στη γραφική παράσταση. (Means +/- SEM plotted; n=9). * αντιστοιχεί σε $p < 0.01$, **

MG-63 κυττάρων έδειξε τη παρουσία mRNA της διακοσμιτίνης αλλά αδυνατούσε να εντοπίσει την εκκρινόμενη διακοσμιτίνη, ενώ άλλες μελέτες έδειξαν και τη εκκρινόμενη διακοσμιτίνη (Takeuchi *et al.*, 1994; Hausser *et al.*, 1993).

6.3 Οι TGF-β2, PDGF-BB και bFGF εντείνουν σημαντικά τη μεταγραφή του γονιδίου της διακοσμιτίνης και την έκκρισή της στη ECM των MG-63 κυττάρων
Έχει αναφερθεί ότι οι TGF-β2, PDGF-BB και bFGF αυξητικοί παράγοντες συμμετέχουν στη ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος (Franchi *et al.*, 1989; Schedlich *et al.*, 1994; Rodan *et al.* 1989). Οι επιδράσεις αυτών των αυξητικών παραγόντων στη βιοσύνθεση της διακοσμιτίνης τόσο στο επίπεδο του mRNA όσο και στο επίπεδο της πρωτεΐνης εξετάστηκε in vitro σε συνθήκες στέρησης ορού.



Σχήμα 6.2. (A) Μέτρηση των επιδράσεων της διακοσμιτίνης στην ανάπτυξη των MG-63 και Saos 2 κυττάρων. Η μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έγινε μετά από 48 ώρες με φλουρόμετρο. Πραγματοποιήθηκε χορήγηση TGFβ2, bFGF, PDGF-BB (10 ng/ml) και της διακοσμιτίνης (20 μg / ml) στα MG-63 και Saos 2 κύτταρα για 48 ώρες (Means +/- SEM plotted; n=3). ** αντιστοιχεί σε p<0.001.n=3). (B) Μετά από την εισαγωγή είτε της διακοσμιτίνης (siDec) είτε του scramble siRNA στα MG-63 και Saos 2 κύτταρα, η αναστολή της έκφρασης της διακοσμιτίνης επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο real-time PCR και παρουσιάζεται σαν ποσοστό της έκφρασης των κυττάρων ελέγχου στις 12, 24 και 48 ώρες. (Means +/- SEM plotted; n=3). (C) Η επίδραση του siDec στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των MG-63 και Saos 2 κυττάρων. Έγινε εισαγωγή αυξανόμενων ποσοτήτων του siDec ή του siScr και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MG-63 και Saos 2 κυττάρων μετρήθηκε με φλουρόμετρο. Means +/- SEM plotted; n=3). (D) Η επίδραση του siDec στη κυτταρική μετανάστευση. Στα MG-63 και Saos 2 κύτταρα έγινε εισαγωγή του siDec και siScr και στη συνέχεια αναιρέθηκαν κύτταρα (δημιουργήθηκε πληγή) με ρύγχος των 10 μl και η επιφάνεια

Αποτελέσματα

της πηλγής μετρήθηκε αναλύοντας την εικόνα σε 0, 6 και 12 ώρες. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές σε τριπλετές. (Means +/- SEM plotted; n=9). ** αντιστοιχεί σε $p < 0.001$) μεταξύ των κυττάρων που χορηγήθηκε το siScr ή το siDec. (E) Στα MG-63 κύτταρα σε συνθήκες στέρησης ορού χορηγήθηκαν αυξανόμενες ποσότητες των TGF β 2, bFGF και PDGF-BB και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μετρήθηκε με φλουρόμετρο. (F) Ανάλυση της ανάπτυξης των MG-63 κυττάρων μετά την εισαγωγή του SiDec (DEC) ή του siScr (SCR) (Means +/- SEM plotted; n=3). ** αντιστοιχεί σε $p < 0.01$

Βρέθηκε σημαντική αύξηση τόσο στο επίπεδο του mRNA όσο στο επίπεδο της πρωτεΐνης. Ο PDGF-BB προκάλεσε την πιο μεγάλη αύξηση (τρεις φορές) και ακολούθησε ο TGF- β 2 και ο bFGF (Σχήμα 1a και b). Η χορήγηση αυτών των αυξητικών παραγόντων δεν επηρέασε την έκφραση της διακοσμιτίνης στα Saos 2 και τα hPDL κύτταρα.

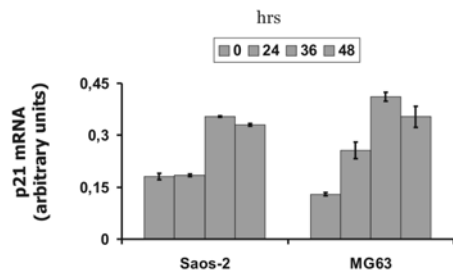
6.4 Τα MG-63 κύτταρα δεν είναι ευαίσθητα στην αναστολή της ανάπτυξής τους μέσω της διακοσμιτίνης σε αντίθεση με τα Saos 2 κύτταρα

Η διακοσμιτίνη είναι ένα καλά μελετημένο μακρομόριο που έχει κυττοστατικές ιδιότητες έναντι πολλών κυτταρικών σειρών τόσο in vivo όσο και in vitro (Takeuchi *et al.*, 1994; Hausser *et al.*, 1993; Santra *et al.*, 1995; Santra *et al.*, 1997). Με σκοπό την εξέταση του ρόλου της διακοσμιτίνης στα MG-63 κύτταρα, αναλύσαμε τη δράση τόσο της αυξημένης παρουσίας της διακοσμιτίνης (εξωγενής χορήγηση) όσο και την έλλειψη της διακοσμιτίνης (αναστολή της ενδογενούς παραγωγής μέσω του siRNA). Τα αποτελέσματα της εξωγενούς χορήγησης της διακοσμιτίνης έδειξαν ότι δεν επηρεάστηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MG-63 κυττάρων ακόμη και στη πιο υψηλή συγκέντρωση (100 μ g / ml). Αντίθετα, η διακοσμιτίνη προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των Saos 2 κύτταρων (Σχήμα 6.2), η οποία συμφωνεί με τα αποτελέσματα μιας προηγούμενης μελέτης (Santra *et al.*, 1995; Santra *et al.*, 1997).

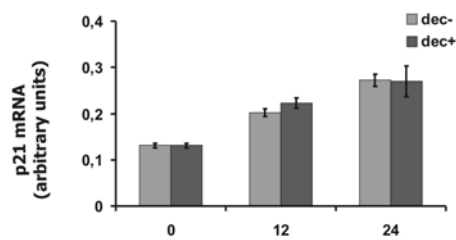
6.5 Η αναστολή της έκφρασης της διακοσμιτίνης δεν επηρέασε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά μείωσε την κυτταρική κινητικότητα.

Για να μελετηθούν οι πιθανοί ρόλοι της διακοσμιτίνης στα MG-63 κύτταρα, έγινε εισαγωγή του γενετικού υλικού με siRNA ειδικό για το γονίδιο της διακοσμιτίνης στα κύτταρα. Η αναστολή των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου επιβεβαιώθηκε με τη

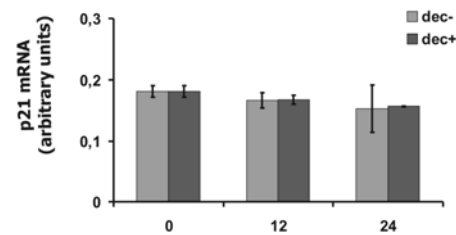
A



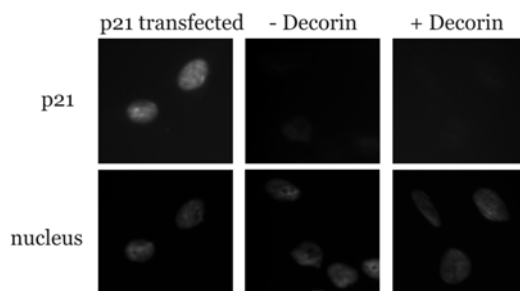
B



C



D



Σχήμα 6.3. Ανάλυση της mRNA έκφρασης του p21WAF-1. (A) Τα MG-63 και τα Saos 2 κύτταρα καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε συνθήκες στέρησης ορού για 48 ώρες και το mRNA του p21WAF-1 μετρήθηκε στις 12 και 24 ώρες με την μέθοδο real-time PCR. (B) Ανάλυση της έκφρασης του p21WAF-1 στα MG-63 (B) και στα Saos 2 (C) κύτταρα μετά από *in vitro* χορήγηση της διακοσμιτίνης (20 $\mu\text{g} / \text{ml}$). (Means \pm SEM plotted; n=3). (D) Τα MG-63 κύτταρα εξετάστηκαν για την έκφραση της πρωτεΐνης της διακοσμιτίνης με confocal

microscopy μετά από χορήγηση της διακοσμιτίνης χρησιμοποιώντας κύτταρα που υπερεκφράζουν τη διακοσμιτίνη σαν δείγμα θετικού ελέγχου.

μέθοδο του Real-time PCR (Σχήμα 6.2b). Χορήγηση του siDec είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης της διακοσμιτίνης, που έφτανε το 80% στις 24 ώρες και το 90% στις 48 ώρες συγκρινόμενη με εκείνη των κυττάρων ελέγχου. Η αναστολή των επιπέδων των μεταγράφων της διακοσμιτίνης με αυξανόμενες ποσότητες του siDec δεν επηρέασε σημαντικά το κυτταρικό πολλαπλασιασμό των MG-63 κυττάρων (Σχήμα 6.2c).

Η διακοσμιτίνη έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει την κυτταρική κινητικότητα (Merle *et al.*, 1999). Επομένως, ήταν δικαιολογημένο το ενδιαφέρον μας να μελετήσουμε την επίδραση της ενδογενώς παραγόμενης διακοσμιτίνης στη κυτταρική κινητικότητα των MG-63 κυττάρων. Τα κύτταρα ελέγχου έκλεισαν το 30% της πληγής σε 24 ώρες, ενώ τα MG-63 κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε το siDec έδειξαν σημαντικά μειωμένη κινητικότητα (Σχήμα 6.2d). Τα Saos 2 κύτταρα που δεν εκφράζουν τη διακοσμιτίνη μετανάστευσαν με την ίδια ικανότητα τόσο σε απουσία όσο και σε παρουσία του siRNA που δείχνει ότι το siDec δεν προκαλεί μή ειδική αναστολή της κυτταρικής κινητικότητας.

6.6 Τα ενδογενή επίπεδα διακοσμιτίνης εμποδίζουν την κυτταροστατική επίδραση του TGF-β2

Στη συνέχεια μελετήσαμε αν η διακοσμιτίνη επηρεάζει τη δράση σημαντικών για την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος, αυξητικών παραγόντων (TGF-β2, PDGF-BB και bFGF). Αρχικά, εξετάστηκε η δόσοεξαρτώμενη δράση αυτών των αυξητικών παραγόντων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των **MG-63 κυττάρων**. Οι PDGF-BB και bFGF προκάλεσαν τη αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Σχήμα 6.2e). Ο TGF-β2 προκάλεσε μια μικρή μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, που φάνηκε στη χορήγηση 1 ng / ml αλλά παρέμεινε σταθερή και στις 20 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση. Η εξέταση της πιθανής εμπλοκής της διακοσμιτίνης στο μονοπάτι του TGF-β2 έγινε με ανάλυση της σηματοδότησης του TGF-β2 σε κύτταρα στα οποία είχε γίνει εισαγωγή του siRNA της διακοσμιτίνης ή του scramble siRNA. Τα MG-63 κύτταρα ελλειπή σε διακοσμιτίνη ήταν ευαίσθητα στη δόσοεξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από το TGF-β2 (Σχήμα 6.2f).

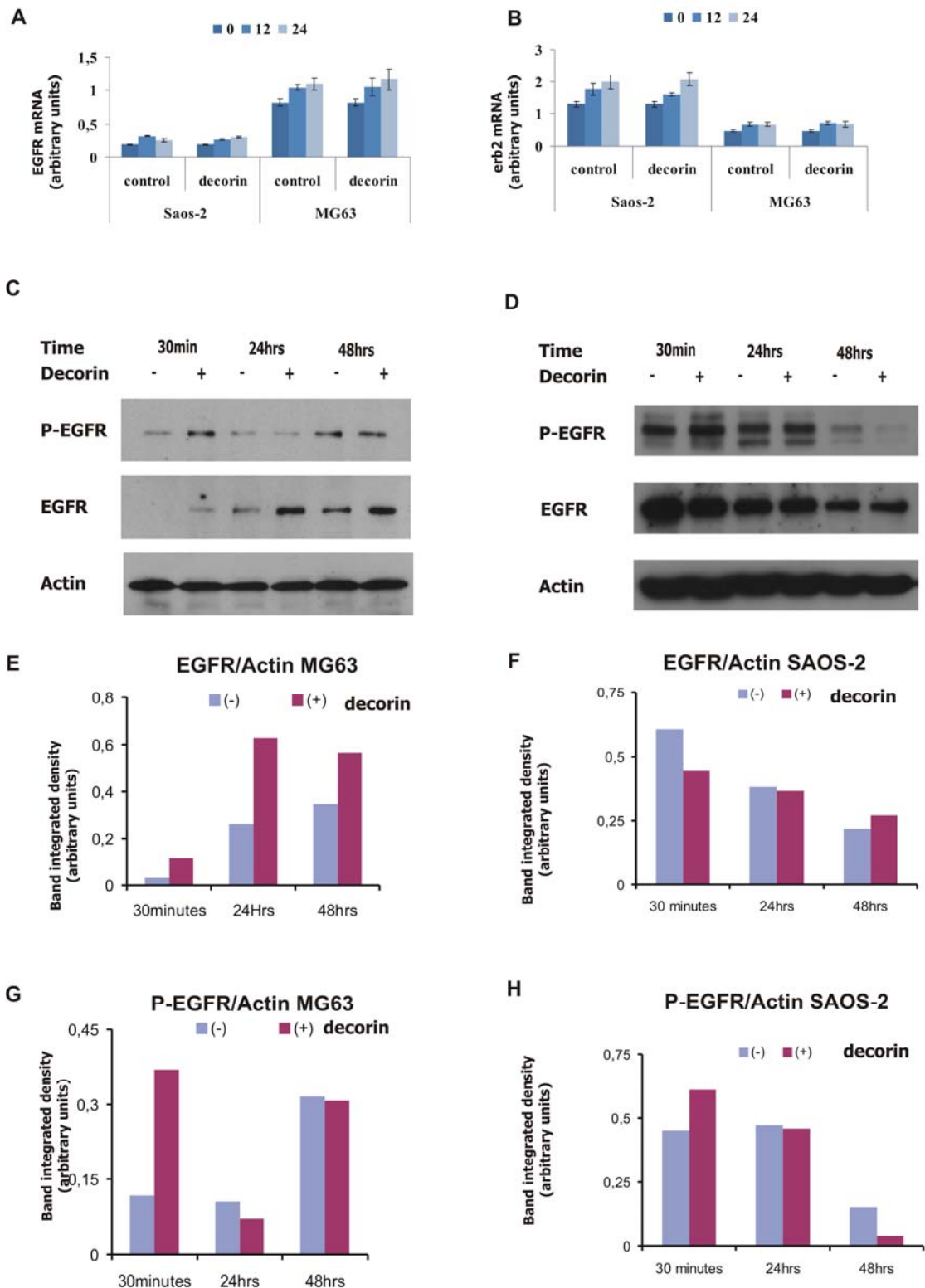
6.7 Η διακοσμιτίνη δεν προκαλεί τη μεταγραφική αύξηση του p21 στα MG-63 κύτταρα

Για την μελέτη της έκφρασης του p21WAF-1 χρησιμοποιήθηκαν συνθήκες απουσίας ορού, η οποία είναι γνωστό ότι προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων, και μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA του p21WAF-1 μετά από 48 ώρες με τη μέθοδο real-time PCR. Η έκφραση mRNA του p21WAF-1 υπήρχε σε αμφοτέρωτα τα Saos 2 και MG-63 κύτταρα και αυξήθηκε σε συνθήκες απουσίας ορού (Σχήμα 6.3a). Η εξωγενής χορήγηση της διακοσμιτίνης (20 – 1000 µg / ml) δεν αύξησε την έκφραση του p21WAF-1 σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου των MG-63 (Σχήμα 6.3b) και Saos 2 (Σχήμα 6.3c). Η απουσία της πρωτεΐνης p21WAF-1 επιβεβαιώθηκε με την εστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy) των MG-63 και Saos 2 κυττάρων η οποία συγκρίθηκε με την εικόνα των αντίστοιχων κυττάρων που υπερεκφράζουν τη p21WAF-1 (Σχήμα 6.3d). Έτσι συμπεραίνεται ότι η διακοσμιτίνη δεν αναστέλλει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της p21WAF-1.

6.8 Διατήρηση της σύνθεσης και φωσφορυλίωσης των EGFR στα MG-63 κύτταρα από την διακοσμιτίνη

Αμφοτέρωτα τα MG-63 και Saos 2 κύτταρα εκφράζουν τους EGFR ή τους Erb2 όπως καθορίστηκε με τη μέθοδο real-time PCR. Τα πρώτα εκφράζουν κυρίως τους EGFR (Σχήμα 6.4a), ενώ τα δευτέρα τους Erb2 (Σχήμα 6.4b). Η διακοσμιτίνη δεν άλλαξε σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης mRNA των υποδοχέων αυτών και στις δύο κυτταρικές σειρές. Αντίθετα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης των EGFR αυξήθηκαν μετά από τη χορήγηση της διακοσμιτίνης και έφτασαν τη μέγιστη έκφρασή τους στις 24 ώρες. Επίσης τα βασικά επίπεδα της έκφρασης των EGFR στα MG-63 κύτταρα σταδιακά αυξήθηκαν, πιθανόν μέσω της δράσης της συσσωρευμένης διακοσμιτίνης (Σχήμα 6.4c,e). Επιπρόσθετα, η διακοσμιτίνη προκάλεσε μια άμεση αύξηση της φωσφορυλίωσης (30 λεπτά) τους, η οποία στις 24 ώρες μειώθηκε και εμφανίστηκε ξανά στις 48 ώρες (Σχήμα 6.4c,f). Στα MG-63 κύτταρα στα οποία δεν χορηγήθηκε η

Αποτελέσματα



Σχήμα 6.4. Έκφραση και φωσφορυλίωση του EGFR. Η ανάλυση της mRNA έκφρασης του EGFR (A) και του erb2 (B) με real-time PCR στα MG-63 και Saos 2 κύτταρα. Η έκφραση του mRNA μετρήθηκε παρουσία ή απουσία της διακοσμιτίνης (20 μg / ml) μετά από 0, 12 και 24 ώρες χορήγησης. Για την ανάλυση της φωσφορυλίωσης του EGFR, στα MG-63 (C) και στα Saos 2 (D) κύτταρα χορηγήθηκε η διακοσμιτίνη. Τα κυτταρικά περιεχόμενα των

Αποτελέσματα

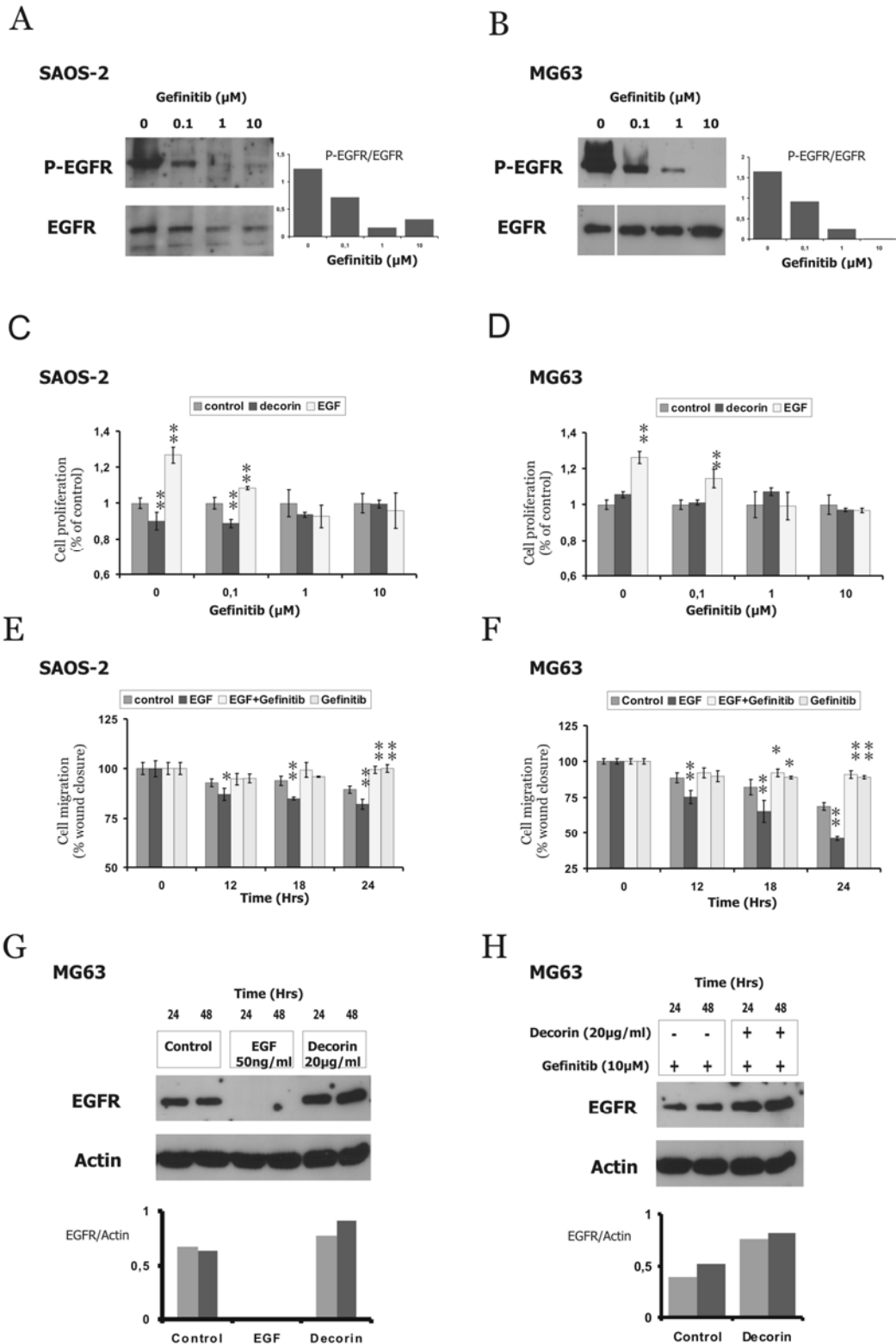
EGFR, των φωσφοριλιωμένων EGFR (phospho-EGFR) και της ακτίνης καθορίστηκαν με την ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η ποσοτικοποίηση των ζωνών έγινε με τη πυκνομετρική ανάλυση των εικόνων και υπολογίστηκαν και λογαριάστηκαν οι ακόλουθοι λόγοι EGFR/ ακτίνη (E,F), phospho-EGFR / ακτίνη (G,H) στα MG-63 και Saos 2 κύτταρα, αντίστοιχα.

διακοσμιτίνη, η φωσφορυλίωση των EGFR καθορίστηκε μόνο στις 48 ώρες, πιθανόν μέσω της δράσης της συσσωρευμένης ενδογενούς διακοσμιτίνης. Στα Saos 2 κύτταρα, που είναι ευαίσθητα στη δράση της διακοσμιτίνης, παρατηρήθηκε μια άμεση αύξηση της φωσφορυλίωσης (30 λεπτά μετά από τη χορήγηση της διακοσμιτίνης) και ακολούθησε ενσωμάτωση των φωσφοριλιωμένων υποδοχέων στις 24 και 48 ώρες (Σχήμα 6.4d,g). Είναι γνωστό ότι η προκαλούμενη από τη διακοσμιτίνη μείωση της έκφρασης και της σηματοδότησης του EGFR είναι υπεύθυνη για την ανασταλτική της δράση στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η διατηρημένη έκφραση και φωσφορυλίωση των EGFR σχετίζεται με μη ανταπόκριση των MG-63 κυττάρων στη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που προκαλείται από τη διακοσμιτίνη.

6.9 Επίδραση της διακοσμιτίνης στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των κυττάρων οστεοσαρκώματος, συσχετίσή της με ενεργοποίηση του EGFR

Η διακοσμιτίνη και ο EGF μεταφέρουν σήματα χρησιμοποιώντας τα μονοπάτια του EGFR. Για την μελέτη της λειτουργικής σχέσης της διακοσμιτίνης με τους EGFR χρησιμοποιήθηκε το gefinitib, ένας ειδικός αναστολέας της φωσφορυλίωσης των EGFR. Το gefinitib πράγματι προκάλεσε μια δόσοεξαρτώμενη αναστολή της φωσφορυλίωσης των EGFR και στις δύο κυτταρικές σειρές (Σχήμα 6.5a,

Αποτελέσματα



Σχήμα 6.5. Δράση του EGF και της διακοσμιτίνης στα MG-63 και Saos 2 κύτταρα. Στα Saos 2 (A) και MG-63 (B) κύτταρα σε συνθήκες στέρησης ορού χορηγήθηκε EGF (50 ng / ml) για 30 λεπτά παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων του gefinitib. Τα επίπεδα των phospho-EGFR και του ολικού EGFR εξετάστηκαν με τη μέθοδο Western. Έγινε πυκνομετρική ανάλυση των

Αποτελέσματα

ζωνών και παρουσιάζονται οι λόγοι του φωσφορυλιωμένου EGFR / ολικού EGFR (phospho-EGFR / total EGFR). Στα Saos 2 (C) και MG-63 (D) κύτταρα σε συνθήκες στέρησης ορού χορηγήθηκε EGF (50 ng / ml) ή διακοσμιτίνη (20 μg / ml) για 48 ώρες με παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων του gefinitib και στη συνέχεια ο αριθμός των κυττάρων μετρήθηκε στο φλουορόμετρο. Στα Saos 2 (E) και MG-63 (F) κύτταρα σε συνθήκες απουσίας ορού χορηγήθηκε EGF (50 ng / ml) και gefinitib (10 μM) και στη συνέχεια, αφαιρέθηκαν κύτταρα με ρύγχος των 10 μl. Η κυτταρική μετανάστευση μετρήθηκε αναλύοντας την εικόνα σε διαφορετικές χρονικές περιόδους (6 έως και 24 ώρες). (Means +/- SEM plotted; n=3). * αντιστοιχεί σε $p < 0.01$, ** $p < 0.001$) (G) Ανάλυση κατά Western των επιπέδων των EGFR στα επαγόμενα από την διακοσμιτίνη (20 μg / ml) και gefinitib (10 μM) MG-63 κύτταρα. Έγινε πυκνομετρική ανάλυση των ζωνών και παρουσιάζονται οι λόγοι του EGFR/ ακτίνης.

b), χωρίς να προκαλέσει καμία κυτταρική τοξικότητα Επίσης, και οι δύο κυτταρικές σειρές έδειξαν να αυξάνουν τον κυτταρικό τους πολλαπλασιασμό και την κυτταρική κινητικότητα τους μετά από τη χορήγηση του EGF (Σχήμα 6.5 c, d, e και f). Η μετανάστευση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και των δύο κυτταρικών σειρών εξαρτάται από τη ενεργή EGFR σηματοδότηση (Σχήμα 6.5 c, d, e και f). Τα MG-63 κύτταρα έχουν σχετικά μεγαλύτερη βασική ικανότητα μετανάστευσης σε σχέση με τα Saos 2 κύτταρα, η οποία εντείνεται περισσότερο με τη χορήγηση του EGF. Η σχετικά μεγάλη ικανότητα μετανάστευσης των MG-63 κύτταρων συνδέεται με τα αυξημένα επίπεδα της διακοσμιτίνης που παράγουν αυτά τα κύτταρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η ικανότητα μετανάστευσης των MG-63 κύτταρων, μπορεί να επηρεαστεί με την αναστολή της σύνθεσης της διακοσμιτίνης δια μέσου του siRNA (Σχήμα 6.2d).

6.10 Συμπεράσματα

Η διακοσμιτίνη είναι ένα μόριο της ECM που εμπλέκεται σε πολλά κυτταρικά μονοπάτια με πιο σημαντικό αυτό της αναστολής της ανάπτυξης και της ικανότητα για μετάσταση διαφόρων κυτταρικών σειρών *in vitro* και *in vivo*. Εμείς παρουσιάζουμε τη πρώτη εξαίρεση στο προτεινόμενο μοντέλο που αναφέρθηκε προηγουμένως. Τα MG-63 κύτταρα έδειξαν ότι παράγουν τη διακοσμιτίνη και ότι δεν είναι ευαίσθητα στη επαγόμενη από τη διακοσμιτίνη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το κύριο εύρημα αυτής της φάσης της μελέτης ήταν ότι η απουσία της διακοσμιτίνης προκάλεσε τη διατηρημένη ανείρεση των EGFR στα MG-63 κύτταρα. Σημαντικό

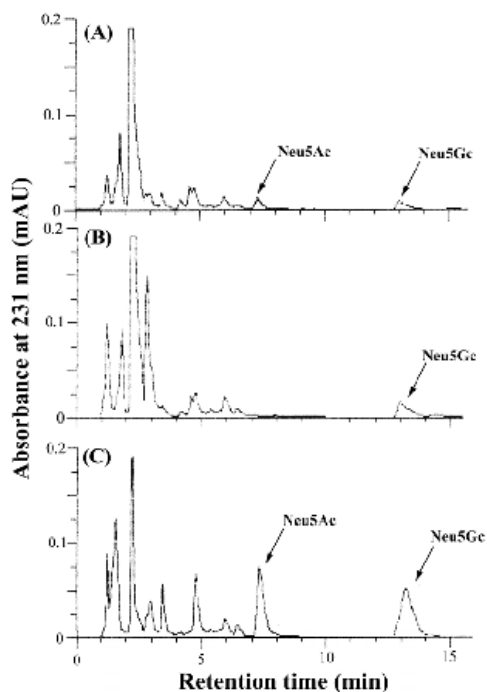
επίσης είναι ότι η διακοσμιτίνη και ο EGF έχουν αντίθετη επίδραση στη έκφραση του EGFR αν και τον χρησιμοποιούν και οι δύο. Ο EGF μειώνει την έκφραση του υποδοχέα, ενώ η διακοσμιτίνη φαίνεται να τον δεσμεύει και να αυξάνει την έκφραση του και για αυτή της τη δράση δεν χρειάζεται ενεργή EGFR σηματοδότηση.

7.0 Έκφραση και καθορισμός των N-ακετυλ και των N-γλυκολυλιουραμινικών οξέων σε εκκρίνομενα και μεμβρανικά, γλυκοζυζεύγματα από τις δύο κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος

7.1 Στόχος

Το N-ακετυλιουραμινικό οξύ (Neu5Ac) και το N-γλυκολυλιουραμινικό οξύ (Neu5Gc) είναι τα επικρατούντα σιαλικά οξέα (Sia) στα θηλαστικά που συνήθως βρίσκονται στα μη αναγόμενα άκρα των ολιγοζαχαριδικών αλυσίδων στις γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια (Lamari & Karamanos, 2002). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τη συσχέτιση μεταξύ των υψηλών επιπέδων των σιαλικών οξέων και των διαφόρων τύπων καρκίνου ((Makatsori *et al.*, 1998, 1999; Sillanauke *et al.*, 1999; Narayanan, 1994). Ένας σημαντικός ρόλος των σιαλικών οξέων που βρίσκονται είτε στα γλυκολιπίδια είτε στις γλυκοπρωτεΐνες είναι η τροποποίηση της σηματοδότησης των αυξητικών παραγόντων όπως του FGF, PDGF και του EGF δια μέσω των αλληλεπιδράσεων των σιαλικών οξέων με τους αντίστοιχους υποδοχείς (Kaucic *et al.*, 2006).

Αντικείμενο της έβδομης φάσης της παρούσας μελέτης ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός των Neu5Ac και των Neu5Gc σιαλικών οξέων, σε αμφοτέρα τα εκκρίνομενα και προσδεμένα στη κυτταρική μεμβράνη γλυκοζυζεύγματα στις MG-63 και Saos 2 κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος σε συνθήκες καλλιέργειας.



Σχήμα 7.1. Η HPLC ανάλυση των σιαλικών οξέων (Neu5Ac και του Neu5G) στα MG-63 (A) και Saos 2 (B) κύτταρα. (C) δείγματα έλεγχου.

7.2 Η ανάλυση των σιαλικών οξέων

Σ' αυτή τη φάση της μελέτης μας, εξετάσαμε την ποσότητα και την κατανομή του Neu5Ac και του Neu5G με την μέθοδο HPLC στο υπερκείμενο (θρεπτικό υλικό) και στη κυτταρική μεμβράνη, των MG-63 και των Saos 2 κυττάρων (Σχήμα 7.1).

Προσδιορίστηκε από τις μελέτες μας, ότι τα MG-63 κύτταρα παράγουν πάνω από 5 φορές περισσότερο ολικό σιαλικό οξύ συγκρινόμενο με τα Saos-2 κύτταρα

Πίνακας 7.1. Ποσότητα και κατανομή του Neu5Ac και του Neu5G στο υπερκείμενο (θρεπτικό υλικό) και στη κυτταρική μεμβράνη.

Αποτελέσματα

^a Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν % των ολικών σιαλικών οξέων,

* Στατιστικά σημαντικό ($p \leq 0.05$) σε σύγκριση με την ολική ποσότητα των σιαλικών οξέων στα MG-63 κύτταρα.

Cell lines	Culture media			Cell membrane extracts		
	Neu5Ac	Neu5Gc	Total Sia	Neu5Ac	Neu5Gc	Total Sia
MG-63	3.97 (59.1) ^a	2.75 (40.9)	6.72 ± 0.33*	traces	4.48 (100.0)	4.48
Saos-2	2.02 (100.0)	traces	2.02 ± 0.10	traces	ND	
LZ or ZX (control)	1.88 (86.2)	0.30 (13.7)	2.18 ± 0.11	ND	traces	

(Πίνακας 7.1). Ο κύριος εκκρινόμενος τύπος των σιαλικών οξέων και στις δύο κυτταρικές σειρές είναι το Neu5Ac με ποσότητες που άγγιξαν τα 100% και 59% στα Saos 2 και MG-63 κύτταρα, αντίστοιχα. Το Neu5Ac υπολογίστηκε στο 60% περίπου των ολικών σιαλικών οξέων που εκκρίθηκαν από τα MG-63 κύτταρα, ενώ το Neu5Gc ήταν το κύριο σιαλικό οξύ στην κυτταρική μεμβράνη των MG-63 κυττάρων (100%) (Πίνακας 7.1). Αντίθετα, τα Saos-2 κύτταρα με χαμηλή ικανότητα για μετάσταση, εκκρίνουν αξιόλογες ποσότητες του Neu5Ac στο υπερκείμενο ενώ στη κυτταρική μεμβράνη ανιχνεύτηκαν μόνο ίχνη των μορίων αυτών. Οι ποσότητες του Neu5Gc στη κυτταρική μεμβράνη των MG-63 κυττάρων είναι αρκετά υψηλότερες συγκρινόμενες με τις ποσότητες που ανιχνεύτηκαν στο υπερκείμενο των κυττάρων αυτών ($p < 0.05$). Επιπρόσθετα, μόνο ίχνη του Neu5Gc βρέθηκαν στο υπερκείμενο των Saos-2 κυττάρων, όπως και στο υπερκείμενο των MG-63 κυττάρων, τα οποία εμπλουτίστηκαν με FCS που περιέχει μικρές ποσότητες σιαλικών οξέων.

7.3 Συζήτηση

Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι τα κύτταρα του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος εκφράζουν αμφοτέρους τους τύπους γλυκοζυζευγμάτων που περιέχουν σιαλικά οξέα, οι δε διαφορές στις ποσότητες του καθενός από τους δύο κύριους τύπους σιαλικών οξέων καθώς και η κατανομή τους μπορεί να σχετίζεται με τις διαφορές τους στην μορφολογία και την μεταστατική τους ικανότητα.

Συζήτηση

Οι πρωτεογλυκάνες είναι σημαντικά συστατικά των μή κολλαγονοδών μακρομορίων του οστού. Συντίθενται και εγκρίνονται από τους οστεοβλάστες και συμμετέχουν στον έλεγχο της ασβεστοποίησης των οστών (Waddington & Langley, 1998). Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι PGs της κυτταρικής μεμβράνης (κυρίως ηθειική ηπαράνη) συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση κυττάρου με κύτταρο και κυττάρου με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, και μπορούν να παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό και την διατήρηση του οστίτη ιστού (Birch & Skerry, 1999). Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων οι PGs μπορούν να ρυθμίσουν σημαντικά κυτταρικά γεγονότα όπως η κυτταρική προσκόλληση, η διήθηση, η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός.

Οι δύο κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος που μελετηθήκαν (MG-63 και Saos 2) συνθέτουν HA και τέσσερις ξεχωριστές ομάδες GAGs σε διαφορετικές ποσότητες. Όταν καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες μονού στρώματος, αμφοτέρως οι κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι συνθέτουν εξωκυττάρια HA, καθώς και εκκρινόμενες και κυτταρικά προσκολλημένες GalAGs και HS. Αν και τα κύτταρα και των δύο σειρών συνθέτουν αξιοσημείωτες ποσότητες PGs, τα Saos 2 κύτταρα παράγουν HA, GalAGs και HS σε σημαντικά χαμηλότερες ποσότητες από αυτές των MG-63 κυττάρων. Επιπρόσθετα, παρατηρήσαμε ότι εκκρίνεται σχεδόν όλη η παραγόμενη από τα Saos 2 κύτταρα ποσότητα του HA, ενώ σημαντική ποσότητα του παραγόμενου HA από τα MG-63, παραμένει στην κυτταρική μεμβράνη.

Η ικανότητα των δύο κυτταρικών σειρών του οστεοσαρκώματος να συνθέτουν γλυκοζαμινογλυκάνες επηρεάζεται σημαντικά από τη χορήγηση της γενιστεΐνης. Η γενιστεΐνη, είναι ένας ειδικός αναστολέας της πρωτεΐνης της κινάσης της τυροσίνης, έχει μικρή επίδραση στη φωσφορυλίωση των κινασών σερίνης και θριονίνης. Επομένως, η δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική επίδραση της γενιστεΐνης στη σύνθεση, τόσο των εξωκυττάρια εκκρινόμενων όσο και των κυτταρικά προσκολλημένων GAGs/PGs από τα Saos 2 κύτταρα φαίνεται να πραγματοποιείται πιθανόν μέσω ενός PTK μηχανισμού. Η ανασταλτική επίδραση της γενιστεΐνης στη σύνθεση των GAGs/PGs μέσω της PTK είναι σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα που είχαμε σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου κακοήθους μεσοθηλιώματος επιθηλιακής και σαρκωματοδούς διαφοροποίησης (Tzanakakis *et al*, 1997; Syrokou *et al*, 1999).

Η επίδραση της γενιστεΐνης στην σύνθεση των GAGs από τα MG-63 ήταν διαφορετική από αυτή στα Saos 2 κύτταρα. Η γενιστεΐνη κατέστειλε την σύνθεση του HA στις δύο συγκεντρώσεις (10 $\mu\text{g/ml}$ 30 $\mu\text{g/ml}$) που χρησιμοποιήθηκαν, αλλά

δεν είχε επίδραση στην παραγωγή των εκκρινόμενων GalAGs και της προσκολλημένης στην κυτταρική μεμβράνη HS. Έχει βρεθεί ότι η γενιστεΐνη αναστέλλει τη φωσφορυλίωση και τη μιτογονική επίδραση του PDGF, αλλά δεν επηρεάζει την προκαλούμενη από το IGF-II φωσφορυλίωση της τυροσίνης και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των MG-63 κυττάρων. Αντίθετα, η γενιστεΐνη εμποδίζει σε σημαντικό βαθμό τη δράση αμφοτέρων των PDGF και IGF-II στους ανθρώπινους οστεοβλάστες (Sandy *et al*, 1998). Η ειδική αυτή αναστολή υποδεικνύει ότι συγκεκριμένες κινάσες της τυροσίνης μπορεί να ρυθμίζουν τη προκαλούμενη από τους αυξητικούς παράγοντες διέγερση των οστεοβλαστικών κυτταρικών σειρών.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει τις επιδράσεις των οιστρογόνων στα κύτταρα με οστεοβλαστική προέλευση (Robinson *et al*, 2000; Kassem *et al*, 1996). Αμφότερες οι MG-63 και Saos 2 κυτταρικές σειρές εκφράζουν τους δύο οιστρογονικούς υποδοχείς, ER-α και ER-β (Vidal *et al*, 1996; Donio *et al*, 1999). Επιπρόσθετα, έχει φανεί ότι η έκφραση των ER-α και ER-β καθώς και ο αριθμός των θέσεων προσκόλλησης είναι περισσότερος στα MG-63 συγκρινόμενος με τα Saos 2 κύτταρα (Vidal *et al*, 1996; Donio *et al*, 2001). Η οιστρογονική δράση της γενιστεΐνης είναι σημαντική, ιδιαίτερα για τον ER-β με τον οποίο παρουσιάζει 20 φορές μεγαλύτερη δυνατότητα πρόσδεσης σε σχέση με τον ER-α (Donio *et al*, 2001). Η γενιστεΐνη διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της καρκινικής σειράς MCF-7 του μαστού με ER+, καθώς και τη σύνθεση των πρωτεογλυκανών (Mitropoulou *et al*, 2002). Συνοψίζοντας, η περίπλοκη διαδικασία στην σύνθεση των PGs από τα MG-63 κύτταρα μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της συνδυασμένης δράσης της γενιστεΐνης μέσω PTK μηχανισμού και των υποδοχέων του οιστρογόνου.

Έχει βρεθεί ότι οι GFs όπως, ο αυξητικός παράγοντας του μετασχηματισμού (TGF-β), ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (bFGF) και ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF) βοηθούν την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος. Οι κυτταρικές σειρές του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος σε *in vitro* μελέτες βρέθηκε ότι εκφράζουν όλους τους τύπους των υποδοχέων για το TGF-β και παράγουν διαφορετικά ποσά του TGF-β1 και TGF-β2 (Takeuchi *et al*, 1995). Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε, ότι η επίδραση του εξωγενώς χορηγούμενου TGF-β στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην σύνθεση των πρωτεογλυκανών στις κυτταρικές σειρές του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος σχετίζεται με την έκφραση των υποδοχέων του TGF-β (Franchi *et al*, 1989; Robey *et al*, 1987). Επίσης ανευρέθει ότι και ο bFGF και ο PDGF παράγονται από τα κύτταρα του οστεοσαρκώματος

ασκώντας αυτοκρινή έλεγχο στην ανάπτυξή τους (Bodo *et al*, 2002; Oda *et al*, 1995; Yamagata *et al*, 1994), και ότι σχετίζονται με την πρόγνωση του όγκου (Bodo *et al*, 2002; Oda *et al*, 1995). Αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες έχει αναφερθεί ότι έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της παραγωγής αλλά και της κατανομής των γλυκοζαμινογλυκανών /πρωτεογλυκανών σε άλλες κυτταρικές σειρές. Έτσι, η μελέτη μας είχε σαν στόχο τον έλεγχο της δράσης του TGF-β2, bFGF και PDGF-BB στη σύνθεση και την κατανομή των γλυκοζαμινογλυκανών/πρωτεογλυκανών στις δύο κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος. Η σύσταση της ECM του οστεοσαρκώματος έχει αναφερθεί ότι έχει πολύ μεγάλη σημασία στην ανάπτυξη του όγκου και στην ανταπόκριση που αυτός έχει στην χορηγούμενη θεραπεία. (Mintz *et al*, 2005).

Τα αποτελέσματα αυτής της φάσης της μελέτης έδειξαν ότι η εξωγενής χορήγηση των αυξητικών παραγόντων επηρέασε την σύνθεση των GAGs/PGs στον τύπο και στη κατανομή τους. Επιπρόσθετα, η επίδρασή τους ήταν διαφορετική στις δύο κυτταρικές σειρές που πιθανόν να αντανάκλα την διαφορετική διαφοροποίηση και μεταστατική ικανότητά τους.

Είναι γνωστό ότι οι GAGs συμμετέχουν στη ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών καθώς και στις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με τους αυξητικούς παράγοντες. Έτσι θεωρήσαμε ότι ήταν επιβεβλημένο να μελετήσουμε την επίδραση των κυριότερων τύπων των αλυσίδων GAGs στην ανάπτυξη των φυσιολογικών οστεοβλαστών και των κυττάρων MG-63 και Saos 2 του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αναστολή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αμφοτέρων φυσιολογικών και μετασχηματισμένων οστεοβλαστικών κυττάρων στις συγκεντρώσεις της ηπαρίνης $\geq 1 \mu\text{g} / \text{ml}$. Η ηπαρίνη έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη διαφόρων τύπων κυττάρων (Wright *et al*, 1989; Volpi *et al*, 1994; Syrokou *et al*, 1999), και ότι η υψηλή συγκέντρωση του IdoA και της N-θειωμένης GlcN της ηπαρίνης σχετίζονται με αυτή την ικανότητά της. Επιπρόσθετα, αναφέρεται ότι η ηπαρίνη έχει ανασταλτική και διεγερτική επίδραση στη ανάπτυξη των οστεοβλαστικών κύτταρων ((Kock & Handschin, 2002; Matziolis *et al*, 2002; Hausser & Brenner, 2004)). Αυτά τα αντιφατικά αποτελέσματα μπορεί να έχουν σχέση με τις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες ή με την διαφορετικότητα των διαθέσιμων παρασκευασμάτων GAGs στο εμπόριο. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιήσαμε λεπτομερή βιοχημική ανάλυση των GAGs πριν την χορήγηση και μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η ανασταλτική επίδραση της ηπαρίνης για όλες τις κυτταρικές σειρές της παρούσας μελέτης σχετίζεται με την παρουσία

σημαντικών ποσοτήτων τρις-θειωμένων δισακχαριτών που περιέχουν IdoA οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για το ολικό αρνητικό φορτίο της ηπαρίνης. Συνεπώς, η ύπαρξη μεγάλης ποσότητας τρις-θειωμένων δισακχαριτών που περιέχουν IdoA θα πρέπει να θεωρείται σημαντικός παράγοντας αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Wright *et al*, 1989; Syrokou *et al*, 1999; Petitiy *et al*, 1991). Η ηπαρίνη, που δεν συντίθεται από τους οστεοβλάστες αλλά από τα σιτευτικά κύτταρα του συνδετικού ιστού, έχει ευρύτερη κλινική χρήση στη πρόληψη και αγωγή θρομβοεμβολικών νόσων και σχετίζεται με τον αυξανόμενο κίνδυνο της οστεοπόρωσης (Nelson-Piercy, 1998). Η ηπαρίνη και οι αλυσίδες HS εμφανίζουν δομική συγγένεια διότι χρησιμοποιούν το ίδιο βιοσυνθετικό μονοπάτι (Lindahl, 2000; Rabenstein, 2002). Επομένως, η ηπαρίνη ανταγωνίζεται τη HS για τις διαθέσιμες θέσεις σύνδεσης κοινών μορίων στόχων, παρεμβαίνοντας στις δραστηριότητες σύνδεσης των αλυσίδων της HS. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μεταξύ άλλων, τη μη φυσιολογική δράση των αυξητικών παραγόντων που προσδένονται με την ηπαρίνη στα οστεοβλαστικά κύτταρα (Saksela *et al*, 1988).

Τα αποτελέσματα αυτής της φάσης των πειραμάτων έδειξαν ότι η CSA δεν ανέστειλε την ανάπτυξη των οστεοβλαστικών κυττάρων σε συγκεντρώσεις κάτω των 10 $\mu\text{g/ml}$. Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (100 $\mu\text{g/ml}$) ήταν πίο ισχυρή στα MG-63 κύτταρα (30%) και μπορεί να οφείλεται στις έμμεσες επιδράσεις ή/και στη κυτταροτοξικότητά της. Η DS άσκεισε εντονότερη ανασταλτική επίδραση στη συγκέντρωση των 10 $\mu\text{g/ml}$ μόνο στα MG-63 κύτταρα. Η επίδραση της DS πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία των εύκαμπτων μονάδων της IdoA που παρέχουν μεγαλύτερη μεταβλητότητα στη διάπλαση αυτών των μακρομορίων και που ενδεχομένως να είναι κρίσιμης σημασίας γεγονός για τα MG-63 κύτταρα. Οι βιολογικές δραστηριότητες των μακρομορίων αυτών ανάλογα με τον τύπο, τη θείωση και την κύρια δισακχαριτική μονάδα [IdoA-GalNAc-(4-O-SO₃)-] των αλυσίδων της DS (71%), έδειξαν ότι σχετίζονται με την αυξημένη ανασταλτική τους δράση. Είναι αξιοσημείωτο ότι το περιεχόμενο της IdoA της διγλυκάνης και της διακοσμιτίνης που παράγουν οι οστεοβλάστες αυξάνεται γραμμικά με την ηλικία των δοτών και μπορεί να σχετίζεται με την μειωμένη ικανότητα τους για ανάπτυξη (Grzesik *et al*, 2002)

Σημαντικός είναι ο ρόλος των αλυσίδων GAGs στην δημιουργία των συμπλεγμάτων με τους αυξητικούς παράγοντες που έχει ως αποτέλεσμα τη ρύθμιση των δραστηριοτήτων τους (Saksela *et al*, 1988). Οι οστεοβλάστες παράγουν ECM

που είναι πλούσια σε αλυσίδες GAGs. Οι αλλαγές στη σύσταση της ECM επηρεάζουν τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή και ακόμη τη κυτταρική μορφολογία.

Ένα σημαντικό εύρημα της παρούσας φάσης της μελέτης μας, ήταν η παρόμοια απάντηση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αμφότερων των φυσιολογικών και μετασχηματισμένων οστεοβλαστικών κυττάρων στην εξωγενή χορήγηση των GAGs. Αυτό υποδηλώνει ότι οι GAGs μπορεί να επηρεάσουν τα οστεοβλαστικά κύτταρα μέσω κοινών μονοπατιών στα οποία η παρουσία των μονάδων του IdoA, καθώς και ο τύπος της θείωσης φαίνεται να έχουν κρίσιμους ρόλους.

Η βερσικάνη, μια μεγάλου μεγέθους πρωτεογλυκάνη θειϊκής χονδροϊτίνης και το συνδεδεμένο σε αυτή HA είναι συστατικά της ECM που παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην συμπεριφορά των μετασχηματισμένων κυττάρων. Η έκφραση συγκεκριμένων ισομορφών της βερσικάνης έχει ενοχοποιηθεί για την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Επίσης η διακοπή της σύνθεσης HA, μέσω της αναστολής της έκφρασης της HAS2 στα κύτταρα οστεοσαρκώματος, καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα και την διηθητική ικανότητά τους. Επιπρόσθετα, επειδή οι αυξητικοί παράγοντες όπως ο TGF- β 2, bFGF και PDGF-BB, είναι σημαντικοί ρυθμιστές της έκφρασης των μακρομορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, μελετήσαμε την επίδραση αυτών των αυξητικών παραγόντων στην έκφραση των διαφόρων ισομορφών της βερσικάνης, στην σύνθεση της συνθάσης του HA από τα MG-63 κύτταρα του οστεοσαρκώματος αλλά, και από τους φυσιολογικούς ανθρώπινους οστεοβλάστες του περιοδοντικού συνδέσμου (hPDL).

Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι τα βασικά επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων της βερσικάνης στα φυσιολογικά hPDL κύτταρα είναι σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με αυτά των κυττάρων MG-63. Ο TGF- β 2 έδειξε ότι οδηγεί τα κύτταρα του οστεοσαρκώματος να εκφράσουν τις V0 και V1 ισομορφές παρ'όλο που τα βασικά επίπεδα έκφρασης αυτών των ισομορφών είναι μηδενικά στα MG-63 κύτταρα. Οι bFGF και PDGF-BB είχαν ασήμαντες διεγερτικές επιδράσεις στα κύτταρα αυτά. Στα hPDL κύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του mRNA της βερσικάνης από όλους τους αυξητικούς παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν με κυριώτερο τον bFGF. Επιπρόσθετα, οι αυξητικοί παράγοντες είχαν διαφορετικές επιδράσεις στην έκφραση των ειδικών ισομορφών της βερσικάνης μεταξύ των κυττάρων του οστεοσαρκώματος και τους φυσιολογικούς οστεοβλάστες. Στα κύτταρα hPDL η έντονη διέγερση των

μεταγράφων της V3 από όλους τους αυξητικούς παράγοντες ήταν υπεύθυνη για την αύξηση της έκφρασης της βερσικάνης. Ο TGF-β2 ήταν ο κύριος διεγέρτης της έκφρασης της HAS2 ισομορφής, όπως και της σύνθεσης του HA στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος, ενώ ο PDGF-BB είχε την σημαντικότερη επίδραση στην έκφραση των HAS ισομορφών καθώς και στην σύνθεση του HA από τους οστεοβλάστες.

Ο TGF-β2 εκκρίνεται σε λανθάνουσα μορφή κατά την οποία ένα άμινο τελικό τμήμα του (LAP) μή ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το δραστήριο τμήμα του πεπτιδίου εμποδίζει την ενεργοποίησή του (Munger *et al*, 1997). Αυτό το λανθάνον σύμπλεγμα δεν είναι ικανό να προσδεθεί στους υποδοχείς του TGF-β2 έως ότου ο βιολογικά δραστήριος και ώριμος TGF-β διαχωριστεί από το LAP. Προηγουμένως, τα MG-63 κύτταρα έδειξαν ότι εκκρίνουν κυρίως τη TGF-β2 ισομορφή και ότι το 97% αυτής ήταν σε λανθάνουσα μορφή (Kloen *et al*, 1994) Ο TGF-β2 είναι άφθονος στη ECM των οστών, ελευθερώνεται και δραστηριοποιείται στη διάρκεια της διαδικασίας επαναρρόφησης των οστών (Ortfo *et al*, 1989). Τα κύτταρα στόχοι του TGF-β2 στα φυσιολογικά οστά είναι κυρίως τα χονδροκύτταρα και οι μη διαφοροποιημένοι οστεοβλάστες όπως φαίνονται από την παρουσία των υποδοχέων του και ιδιαίτερα του υποδοχέα II. Ο TGF-β2 μπορεί να επηρεάσει σ' αυτά τα κύτταρα την παραγωγή της ECM και την διαφοροποίησή τους (Kabasawa *et al*, 1998). Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι ο συνδυασμός των κυτταρικών υποδοχέων του TGF-β2 στα οστεοβλαστικά κύτταρα καθορίζει την ευαισθησία τους σε αυτόν. Οι αλλαγές των υποδοχέων μπορεί να παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης των πρωτεϊνών της ECM και του σχηματισμού των οστών (Takeuchi *et al*, 1995). Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η ανακατασκευή της ECM με μερική συμμετοχή του TGF-β1 σχετίζονταν με την φτωχή πρόγνωση του οστεοσαρκώματος (Mintz *et al*, 2005). Στη παρούσα μελέτη ο TGF-β2 προκάλεσε έντονη αύξηση της έκφρασης των V0/V1 ισομορφών. Έχει αναφερθεί ότι η βερσικάνη με τις προσδεμένες αλυσίδες της CS, έχει αντιπροσκολλητικές ιδιότητες και διεγείρει τη μετανάστευση των κυττάρων, ενώ η υπερέκφραση της V3 αναστέλλει σημαντικά την κυτταρική μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό (Lemire *et al*, 2002). Ο Cataruzzo *et al*. το 2004 πρότειναν ότι η αλλαγή του HA στο περικυττάριο χώρο καρκινικών κυττάρων που υπερεκφράζουν την βερσικάνη έχει σαν συνέπεια την τροποποίηση της ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων σε σήματα που προκαλούν είτε τον πολλαπλασιασμό είτε την κυτταρική απόπτωση. Κατά συνέπεια, η έντονη διέγερση των V0/V1 ισομορφών από το TGF-β2

μπορεί να αποτελεί ένα τμήμα του μηχανισμού μέσω του οποίου ο TGF- β 2 επηρεάζει την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος.

Στη μελέτη αυτή ο TGF- β 2 έδειξε ότι διεγείρει έντονα τη βασική παραγωγή του HA. Άλλες μελέτες με καρκινικά κύτταρα έδειξαν ότι η υπερπαραγωγή του HA εντείνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ικανότητά τους για μετάσταση (Itano *et al*, 2002) καταδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο του HA στον κακοήγη μετασχηματισμό και εξέλιξη των όγκων αυτών. Πρόσφατα, η διακοπή της σύνθεσης του HA, μέσω της αναστολής της έκφρασης της HAS2 στα MG-63 κύτταρα, είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των κυττάρων αυτών (Nishida *et al*, 2005).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο TGF- β 2 προκαλεί το κακοήγη φαινότυπο στην έκφραση της βερσικάνης και του HA στα κύτταρα του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος.

Οι μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRP) όπως η διγλυκάνη (biglycan), η διακοσμιτίνη (decorin), η φμπρομοδουλίνη (fibromodulin), η λουμικάνη (lumican) και η οστεοαντχερίνη (osteoaderin) (Lallier *et al*, 2005) είναι οι πιο άφθονες πρωτεογλυκάνες του οστεοειδούς. Το χαρακτηριστικό σε σχήμα πετάλου αλόγου του πρωτεϊνικού τους κορμού τους επιτρέπει να αλληλεπιδρούν με άλλα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, κυρίως με ίνες κολλαγόνου, αλλά και με την ανόργανη φάση στη διάρκεια της ασβεστοποίησης. Έχει αναφερθεί η παρουσία διγλυκάνης και διακοσμιτίνης σε ανθρώπινα κύτταρα εμβρυϊκού οστού και η απουσία διγλυκάνης σε κύτταρα ώριμου οστού μετά από απομόνωση και χαρακτηρισμό των PGs (8). Η λουμικάνη συμμετέχει στη ρύθμιση του σχηματισμού των ιών κολλαγόνου στο οστεοειδές (Raouf *et al*, 2002) και είναι μία από τις κυρίες PG του ώριμου οστεοειδούς (Raouf *et al*, 2002). Η έκφραση της λουμικάνης δεν ήταν γνωστή στο ανθρώπινο οστεοσάρκωμα μέχρι την ανάδειξή της από την παρούσα μελέτη.

Η εξέταση της έκφραση της λουμικάνης με τις πιθανές βιολογικές λειτουργίες της πραγματοποιήθηκε στις δύο κυτταρικές σειρές MG-63 και Saos 2. Σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος βρέθηκε ότι εκφράζεται η mRNA της λουμικάνης και ότι εκκρίνεται με μοριακό βάρος 60-70 kDa. Τα επίπεδα έκφρασης στα Saos 2 κύτταρα είναι 7 φορές υψηλότερα σε σχέση με αυτά των MG-63 κυττάρων. Προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι η λουμικάνη μπορεί είτε να διεγείρει είτε να αναστέλλει την ανάπτυξη των όγκων ανάλογα με τον τύπο και την έκταση της γλυκοζυλίωσής της. Με στόχο να εξετάσουμε το πιθανό ρόλο της

λουμικάνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα και την χημειοταξία των κυττάρων του οστεοσαρκώματος χρησιμοποιήσαμε siRNA. Η τροποποίηση του γενετικού υλικού, με την εισαγωγή γενετικού τμήματος μέσω siRNA, ανέστειλε αποτελεσματικά την έκφραση τόσο του mRNA όσο και της πρωτεΐνης της λουμικάνης στα Saos 2 και MG-63 κύτταρα. Μειωμένη εκκρίση της λουμικάνης στα Saos 2 κύτταρα συνέπεσε με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ δεν επηρεάστηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MG-63 κυττάρων από την αναστολή της έκφρασης της λουμικάνης. Τα βασικά επίπεδα έκφρασης της λουμικάνης φάνηκε ότι διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό στις δύο κυτταρικές σειρές, με τα χαμηλά βασικά επίπεδα έκκρισης της λουμικάνης στα MG-63 κύτταρα να μην επαρκούν ενδεχομένως για την ρύθμιση του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού.

Ένας προτεινόμενος μηχανισμός δράσης της λουμικάνης είναι αυτός μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης του TGF-β2. Όπως συμβαίνει και με άλλες SLRPs, η λουμικάνη σε πειράματα *in vitro* δείχνει να προσδένει το TGF-β2 (Naito *et al*, 2005) και μέσω της πρόσδεσης ή της αποθήκευσης του αυξητικού παράγοντα να ρυθμίζει την δραστηριότητά του. Τούτο είναι σημαντικό διότι αναφέρεται ότι οι TGF-β ισομορφές παίζουν ρόλο κλειδί στην ογκογένεση του οστεοσαρκώματος (Franchi *et al*, 1998). Στη παρούσα μελέτη, και σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, η εξωγενής προσθήκη TGF-β2 μείωσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στις δύο κυτταρικές σειρές. Τα Saos 2 κύτταρα στα οποία έγινε εισαγωγή του scramble siRNA βρέθηκαν να είναι περισσότερο ευαίσθητα στη προκαλούμενη από το TGF-β2 αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού τους σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία έγινε εισαγωγή του siRNA της λουμικάνης. Με σκοπό την διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής της λουμικάνης στο μονοπάτι του TGF-β2, έγινε ανάλυση της σηματοδότησης του TGF-β2 στα κύτταρα που είχε γίνει εισαγωγή του siRNA της λουμικάνης και του scramble siRNA. Είναι γνωστό ότι μετά από διέγερση με το TGF-β2, ο αντίστοιχος τύπος II υποδοχέας του, φωσφορυλιώνει τον τύπο I υποδοχέα και ο δεύτερος προσδένει και φωσφορυλιώνει μόνο τα Smad 2 ή / και 3 (Rahimi & Leof, 2007; Herpin & Cunningham, 2007). Τα Saos 2 κύτταρα εκφράζουν κυρίως το Smad 2 (Yu *et al*, 2004) και ως εκ τούτου μόνο σε αυτό εξετάστηκαν, μετά από διέγερση με το TGF-β2, τα επίπεδα της φωσφορυλίωσής του. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αναστολή της λουμικάνης διέγειρε τα βασικά επίπεδα φωσφορυλίωσης του Smad 2 που δεν σχετίζονταν με αλλαγές στη έκφραση του Smad 2. Αντίθετα, η εξωγενής χορήγηση του TGF-β2 αύξησε τη φωσφορυλίωση του Smad 2 σε παρόμοια

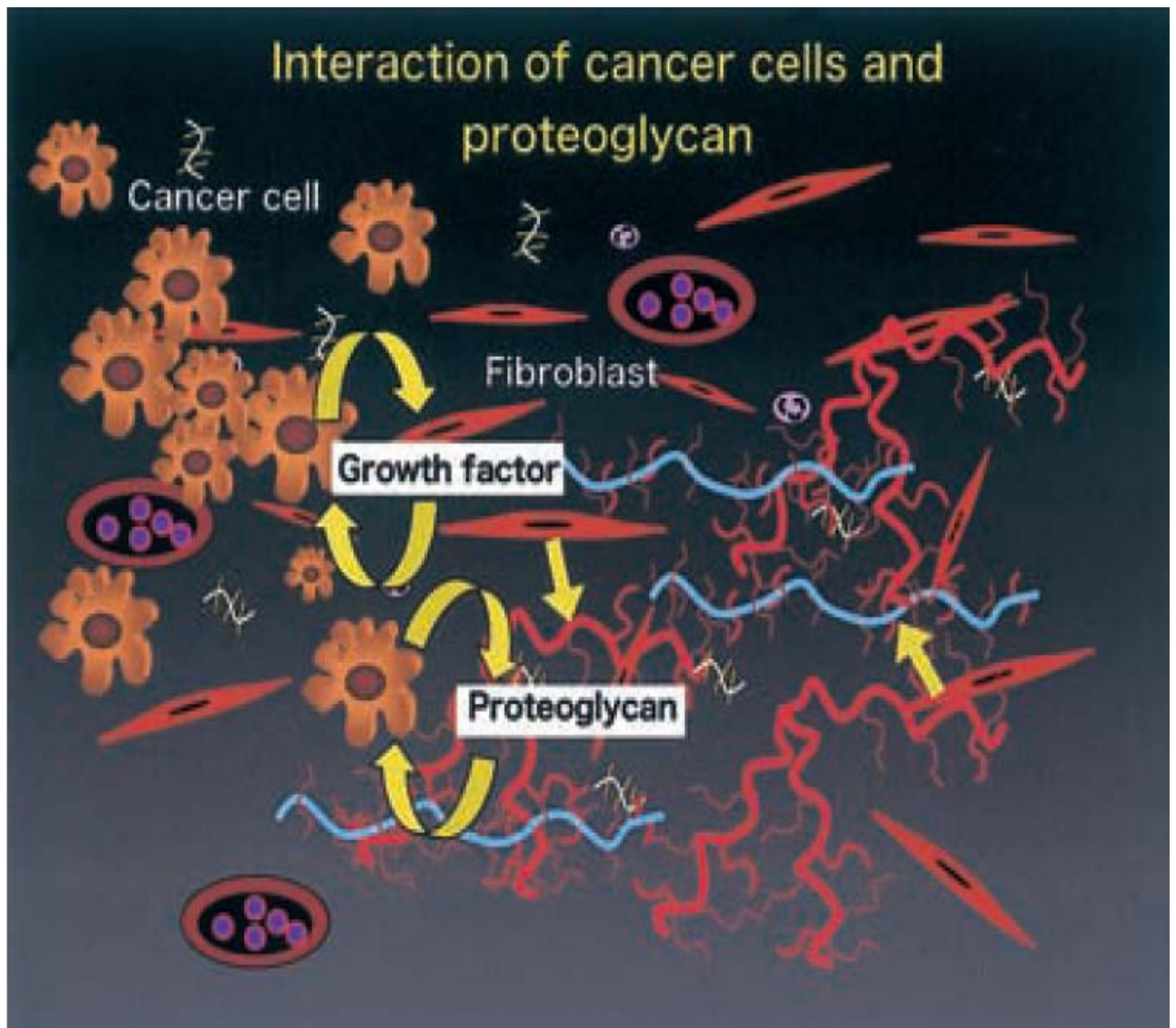
έκταση τόσο στα κύτταρα με έλλειψη λουμικάνης όσο και στα κύτταρα ελέγχου. Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα Smad 2 και 3 ενεργοποιούνται από το TGF- β 2, τη ακτιβίνη (activin) και τα μέλη της οικογένειας νοντάλ (nodal) (Herpin & Cunnigham, 2007)). Τα Saos 2 κύτταρα εκκρίνουν και τις τρεις TGF- β ισομορφές καθιστώντας ικανή την αυτοκρινή δράση του (Taichman *et al*, 1994). Επομένως, η λουμικάνη μέσω της ρύθμισης της διαθεσιμότητας του/των ισομορφή/ών του TGF- β μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα της ενεργοποίησης του Smad 2. Η παρατηρούμενη ρύθμιση της έκφρασης της λουμικάνης από το TGF- β 2 υποδηλώνει την ύπαρξη ενός αλληλοεξαρτώμενου μηχανισμού μεταξύ της σηματοδότησης του TGF- β 2 και των επιπέδων της λουμικάνης. Η διακοσμιτίνη έχει φανεί επίσης ότι επηρεάζει την TGF- β 2-Smad σηματοδότηση (Hao *et al*, 1999; Cabello-Verrugio & Brandan, 2007), υπογραμμίζοντας την σημασία των σημάτων που προέρχονται από τη ECM.

Τα Saos 2 κύτταρα συνθέτουν προκολλαγόνο όμοιο με αυτό που συνθέτουν οι οστεοβλάστες, ενώ τα MG-63 κύτταρα συνθέτουν ίνες που είναι όμοιες με αυτές που παράγουν οι ινόβλαστες και που δεν βοηθούν τη δημιουργία του οστεοειδούς. Έχει αναφερθεί ότι ανώριμοι οστεοβλάστες ανθρώπου (Lallier *et al*, 2002) και ποντικού δεν εκφράζουν τη λουμικάνη, ενώ οι διαφοροποιημένοι οστεοβλάστες ποντικού βρέθηκε να την παράγουν, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με τη διαφοροποίησή τους (Raouf *et al*, 2002). Η μεγαλύτερη παραγωγή της λουμικάνης από τα Saos 2 κυττάρων, που πιθανόν έχει σχέση με τη διαφοροποίησή τους, μπορεί να επηρεάσει την οργάνωση της ECM των κυττάρων καθώς και την εξαρτώμενη από την ECM σηματοδότησή τους (Σχήμα 1Σ).

Η λουμικάνη έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη μέσω της τροποποίησης των επιπέδων του p21WAF-1, ενός αναστολέα της κυκλικής κινάσης. Στη παρούσα μελέτη τα επίπεδα mRNA του p21WAF-1 μειώθηκαν στα Saos 2 κύτταρα με έλλειψη λουμικάνης. Η αλλαγή αυτή δεν μεταφράστηκε στη έκφραση της λουμικάνης, υποδεικνύοντας ότι οι επιδράσεις της λουμικάνης δεν ήταν μέσω του p21WAF-1.

Τα Saos 2 κύτταρα με έλλειψη σε λουμικάνη έδειξαν τη μικρότερη ικανότητα να μεταναστεύουν στην δοκιμασία επούλωσης της ουλής. Η κυτταρική μετανάστευση είναι μια αυστηρά ρυθμισμένη διαδικασία που χρειάζεται αμφότερες τις λειτουργίες της προσκόλλησης και αποκόλλησης των κυττάρων. Η προσκόλληση των κυττάρων τροποποιείται σημαντικά από την ομάδα των κυτταρικών υποδοχέων που αποκαλούνται ιντεγγρίνες οι οποίες προσδένονται σε διαφορετικά συστατικά της

ECM με προτίμηση στις ίνες κολλαγόνου (Hood & Cheresch, 2002). Ένας κυτταρικός υποδοχέας της λουμικάνης που εξαρτάται από την παρουσία δισθενών ιόντων έχει βρεθεί στα μακροφάγα, υποδηλώνοντας τη πιθανή δέσμευση της λουμικάνης με τις ιντεγγρίνες (Funderburgh *et al*, 1997). Οι υποδοχείς των ιντεγγρινών έχουν διαφορετικό τρόπο έκφρασης στις δύο κυτταρικές σειρές του οστεοσαρκώματος (Vihinen *et al*, 1996). Η λουμικάνη που εκφράζεται από τα Saos 2 κύτταρα μπορεί να αλληλεπιδρά με τους ειδικούς για την ιντεγγρίνη υποδοχείς, ρυθμίζοντας ως εκ τούτου την προσκόλληση και την μετανάστευση τους. Εναλλακτικά, η λουμικάνη μέσω της τροποποίησης της TGF- β 2-Smad σηματοδότησης μπορεί να επηρεάσει την μετανάστευση των Saos 2 κυττάρων (Nesti *et al*, 2002). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, αλλά και με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών έχει δειχθεί ότι η λουμικάνη μπορεί να ρυθμίζει τη κυτταρική μετανάστευση (Saika *et al*, 2003; Kao, 2006; Saika *et al*, 2000). Η χημειοταξική κινητικότητα των κυττάρων οστεοβλαστικής προέλευσης μπορεί επίσης να επηρεασθεί από την ινονεκτίνη (Moursi *et al*, 1996, 1997). Η ινονεκτίνη, είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που συντίθεται και εκκρίνεται στις περιοχές της ECM των οστών με έντονη αναπτυξιακή δραστηριότητα (Orefio *et al*, 1989). Στη παρούσα μελέτη, η χημειοταξική απάντηση των κυττάρων

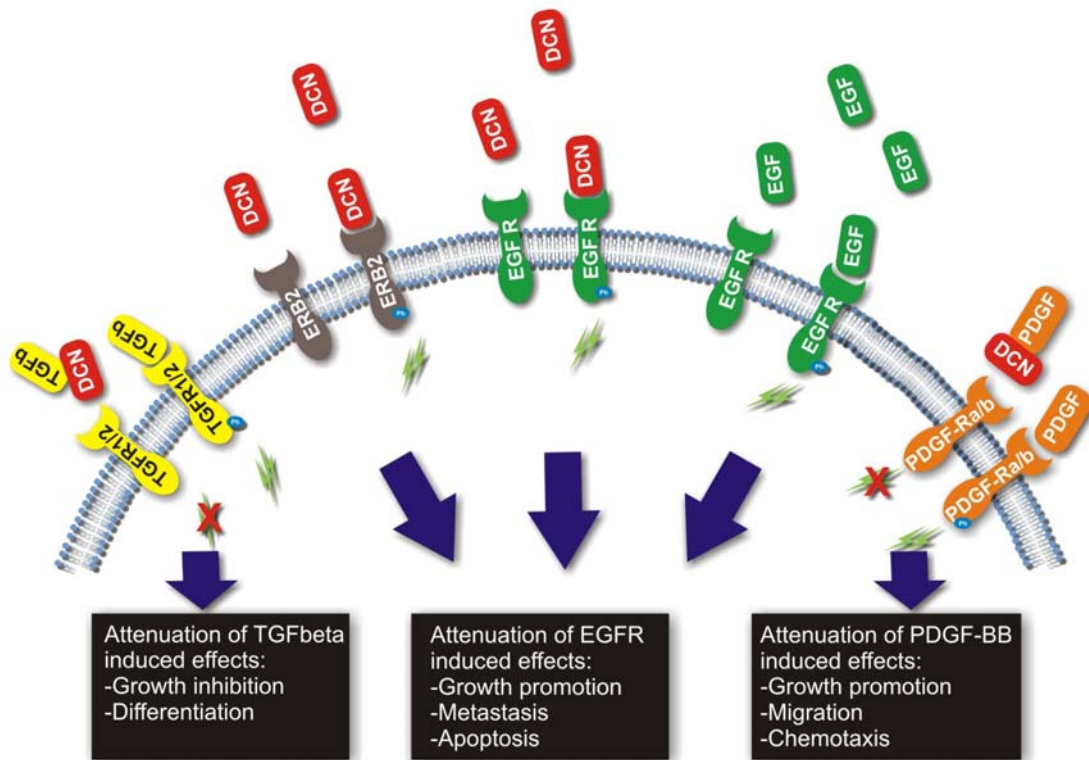


Σχήμα :1Σ Οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ καρκινικών κύτταρων, εκκρινόμενης στη ECM λουμικάνης και αυξητικών παραγόντων.

Saos 2 στην ινονεκτίνη βρέθηκε να εξαρτάται από την έκφραση της λουμικάνης. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι οι αλληλεπιδράσεις των οστεοβλαστών με την ινονεκτίνη πραγματοποιούνταν μέσω μιας ομάδας υποδοχέων της ιντεγγρίνης (Moursi *et al*, 1996). Επομένως, η λουμικάνη μέσω των αλληλεπιδράσεων με ειδικές ιντεγγρίνες ή μέσω άγνωστων υποδοχέων μπορεί να τροποποιεί την χημειοταξία των κυττάρων Saos 2.

Συμπερασματικά, οι δύο κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος βρέθηκαν να εκφράζουν την λουμικήνη προσδεδεμένη με τις αλυσίδες KS. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα καλά διαφοροποιημένα και μή μεταστατικά Saos 2 κύτταρα παρήγαγαν επτά φορές περισσότερη λουμικήνη από τα επιθετικότερα MG-63 κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι η έκφραση της λουμικήνης πιθανόν να σχετίζεται με τη διαφοροποίηση του οστεοσαρκώματος. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός των Saos 2 κυττάρων ανεστάλλει παρουσία της λουμικήνης, ενώ αυξήθηκε η μετανάστευση και η χημειοταξία τους. Τα βασικά επίπεδα φωσφορυλίωσης του Smad 2 είχαν αρνητική συσχέτιση με την έκφραση της λουμικήνης, που σημαίνει ότι μπορεί να επηρεάζει τη διαθεσιμότητα των ενεργοποιητών του Smad 2. Στα επιθετικά MG-63 κύτταρα αυτές οι κυτταρικές λειτουργίες δεν ήταν ευαίσθητες στις διακυμάνσεις των χαμηλών επιπέδων της ενδογενούς λουμικήνης σε αυτά.

Η διακοσμιτίνη είναι ένα μόριο της ECM που εμπλέκεται σε πολλά κυτταρικά μονοπάτια με πίο σημαντικό αυτό της αναστολής της ανάπτυξη και της ικανότητα για μετάσταση διαφόρων κυτταρικών σειρών *in vitro* και *in vivo*. Πρόσφατες μελέτες του Iozzo *et al.* σε ανθρώπινα εκ πλακώδους επιθηλίου καρκινικά κύτταρα έχουν δείξει ότι η διακοσμιτίνη αλληλεπιδρά άμεσα με τον EGFR (Iozzo *et al.*, 1999; Moscatello *et al.*, 1998; Santra *et al.*, 2002) και τον *erb2* (Santra *et al.*, 2000), και ότι προκαλεί παρατεταμένη ενσωμάτωση του υποδοχέα και επαγωγή της απόπτωσης (Seidler *et al.*, 2006). Εμείς με αυτή μας την μελέτη στα MG-63 κύτταρα του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος παρουσιάζουμε τη πρώτη εξαίρεση στο προτεινόμενο μοντέλο που αναφέρθηκε προηγουμένως. Τα MG-63 κύτταρα έδειξαν ότι παράγουν τη διακοσμιτίνη και ότι δεν είναι ευαίσθητα στη επαγόμενη από τη διακοσμιτίνη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αντίθετα, η διακοσμιτίνη φάνηκε να έχει ευεργετική επίδραση στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος αφ' ενός διότι ήταν απαραίτητη για την μετανάστευση των MG-63 κυττάρων και αφ' ετέρου διότι εμπόδισε την επαγόμενη από το TGF- β 2 κυτταροστατική λειτουργία. Η ανάλυση αυτών των δραστηριοτήτων της διακοσμιτίνης στα MG-63 κύτταρα έδειξε ότι δεν επάγει την έκφραση της p21WAF-1, ούτε προκαλεί παρατεταμένη αναίρεση και αδρανοποίηση του EGFR. Αντίθετα, ο EGFR φάνηκε να υπερεκφράζεται και να



Σχήμα: 2Σ. Τα κυτταρικά μονοπάτια που πιθανόν επηρεάζονται από την δράση της διακοσμιτίνης.

παραμένει δια μακρόν φωσφορυλιωμένος. Επιπρόσθετα, φάνηκε ότι για τα αυξημένα επίπεδα του EGFR δεν χρειάζεται ενεργοποιημένη σηματοδότηση του EGFR, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να επιτευχθεί σταθεροποίηση των υποδοχέων αυτών μέσω των αλληλεπιδράσεων της εξωκυττάριας διακοσμιτίνης και του EGFR. Ο ακριβής μηχανισμός που χρησιμοποιεί η διακοσμιτίνη για να αποτρέπει τη ουβικουιτινολίωση και τον εξαρτώμενο από τα λυσοσώματα αφανισμό των EGFR θα αποτελέσει στόχο μελλοντικών μελετών στο εργαστήριό μας. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν τα πιθανά μονοπάτια που μπορούν να χρησιμοποιούν τα καρκινικά κύτταρα για να ξεπεράσουν τη επαγόμενη από τη διακοσμιτίνη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Σχήμα 2Σ).

Το N-ακετυλνιουραμινικό οξύ (Neu5Ac) και το N-γλυκολυλνιουραμινικό οξύ (Neu5Gc) είναι τα επικρατούντα σιαλικά οξέα (Sia) στα θηλαστικά που συνήθως βρίσκονται στα μη αναγώμενα άκρα των ολιγοζαχαριδικών αλυσίδων στις γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια (Lamari & Karamanos, 2002). Το ανθρώπινο

σώμα δεν είναι ικανό να συνθέτει το Neu5Gc λόγω της μετάλλαξης του γονιδίου της CMP-Neu5Ac υδροξυλάσης, ενζύμου απαραίτητου για την σύνθεση του Neu5Gc. Η παρουσία των σιαλικών οξέων διευκολύνει τη σύνδεσή τους στους υποδοχείς που συμμετέχουν στις διάφορες βιολογικές αλληλεπιδράσεις (Kelm et Schauer, 1997). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τη συσχέτιση μεταξύ των υψηλών επιπέδων των σιαλικών οξέων και των διαφόρων τύπων καρκίνου ((Makatsori *et al*, 1998, 1999; Sillanauke *et al*, 1999; Narayanan, 1994). Το Neu5Ac είναι ανιχνεύσιμο στους περισσότερους ανθρώπινους καρκίνους που περιέχουν σιαλικά οξέα, ενώ ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι και το Neu5Gc επίσης σχετίζεται με συγκεκριμένους ανθρώπινους καρκίνους.

Αντικείμενο της συγκεκριμένης φάσης της παρούσας μελέτης ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός των Neu5Ac και των Neu5Gc σιαλικών οξέων, στα εκκρίνομενα και προσδεμένα στη κυτταρική μεμβράνη γλυκοζυζεύγματα στις MG-63 και Saos 2 κυτταρικές σειρές ανθρώπινου οστεοσαρκώματος σε συνθήκες καλλιέργειας.

Προσδιορίστηκε ότι τα MG-63 κύτταρα παράγουν πάνω από 5 φορές περισσότερο ολικό σιαλικό οξύ σε σύγκριση με τα Saos-2 κύτταρα. Το Neu5Ac υπολογίστηκε στο 60% περίπου των ολικών σιαλικών οξέων που εκκρίθηκαν από τα MG-63 κύτταρα, ενώ το Neu5Gc ήταν το κύριο σιαλικό οξύ στην κυτταρική μεμβράνη των MG-63 κυττάρων. Τα Saos-2 κύτταρα εκκρίνουν αξιόλογες ποσότητες του Neu5Ac στο υπερκείμενο ενώ μόνο ίχνη των σιαλικών οξέων ανιχνεύτηκαν στη κυτταρική μεμβράνη. Επιπλέον, μόνο ίχνη του Neu5Gc βρέθηκαν στο υπερκείμενο των Saos-2 κυττάρων, το οποίο είναι υλικό κυτταροκαλλιέργειας που περιέχει FCS. Η ίδια παρατήρηση ισχύει και για το υπερκείμενο στο υλικό κυτταροκαλλιέργειας των MG-63 κυττάρων. Βάση αυτού, είναι πιθανόν τα υψηλά ποσοστά του Neu5Gc που ανιχνεύτηκαν στο υπερκείμενο των MG-63 κυττάρων να προέρχονται από μια εξωγενή πηγή, αν και δεν μπορούμε να αποκλείσουμε ότι τα κύτταρα αυτά διαθέτουν κάποιο μηχανισμό απορρόφησης του Neu5Gc (Bardor *et al*, 2005). Μια πιθανή εξήγηση είναι η ύπαρξη εναλλακτικού μεταβολικού μονοπατιού για την σύνθεση του Neu5Gc από τα συγκεκριμένα κακοήγη κύτταρα (Malykh *et al*, 2001). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κύτταρα του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος εκφράζουν αμφοτέρους τους τύπους γλυκοζυζευγμάτων που περιέχουν σιαλικά οξέα, οι δε διαφορές στις ποσότητες του καθενός από τους δύο κύριους τύπους σιαλικών οξέων καθώς και η κατανομή τους μπορεί να σχετίζεται με τις διαφορές τους στην μορφολογία και την μεταστατική τους ικανότητα.

Τελικό συμπέρασμα από την μελέτη μας είναι ο ουσιαστικός ρόλος των PGs/GAGs τόσο στην οργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας των κυττάρων ανθρώπινου οστεοσαρκώματος όσο και στην ρύθμιση των διαφόρων βιολογικών λειτουργιών που πιθανόν να σχετίζονται με την διαφοροποίηση και την μεταστατική τους ικανότητα.

Βιβλιογραφία

- Ameys L & Young MF. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology*. 9:107R-16R, 2002.
- Alini M & Roughley PJ. Changes in leucine-rich repeat proteoglycans during maturation of the bovine growth plate. *Matrix Biol*. 19:805-13, 2001.
- Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P & Kukreja SC. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr*. 126:161-7, 1996.
- Aspberg A, Binkert C, Ruoslahti E. The versican C-type lectin domain recognizes the adhesion protein tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:10590-4, 1995.
- Baker JR, Caterson B. The isolation and characterization of the link proteins from proteoglycan aggregates of bovine nasal cartilage. *J Biol Chem*. 254:2387-93, 1979.
- Bardor M, Nguyen DH, Diaz S & Varki A. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem*. 280:4228-37, 2005.
- Bastow ER, Byers S, Golub SB, Clarkin CE, Pitsillides AA & Fosang AJ. Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. *Cell Mol Life Sci*. 65:395-413, 2008.
- Benayahu D, Shur I, Maron R, Meller I & Issakov J. Cellular and molecular properties associated with osteosarcoma cells. *J Cellular Biochem* 84:108-114, 2001.
- Bengtsson E, Neame PJ, Heinegård D & Sommarin Y. The primary structure of a basic leucine-rich repeat protein, PRELP, found in connective tissues. *J Biol Chem*. 256:39-44, 1995.
- Bi Y, Stuelten CH, Kilts T, Wadhwa S, Iozzo RV, Robey PG, Chen XD & Young MF. Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells. *J Biol Chem*. 280:30481-9, 2005.
- Birch MA & Skerry TM. Differential regulation of syndecan expression by osteosarcoma cell lines in response to cytokines but not osteotropic hormones. *Bone*. 24:571-8 & 1999.
- Blobe GC, Liu X, Fang SJ, How T & Lodish HF. 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, 2001.
- Blochberger TC, Vergnes JP, Hempel J, Hassell JR. 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, 1992.
- Board R & Jayson GC. Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR): a target for anticancer therapeutics. *Drug Resist Updat*. 8:75-83, 2005..
- Bodo M, Lilli C, Bellucci C, Carinci P, Calvitti M, Pezzetti F, Stabellini G, Bellocchio S, Balducci C, Carinci F & Baroni T. Basic fibroblast growth factor autocrine loop controls human osteosarcoma phenotyping and differentiation. *Mol Med*. 8:393-404, 2002.
- Bonnet F, Périn JP & Jollès P. Isolation and chemical characterization of two distinct "link proteins" from bovine nasal cartilage proteoglycan complex. *Biochim Biophys Acta*. 532:242-8, 1978.
- Brown TA, Bouchard T, St John T, Wayner E & Carter WG. Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J Cell Biol*. 113:207-21, 1991.
- Butler WT. Sialoproteins of bone and dentin. *J Biol Buccale*. 19:83-9, 1991.

- Cano-Gauci DF, Song HH, Yang H, McKerlie C, Choo B, Shi W, Pullano R, Piscione TD, Grisaru S, Soon S, Sedlackova L, Tanswell AK, Mak TW, Yeger H, Lockwood GA, Rosenblum ND & Filmus J. Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J Cell Biol.* 146:255-64, 1999.
- Cattaruzza S, Schiappacassi M, Kimata K, Colombatti A & Perris R. The globular domains of PG-M/versican modulate the proliferation-apoptosis equilibrium and invasive capabilities of tumor cells. *FASEB J.* 18:779-81, 2004.
- Chakravarti S. Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. *Glycoconj J.* 19:287-93, 2002.
- Chen CC & Boskey AL. Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth. *Calcif Tissue Int* 37: 395-400, 1985.
- Choi HU, Meyer K. The structure of keratan sulphates from various sources. *Biochem J.* 3:543-53, 1975.
- Choi HU, Johnson TL, Pal S, Tang LH, Rosenberg L & Neame PJ. 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.* 264:2876-8, 1989.
- Chou HH, Takematsu H, Diaz S, Iber J, Nickerson E, Wright KL, Muchmore EA, Nelson DL, Warren ST & Varki A. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:11751-6, 1998.
- Cool SM & Nurcombe V. The osteoblast-heparan sulfate axis: control of the bone cell lineage. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:1739-45, 2005.
- Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, Sommer B, Iozzo RV, Eichstetter I, Robey PG, Bianco P & Young MF. 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, 2002.
- Couchman, J.R. & Woods, A. Syndecans, signalling and cell adhesion. *J. Cell. Bioch.* 61: 578-584, 1996.
- Couchman JR. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:926-37, 2003.
- Critchlow MA, Bland YS & Ashhurst DE. The effects of age on the response of rabbit periosteal osteoprogenitor cells to exogenous transforming growth factor-beta 2. *J Cell Sci.* 107:499-516, 1994.
- Dahlin DC & Unni KK: Osteosarcoma of bone and its important recognizable varieties. *Am J. Surg Pathol.* PP GI-72, 1977.
- Danielson KG, Martinez-Hernandez A, Hassell JR & Iozzo RV. Establishment of a cell line from the EHS tumor: biosynthesis of basement membrane constituents and characterization of a hybrid proteoglycan containing heparan and chondroitin sulfate chains. *Matrix.* 12:22-35, 1992.
- David, G. Integral membrane heparan sulphate proteoglycans. *FASEB J.* 7:1023-1030, 1993.
- Day AA, McQuillan CI, Termine JD & Young MR. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for small proteoglycan II of bovine bone. *Biochem J.* 248:801-5, 1987.
- DeLuca S, Richmond ME, & Silbert JE. Biosynthesis of chondroitin sulfate. Sulfation of the polysaccharide chain. *Biochemistry.* 12:3911-5, 1973.

- Deepa SS, Yamada S, Zako M, Goldberger O, & Sugahara K. Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparan sulfate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem.* 279:37368-76, 2004.
- Doerge KJ, Sasaki M, Kimura T & Yamada Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem.* 266:894-902, 1991.
- Dobra K, Andäng M, Syrokou A, Karamanos NK & Hjerpe A. Differentiation of mesothelioma cells is influenced by the expression of proteoglycans. *Exp Cell Res.* 258:12-22, 2000.
- Doerge KJ, Coulter SN, Meek LM, Maslen K, & Wood JG. A human-specific polymorphism in the coding region of the aggrecan gene. Variable number of tandem repeats produce a range of core protein sizes in the general population. *J Biol Chem.* 272:13974-9, 1997.
- Dovio A, Sartori ML, Masera RG, Racca S & Angeli A. Inhibitory effect of physiological concentrations of cortisol but not estradiol on interleukin (IL)-6 production by human osteoblast-like cell lines with different constitutive IL-6 expression. *Cytokine.* 15:47-52, 2001
- Esko JD & Selleck SB. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem.* 71:435-71, 2002.
- Fisher LW. *In the Chemistry and Biology of Mineralize Tissues* (Butler WT, ed.) pp. 188-196, Ebsco, Birmingham, 1985.
- Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N & Termine JD. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J Biol Chem* 262: 9702-9708, 1987.
- Fisher LW, Termine JD & Young MF. 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, 1989.
- Franchi A, Arganini L, Baroni G, Calzolari A, Capanna R, Campanacci D, Caldora P, Masi L, Brandi ML & Zampi G. Expression of transforming growth factor beta isoforms in osteosarcoma variants: association of TGF beta 1 with high-grade osteosarcomas. *J Pathol.* 185:284-9, 1989.
- Fransson LA, Carlstedt I, Cöster L & Malmström A. The functions of the heparan sulphate proteoglycans. *Ciba Found Symp.* 124:125-42, 1986.
- Hardingham TE, Muir H. The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochim Biophys Acta.* 279:401-5, 1972.
- Fraser JR & Laurent TC. Turnover and metabolism of hyaluronan. *Ciba Found Symp.* 143:41-53, 1989.
- Friedman JS, Ducharme R, Raymond V & Walter MA. Isolation of a novel iris-specific and leucine-rich repeat protein (oculoglycan) using differential selection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:2059-66, 2000.
- Faham S, Hileman RE, Fromm JR, Lindhardt RJ & Rees DC. Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science.* 271:1116-1120, 1996.
- Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R & Schweigerer L. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2690-4, 1993.
- Fülöp C, Walcz E, Valyon M & Glant TT. Expression of alternatively spliced epidermal growth factor-like domains in aggrecans of different species. Evidence for a novel module. *J Biol Chem.* 268:17377-83, 1993.
- Funderburgh JL, Mitschler RR, Funderburgh ML, Roth MR, Chapes SK & Conrad GW. Macrophage receptors for lumican. A corneal keratan sulfate proteoglycan. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38:1159-67, 1997.

- Funderburgh JL Keratan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life*. 54:187-94, 2002.
- Gebken J, Feydt A, Brinckmann J, Notbohm H, Müller PK & Bätge B. Ligand-induced downregulation of receptors for TGF-beta in human osteoblast-like cells from adult donors. *J Endocrinol*. 161:503-10, 1999.
- Grebner EE, Hall CW & Neufeld EF. Glycosylation of serine residues by a uridine diphosphate-xylose: protein xylosyltransferase from mouse mastocytoma. *Arch Biochem Biophys*. 16:391-8, 1966.
- Grzesik WJ, Frazier CR, Shapiro JR, Sponseller PD, Robey PG, Fedarko NS. Age-related changes in human bone proteoglycan structure. Impact of osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem*. 277:43638-47, 2002.
- Hanaoka E, Ozaki T, Nakamura Y, Moriya H, Nakagawara A & Sakiyama S. Overexpression of DAN causes a growth suppression in p53-deficient SAOS-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 278:20-6, 2000.
- Hardingham TE & Muir H. The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochim Biophys Acta*. 279:401-5, 1972.
- Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J*. 6:861-70, 1992.
- Hascall VC & Riolo RL. Characteristics of the protein-keratan sulfate core and of keratan sulfate prepared from bovine nasal cartilage proteoglycan. *J Biol Chem*. 14:4529-38, 1972.
- Hausser H, Schönherr E & Kresse H. Different galactosaminoglycan composition of small proteoglycans from osteosarcoma cells. *Glycobiology*. 3:557-62, 1993.
- Hausser H, Gröning A, Hasilik A, Schönherr E & Kresse H. Selective inactivity of TGF-beta/decorin complexes. *FEBS Lett*. 353:243-5, 1994.
- Hausser HJ, Brenner RE. Low doses and high doses of heparin have different effects on osteoblast-like Saos-2 cells in vitro. *J Cell Biochem*. 91:1062-73, 2004.
- Hayashi Y, Liu CY, Jester JJ, Hayashi M, Wang IJ, Funderburgh JL, Saika S, Roughley PJ, Kao CW & Kao WW. Excess biglycan causes eyelid malformation by perturbing muscle development and TGF-alpha signaling. *Dev Biol*. 277:222-34, 2005.
- Helting T & Rodén L. Biosynthesis of chondroitin sulfate. I. Galactosyl transfer in the formation of the carbohydrate-protein linkage region. Biosynthesis of chondroitin sulfate. I. *J Biol Chem*. 244:2790-8, 1969.
- Herpin A & Cunningham C. Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. *FEBS J*. 274:2977-85, 2007.
- Hildebrand A, Romarís M, Rasmussen LM, Heinegård D, Twardzik DR, Border WA & Ruoslahti E. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J*. 302 527-34, 1994.
- Hocking AM, Shinomura T & McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol*. 17:1-19, 1998.
- Hoffman P, Mashburn TA Jr & Meyer K. Proteinpolysaccharide of bovine cartilage. II. The relation of keratan sulfate and chondroitin sulfate. *J Biol Chem*. 17:3805-9, 1967.
- Hood JD & Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*. 2:91-100, 2002.

- Höök M, Lindahl U, Bäckström G, Malmström A, Fransson L. Biosynthesis of heparin. 3. Formation of iduronic acid residues. *J Biol Chem.* 249:3908-15, 1974.
- Höök M, Kjellen L, Johnsson S & Robinson J. Cell-surface glycosaminoglycans. *Annu Rev Biochem.* 53: 847-869, 1984.
- Holmes MW, Bayliss MT, Muir H. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. *Biochem J.* 435-41, 1988.
- Hung LM, Tsai CH, & Chen JK. TGF-beta1 selectively suppresses PDGF receptor signaling pathways in MG-63 human osteosarcoma cell. *Life Sci.* 61:685-93, 1997.
- Inki P, Joensuu H, Grenman R, Klemi P & Jalkanen M. Association between syndecan-1 expression and clinical outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br. J. Cancer,* 70:319-23, 1994.
- Iozzo, RV. Perlecan: A gem of a proteoglycan. *Matrix Biology.* 14:203-208, 1994.
- Iozzo RV & Murdoch AD. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* 10:598-614, 1996.
- Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 67:609-52, 1998
- Iozzo RV, Moscatello DK, McQuillan DJ, & Eichstetter I. Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 274:4489-92, 1999.
- Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama Y, Ito M, Wang X, Suda T & Ikegami S. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology.* 140:1893-900, 1999.
- Itano N & Kimata K. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life.* 54:195-9, 2002.
- Itano N, Atsumi F, Sawai T, Yamada Y, Miyaiishi O, Senga T, Hamaguchi M, & Kimata K. Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:3609-14, 2002.
- Kabasawa Y, Ejiri S, Matsuki Y, Hara K & Ozawa H. Immunoreactive localization of transforming growth factor-beta type II receptor-positive cells in rat tibiae. *Bone.* 22:93-8, 1998.
- Kao WW. Ocular surface tissue morphogenesis in normal and disease states revealed by genetically modified mice. *Cornea.* 25(10 Suppl 1):S7-S19, 2006.
- Karamanos, N.K. Modern aspects on structure, biosynthesis and interactions of proteoglycans. *Pharmakeftiki,* 5:105-112, 1992.
- Karamanos, N.K., Vanky, P., Syrokou, A. & Hjerpe, A. Identity of dermatan and chondroitin sequences in dermatan sulphate chains determined by using fragmentation with chondroitinases and ion-pair high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.,* 225: 220-230, 1995.
- Καραμάνος, Ν.Κ. Σχέση δομής-δράσης υδατανθράκων και παραγώγων τους και ο ρόλος τους στην διάγνωση και θεραπεία. *Pharmakeftiki,* 10:50-61, 1997.
- Kelm S & Schauer R. Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol.* 175:137-240, 1997.
- Karamanos, N.K. Proteoglycans: biological roles and strategies for isolation and determination of their glycan constituents; *In Proteome and Protein Analysis* (Kamp, M., Kyriakides, D. and Choli-Papadopoulou, D., eds.) Springer-Verlag, Heidelberg, p. 341-363, 1999

- Karin M, Hunter T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol.* 5:747-57, 1995.
- Kido A, Tsutsumi M, Iki K, Takahama M, Tsujiuchi T, Morishita T, Tamai S, Konishi Y. Overexpression of matrix metalloproteinase (MMP)-9 correlates with metastatic potency of spontaneous and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4-HAQO)-induced transplantable osteosarcomas in rats. *Cancer Lett* 137: 209-216, 1999.
- Kinsella MG, Bressler SL & Wight TN. The regulated synthesis of versican, decorin, and biglycan: extracellular matrix proteoglycans that influence cellular phenotype. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2004;14(3):203-34.
- Kishimoto T, Taga T & Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell.* 1994 76:253-62, 1994.
- Kjellén L & Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem.* 60:443-75, 1991.
- Kloen P, Jennings CL, Gebhardt MC, Springfield DS & Mankin HJ. Expression of transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors, TGF-beta 1 and TGF-beta 2 production and autocrine growth control in osteosarcoma cells. *Int J Cancer.* 58:440-5, 1994.
- Kock HJ & Handschin AE. Osteoblast growth inhibition by unfractionated heparin and by low molecular weight heparins: an in-vitro investigation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 8:251-5, 2002.
- Krusius T, Gehlsen KR & Ruoslahti E. A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycan core protein contains lectin-like and growth factor-like sequences. *J Biol Chem.* 262:13120-5, 1987.
- Λαμπίρης HE, Ορθοπαιδική Τραυματολογία. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθηνά. 218-221, 2003.
- Lamari FN & Karamanos NK. Separation methods for sialic acids and critical evaluation of their biologic relevance. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 781:3-19, 2002.
- Laurent TC & Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J.*;6:2397-404, 1992.
- LeBaron RG, Zimmermann DR Ruoslahti E. Hyaluronate binding properties of versican. *J Biol Chem.* 267:10003-10, 1992.
- Lemire JM, Merrilees MJ, Braun KR & Wight TN. Overexpression of the V3 variant of versican alters arterial smooth muscle cell adhesion, migration, and proliferation in vitro. *J Cell Physiol.* 190:38-45, 2002.
- Li X, Eriksson U. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:91-8, 2003.
- Liebersbach BF & Sanderson RD. Expression of syndecan-1 inhibits cell invasion into type I collagen. *J.Biol. Chem.* 269:20013-20019, 1994.
- Lindahl U. 'Heparin'--from anticoagulant drug into the new biology. *Glycoconj J.* 17:597-605, 2000.
- Liu Y, Watanabe H, Nifuji A, Yamada Y, Olson EN, & Noda M. Overexpression of a single helix-loop-helix-type transcription factor, scleraxis, enhances aggrecan gene expression in osteoblastic osteosarcoma ROS17/2.8 cells. *J Biol Chem.* 272:29880-5, 1997.
- Lorenzo P, Aspberg A, Onnerfjord P, Bayliss MT, Neame PJ & Heinegard D. 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, 2001.
- McQuillan DJ, Midura RJ, Hascall VC & Yanagishita M. Plasma-membrane-intercalated heparan sulphate proteoglycans in an osteogenic cell line (UMR 106-01 BSP). *Biochem J.* 285:25-33, 1992.

- Malawer MM, Abelson HT & Suit HD: Sarcomas of Bone. In Devita VT, Helmans, Rosenberg SA (eds): Cancer Principles and practice of oncology. Lippincott, Philadelphia 1293-1342, 1989.
- Mali M, Andtfol H, Miettinen HM & Jalkanen M. Suppression of tumor cell growth by syndecan-1 ectodomain. *J. Biol. Chem.* 269:27795-27798, 1994.
- Malykh YN, Schauer R & Shaw L. N-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie.* 83:623-34, 2001.
- Malmström A & Fransson LA Biosynthesis of dermatan sulfate. I. Formation of L-iduronic acid residues. *J Biol Chem.* 250:3419-25, 1975.
- Makatsori E, Fermani K, Aletras A, Karamanos NK, Tsegenidis T. Screening of N-acylneuraminic acids in serum and tissue specimens of mouse C57BI with Lewis' lung cancer by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 712:23-9, 1998.
- Makatsori E, Aletras A, Karamanos NK, Tsegenidis T. Analysis of N-acetyl and N-glycolylneuraminic acid in rat serum and tissues with Walker 256 carcinoma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr.* 13:57-60, 1999.
- Manicourt DH & Pita JC. Quantification and characterization of hyaluronic acid in different topographical areas of normal articular cartilage from dogs. *Coll Relat Res.* 8:39-47, 1988.
- Manzi A, Salimath PV, Spiro RC, Keifer PA & Freeze HH. Identification of a novel glycosaminoglycan core-like molecule. I. 500 MHz ¹H NMR analysis using a nano-NMR probe indicates the presence of a terminal alpha-GalNAc residue capping 4-methylumbelliferyl-beta-D-xylosides. *J Biol Chem.* 270:9154-63, 1995.
- Markmann A, Hausser H, Schönherr E & Kresse H. Influence of decorin expression on transforming growth factor-beta-mediated collagen gel retraction and biglycan induction. *Matrix Biol.* 19:631-6, 2000.
- Massagué J. Receptors for the TGF-beta family. *Cell.* 1992 69:1067-70, 1992.
- Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 2000 Apr 17;19(8):1745-54.
- Matziolis G, Erli HJ, Rau HM, Klever P, Bosserhoff AK, & Paar O. Heparin facilitates proliferation of human osteoblasts in vitro. *Orthopade.* 31:575-81, 2002.
- Merry CL, Gallagher JT. New insights into heparan sulphate biosynthesis from the study of mutant mice. *Biochem Soc Symp.* 69:47-57, 2002.
- Mitropoulou TN, Theocharis AD, Stagiannis KD & Karamanos NK. Identification, quantification and fine structural characterization of glycosaminoglycans from uterine leiomyoma and normal myometrium. *Biochimie.* 83:529-36, 2001.
- Mitropoulou TN, Tzanakakis GN, Nikitovic D, Tsatsakis A & Karamanos NK. 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, 2002.
- Miyake K, Underhill CB, Lesley J & Kincade PW. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med.* 172:69-75, 1990.
- Modrowski D, Baslé M, Lomri A & Marie PJ. Syndecan-2 is involved in the mitogenic activity and signaling of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in osteoblasts. *J Biol Chem.* 275:9178-85, 2000.

- Modrowski D, Orosco A, Thévenard J, Fromigué O & Marie PJ. Syndecan-2 overexpression induces osteosarcoma cell apoptosis: Implication of syndecan-2 cytoplasmic domain and JNK signaling. *Bone*. 37:180-9, 2005.
- Moscattello DK, Santra M, Mann DM, McQuillan DJ, Wong AJ & Iozzo RV. Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest*. 101:406-12, 1998.
- Moursi AM, Damsky CH, Lull J, Zimmerman D, Doty SB, Aota S & Globus RK. Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Sci*. 109:1369-80, 1996.
- Moursi AM, Globus RK, Damsky CH. Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Sci*. 110 (Pt 18):2187-96, 1997.
- Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I & Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int*. 51:1376-82, 1997.
- Murata K & Yokoyama Y. Dermatan sulfate isomers in human articular cartilage characterized by high-performance liquid chromatography. *Biochem Int*. 1:87-94, 1987.
- Murrill WB, Brown NM, Zhang JX, Manzillo PA, Barnes S, Lamartiniere CA. Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. *Carcinogenesis*. 17:1451-7, 1996.
- Nakamura H & Ozawa H. Immunohistochemical localization of heparan sulfate proteoglycan in rat tibiae. *J Bone Miner Res*. 9:1289-99, 1994.
- Narayanan S. Sialic acid as a tumor marker. *Ann Clin Lab Sci*. 1994 Jul-Aug;24(4):376-84, 1994.
- Nelson-Piercy C. *Scand J Rheumatol Suppl*. 107:68-71, 1998.
- Nesti LJ, Caterson EJ, Wang M, Chang R, Chapovsky F, Hoek JB & Tuan RS TGF-beta1 calcium signaling increases alpha5 integrin expression in osteoblasts. *J Orthop Res*. 20:1042-9, 2002.
- Nilsson B, Nakazawa K, Hassell JR, Newsome DA & Hascall VC. Structure of oligosaccharides and the linkage region between keratan sulfate and the core protein on proteoglycans from monkey cornea. *J Biol Chem*. 10:6056-63, 1983.
- Ninomiya K, Miyamoto T, Imai J, Fujita N, Suzuki T, Iwasaki R, Yagi M, Watanabe S, Toyama Y, & Suda T. Osteoclastic activity induces osteomodulin expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 362:460-6, 2007.
- Noda M & Camilliere JJ. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology*. 124:2991-4, 1989.
- Noonan DM, Fulle A, Valente P, Cai S, Horigan E, Sasaki M, Yamada Y, Hassell JR. The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem*. 266:22939-47, 1991.
- Noonan DM, Hassell JR. Perlecan, the large low-density proteoglycan of basement membranes: structure and variant forms. *Kidney Int*. 43:53-60, 1993.
- Nishida Y, Knudson W, Knudson CB & Ishiguro N. Antisense inhibition of hyaluronan synthase-2 in human osteosarcoma cells inhibits hyaluronan retention and tumorigenicity. *Exp Cell Res*. 307:194-203, 2005.
- Oh ES & Couchman JR. Syndecans-2 and -4; close cousins, but not identical twins. *Mol Cells*. 17:181-7, 2004.

- Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K & Heinegård D. A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO J.* 8:2601-4,1989.
- Olsen BR. Life without perlecan has its problems. *J Cell Biol.* 147:909-12, 1999.
- Oreffo RO, Mundy GR, Seyedin SM & Bonewald LF. Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 158:817-23, 1989.
- Παπαδημητρίου Κ. : Ειδική Παθολογική Ανατομική. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας Αθήνα 295-306, 1990.
- Peterson G Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J Nutr.* 125(3 Suppl):784S-789S,1995.
- Rabenstein DL. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep.*:312-31, 2002.
- Rahimi RA, & Leof EB. TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J Cell Biochem.* 102:593-608, 2007.
- Rahmani M, Wong BW, Ang L, Cheung CC, Carthy JM, Walinski H & McManus BM. Versican: signaling to transcriptional control pathways. *Can J Physiol Pharmacol.* 84:77-92, 2006.
- Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J Biol Chem.* 267:19536-47, 1992.
- Raouf A, Ganss B, McMahon C, Vary C, Roughley PJ & Seth A. Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix. *Matrix Biol.* 21:361-7, 2002.
- Reardon AJ, Le Goff M, Briggs MD, McLeod D, Sheehan JK, Thornton DJ & Bishop PN. 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, 2000.
- Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB, & Roberts AB. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *J Cell Biol.* 105:457-63, 1987.
- Rodan GA & Noda M. Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1:85-98, 1991.
- Rodan SB, Wesolowski G, Yoon K, & Rodan GA. Opposing effects of fibroblast growth factor and pertussis toxin on alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, and type I collagen mRNA levels in ROS 17/2.8 cells. *J Biol Chem.* 64:19934-41,1989.
- Rodén L, Ananth S, Campbell P, Curenton T, Ekborg G, Manzella S, Pillion D & Meezan E. Heparin-an introduction. *Adv Exp Med Biol.* 313:1-20, 1992.
- Rosenberg LC, Choi HU, Tang LH, Johnson TL, Pal S, Webber C, Reiner A & Poole AR. Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *J Biol Chem.* 260:6304-13, 1985.
- Συμεωνιδης Π. Π. : Ορθοπαιδική, Κακοήθη νεοπλασμάτα των οστών. University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 401-408, 1999.
- Sanderson, RD, Turnbull, JE, Gallagher, JT. & Lander, AD. Fine structure of heparan sulfate regulates syndecan-1 function and cell behaviour. *J. Biol. Chem.*, 269:13100-13106, 1994.
- Santra M, Mann DM, Mercer EW, Skorski T, Calabretta B & Iozzo RV. Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Clin Invest.* 1997 Jul 1;100(1):149-57.

- Säämänen AM, Salminen HJ, Rantakokko AJ, Heinegård D & Vuorio EI. Murine fibromodulin: cDNA and genomic structure, and age-related expression and distribution in the knee joint. *Biochem J.* 355:577-85, 2001.
- Saika S, Shiraishi A, Liu CY, Funderburgh JL, Kao CW, Converse RL & Kao WW. Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing. *J Biol Chem.* 275:2607-12, 2000.
- Saika S, Miyamoto T, Tanaka S, Tanaka T, Ishida I, Ohnishi Y, Ooshima A, Ishiwata T, Asano G, Chikama T, Shiraishi A, Liu CY, Kao CW & Kao WW. Response of lens epithelial cells to injury: role of lumican in epithelial-mesenchymal transition. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:2094-102, 2003.
- Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB. Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol.* 107:743-51, 1998.
- Sandy J, Davies M, Prime S & Farndale R. Signal pathways that transduce growth factor-stimulated mitogenesis in bone cells. *Bone.* 23:17-26, 1998.
- Santra M, Eichstetter I & Iozzo RV. An anti-oncogenic role for decorin. Down-regulation of ErbB2 leads to growth suppression and cytodifferentiation of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem.* 275:35153-61, 2000.
- Santra M, Reed CC, Iozzo RV. Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. *J Biol Chem.* 277:35671-81, 2002.
- Sasisekharan R & Venkataraman G. Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr Opin Chem Biol.* 4:626-31, 2000.
- Schlessinger J & Ullrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron.* 9:383-91, 1992.
- Seidler DG, Goldoni S, Agnew C, Cardi C, Thakur ML, Owens RT, McQuillan DJ & Iozzo RV. Decorin protein core inhibits in vivo cancer growth and metabolism by hindering epidermal growth factor receptor function and triggering apoptosis via caspase-3 activation. *J Biol Chem.* 281:26408-18, 2006.
- Seyedin SM, Thompson AY, Bentz H, Rosen DM, McPherson JM, Conti A, Siegel NR, Galluppi GR & Piez KA. Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 261:5693-5, 1987.
- Schedlich LJ, Flanagan JL, Crofts LA, Gillies SA, Goldberg D, Morrison NA, Eisman JA. Transcriptional activation of the human osteocalcin gene by basic fibroblast growth factor. *J Bone Miner Res.* 9:143-52, 1994.
- Shinomura T, Nishida Y, Ito K, & Kimata K. cDNA cloning of PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan expressed during chondrogenesis in chick limb buds. Alternative spliced multiforms of PG-M and their relationships to versican. *J. Biol. Chem* **268**, pp. 14461-14469.
- Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 3:807-21, 2003.
- Sillanauke P, Pönniö M, Jääskeläinen IP. Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur J Clin Invest.* 29:413-25, 1999.
- Singer II, Scott S, Kawka DW & Hassell JR. Extracellular matrix fibers containing fibronectin and basement membrane heparan sulfate proteoglycan coalign with focal contacts and microfilament bundles in stationary fibroblasts. *Exp Cell Res.* 173:558-71, 1987.

- Sommarin Y, Wendel M, Shen Z, Hellman U and Heinegård D. 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, 1998.
- Song Y, Hui JN, Fu KK & Richman JM. Control of retinoic acid synthesis and FGF expression in the nasal pit is required to pattern the craniofacial skeleton. *Dev Biol.* 276:313-29, 2004.
- Sugahara K, Ohkita Y, Shibata Y, Yoshida K & Ikegami A. Structural studies on the hexasaccharide alditols isolated from the carbohydrate-protein linkage region of dermatan sulfate proteoglycans of bovine aorta. Demonstration of iduronic acid-containing components. *J Biol Chem.* 270:7204-12, 1995.
- Sugahara K & Kitagawa H. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr Opin Struct Biol.* 10:518-27, 2000.
- Sugahara K, Mikami T, Uyama T, Mizuguchi S, Nomura K & Kitagawa H. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol.* 13:612-20, 2003.
- Sugahara K & Kitagawa H. Heparin and heparan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life.* 54:163-75, 2002.
- Svensson L, Närlid I & Oldberg A. Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils. *FEBS Lett.* 470:178-82, 2000.
- Syrokou A, Tzanakakis G, Tsegenidis T, Hjerpe A & Karamanos NK. Effects of glycosaminoglycans on proliferation of epithelial and fibroblast human malignant mesothelioma cells: a structure-function relationship. *Cell Prolif.* 32:85-99, 1999.
- Taichman RS, Reilly MJ & Emerson SG. Human osteosarcomas inhibit hematopoietic colony formation: partial reversal by antibody to transforming growth factor-beta 1. *Bone.* 21:353-61, 1997.
- Tallquist M & Kazlauskas A. PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15:205-13, 2004.
- Takada T, Katagiri T, Ifuku M, Morimura N, Kobayashi M, Hasegawa K, Ogamo A & Kamijo R. Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem.* 278:43229-35, 2003.
- Takeuchi Y, Kodama Y & Matsumoto T. Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J Biol Chem.* 269:32634-8, 1994.
- Takeuchi Y, Fukumoto S & Matsumoto T. Relationship between actions of transforming growth factor (TGF)-beta and cell surface expression of its receptors in clonal osteoblastic cells. *J Cell Physiol.* 162:315-21, 1995.
- Tanaka H, Ogasa H, Barnes J & Liang CT. Actions of bFGF on mitogenic activity and lineage expression in rat osteoprogenitor cells: effect of age. *Mol Cell Endocrinol.* 150:1-10, 1999.
- Tanner ME. The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Bioorg Chem.* 33:216-28, 2005.
- Taylor SS, Radzio-Andzelm E & Hunter T. How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *FASEB J.* 9:1255-66, 1995.
- Telser A, Robinson HC & Dorfman A. The biosynthesis of chondroitin-sulfate protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 54:912-9, 1965.
- Telser A, Robinson HC & Dorfman A. The biosynthesis of chondroitin sulfate. *Arch Biochem Biophys.* 116:458-65, 1966.
- Tenenbaum HC & Hunter GK. Chondroitin sulfate inhibits calcification of bone formed in vitro. *Bone Miner.* 2:43-5, 1987.

- Tominaga S. Cancer incidence in Japanese in Japan, Hawaii, and western United States. *Natl Cancer Inst Monogr.* 69:83-92,1985.
- Tufvesson E & Westergren-Thorsson G. Tumour necrosis factor-alpha interacts with biglycan and decorin. *FEBS Lett.* 530:124-8, 2002.
- Turnbull, J.E. and Gallagher, J.T. Distribution of iduronate 2-sulphate in heparan sulphate. *Biochem. J.*, 273:553-559, 1991.
- Tzanakakis GN, Hjerpe A & 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.* 79:323-32, 1997.
- Tzanakakis GN, Syrokou A, Kanakis I & Karamanos NK. Determination and distribution of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids in culture media and cell-associated glycoconjugates from human malignant mesothelioma and adenocarcinoma cells. *Biomed Chromatogr.* 20:434-9, 2006.
- Ungefroren H, Cikos T, Krull NB & Kalthoff H. Biglycan gene promoter activity in osteosarcoma cells is regulated by cyclic AMP. *Bioch Bioph Res Comm.* 235: 413-417, 1997.
- Unni KK. *J Orthop Sci* 5: 287-94, 1998.
- Vidal O, Kindblom LG & Ohlsson C. Expression and localization of estrogen receptor-beta in murine and human bone. *J Bone Miner Res.* 14:923-9, 1999.
- Vihinen P, Riikonen T, Laine A & Heino J. Integrin alpha 2 beta 1 in tumorigenic human osteosarcoma cell lines regulates cell adhesion, migration, and invasion by interaction with type I collagen. *Cell Growth Differ.* 7:439-47, 1996.
- Vogel KG, Paulsson M & Heinegård D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J.* 223:587-97, 1984.
- Vogel KG & Trotter JA. The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Coll Relat Res.* 7:105-14, 1987.
- Volpi N, Bolognani L, Conte A & Petrini M. Effects of chondroitin sulfates with different structures on leukemia cells: U-937 cell proliferation and differentiation. *Leuk Res.* 1993 Sep;17(9):789-98.
- Volpi N, Petrini M, Conte A, Valentini P, Venturelli T, Bolognani L & Ronca G. Effects of glycosaminoglycans on U-937 leukemia cell proliferation and differentiation: structure-function relationship. *Exp Cell Res.* 215:119-30, 1994.
- Waddington RJ & Langley MS. Structural analysis of proteoglycans synthesized by mineralizing bone cells in vitro in the presence of fluoride. *Matrix Biol.* 17:255-68, 1998.
- Weber IT, Harrison RW & Iozzo RV. Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem.* 271:31767-70, 1996.
- Wergedal JE, Mohan S, Lundy M, Baylink DJ. Skeletal growth factor and other growth factors known to be present in bone matrix stimulate proliferation and protein synthesis in human bone cells. *J Bone Miner Res.* 5:179-86,1990.
- Westergren-Thorsson G, Persson S, Isaksson A, Onnervik PO, Malmström A & Fransson LA. L-iduronate-rich glycosaminoglycans inhibit growth of normal fibroblasts independently of serum or added growth factors. *Exp Cell Res.* 206:93-9, 1993.
- Wright TC Jr, Castellot JJ Jr, Petitou M, Lormeau JC, Choay J & Karnovsky MJ. Structural determinants of heparin's growth inhibitory activity. Interdependence of oligosaccharide size and charge. *J Biol Chem.* 264:1534-42, 1989.

Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, Bonadio J, Boskey A, Heegaard AM, Sommer B, Satomura K, Dominguez P, Zhao C, Kulkarni AB, Robey PG & Young MF. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet.* 20:78-82, 1998.

Yamagata M & Kimata K. Repression of a malignant cell-substratum adhesion phenotype by inhibiting the production of the anti-adhesive proteoglycan, PG-M/versican. *J Cell Sci.* 107:2581-90, 1994.

Yu Y, Harris RI, Yang JL, Anderson HC & Walsh WR. Differential expression of osteogenic factors associated with osteoinductivity of human osteosarcoma cell lines. *J Biomed Mater Res A.* 70:122-8, 2004.

Zava DT & Duwe G. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. *Nutr Cancer.* 27:31-40, 1997.

Zhang Y, Cao L, Yang BL & Yang BB The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs. *J. Biol. Chem.* 273:21342-21351, 1998.

Zhang Y, Wu Y, Cao L, Lee V, Chen L, Lin Z, Kiani C, Adams ME & Yang BW Versican modulates embryonic chondrocyte morphology via the epidermal growth factor-like motifs in G3. *Exp. Cell Res* 263:33-42, 2001.

Zhou, FY, Owens RT, Hermonen J, Jalkanen M & Höök, M. Is the sensitivity of cells for FGF-1 and FGF-2 regulated by cell surface heparan sulfate proteoglycans? *Eur. J. Cell Biol* 73:166-174, 1997.

Zimmermann DR & Ruoslahti E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *EMBO J.* 8:2975-81, 1989.

Παράρτημα 1-7

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Dragana Nikitovic-TZANAKAKH

Κάτοχος MSc στη Βιοχημεία (Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Sweden)

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο: Ντράγκανα Νικίτοβιτς-Τζανακάκη
Διεύθυνση: Ματζαπετάκη 14, Ηράκλειο, Ελλάδα
Τόπος & Έτος Γεννήσεως: 30 Σεπτεμβρίου, 1963
Βελιγράδι, Γιουγκοσλαβία
Υπηκοότητα: Ελληνική
Οικογενειακή Κατάσταση: Έγγαμος με δύο παιδιά
Ξένες Γλώσσες: Αγγλικά, Σουηδικά, Σερβικά
Τηλέφωνα: Εργασίας: 2810-394735
Σπιτιού: 2810-326591

Προπτυχιακές σπουδές:

06/1983: Απολυτήριο 5^{ου} Γυμνασίου Βελιγραδίου
12/1992: Πτυχίο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Παν/μίου Βελιγραδίου

Μεταπτυχιακές σπουδές:

01/93-09/93: Μεταπτυχιακή ερευνητική υποτροφία, Overseas Research Students Awards Scheme: Result of 1993 competition, Queen Mary and Westfield College, University of London. με αντικείμενο "Long-term regulation of pyruvate dehydrogenase kinase in culture rat cardiac myocytes". Επιστημονική Υπεύθυνη: Professor Mary Sugden

- 10/93-08/98: Εκπόνηση Master, στο Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, S-171 77, Sweden.
 Τίτλος: “Aspects of thiol redox control involving the thioredoxin system, nitric oxide and selenocompounds” Επιστημονικός Υπεύθυνος: Arne Holmgren Professor of Medical Biochemistry, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden
- 04/02-Σήμερα: Υποψήφια Διδάκτωρ του Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής, Τομέα Μορφολογίας, με τίτλο “In vitro μελέτη της δράσης αυξητικών παραγόντων και κινάσης της τυροσίνης στην οργάνωση του εξωκυττάριου δικτύου κυτταρικών σειρών οστεοσαρκώματος”. Επιστημονικός Υπεύθυνος: Τσατσάκης Αριστείδης, Αναπλ. Καθηγητής Τοξικολογίας

Προϋπηρεσία:

- 09/93-08/95: Ερευνήτρια με σύμβαση ανάθεσης έργου στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Role of thioredoxin in carcinogenesis» που χρηματοδοτήθηκε από Swedish Cancer Society 961, Επιστημονικός Υπεύθυνος: Arne Holmgren Professor of Medical Biochemistry, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden
- 09/95-11/96: Έμμισθος επιστημονικός συνεργάτης στο Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. Καθηγητής: Arne Holmgren Professor of Medical Biochemistry. Υποχρέωση έργου: 80% έρευνα και 20% διδασκαλία
- 05/97-08/97: Έμμισθος επιστημονικός συνεργάτης στο Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. Καθηγητής: Arne Holmgren Professor of Medical Biochemistry. Υποχρέωση έργου: 80% έρευνα και 20% διδασκαλία
- 04/98-08/98: Έμμισθος επιστημονικός συνεργάτης στο Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. Καθηγητής: Arne Holmgren Professor of Medical Biochemistry. Υποχρέωση έργου: 80% έρευνα και 20% διδασκαλία
- 11/99-03/00: Έμμισθος επιστημονικός συνεργάτης με σύμβαση ανάθεσης έργου στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «ΕΠΕΑΕΚ- Προγράμματα Σπουδών-Συγγράμματα ‘ΠΡΟΜΗΘΕΑΣ’ που χρηματοδοτήθηκε από το ΥΠ.Ε.Π.Θ, στο εργαστήριο Ιστολογίας, Τομέα Μορφολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Επιστημονικός Υπεύθυνος: Τζανακάκης Γιώργος, αναπλ. Καθηγητής
- 12/99-11/04: Έμμισθος επιστημονικός συνεργάτης με σύμβαση ανάθεσης έργου στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Μελέτη του

αυτόνομου νευρικού συστήματος & του αιφνίδιου θανάτου σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια» στην Καρδιολογική Κλινική, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Επιστημονικός Υπεύθυνος: Βάρδας Παναγιώτης, Καθηγητής Καρδιολογίας

- 01/93-09/93: Άμισθος επιστημονικός συνεργάτης στο Biochemical Department of Queen Mary and Westfield College, University of London. Επιστημονική Υπεύθυνη: Professor Mary Sugden
- 10/98-11/04: Άμισθος επιστημονικός συνεργάτης στα εργαστήρια Ιστολογίας, Επιστημονικός Υπεύθυνος: Τζανακάκης Γιώργος, αναπλ. Καθηγητής και Τοξικολογίας, Επιστημονικός Υπεύθυνος: Τσατσάκης Αριστείδης, αναπλ. Καθηγητής, Τομέας Μορφολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 11/04-Σήμερα: Σε θέση ΕΙΔΙΠ ΙΙ στο εργαστήριο της Ιστολογίας, Τομέας Μορφολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Πτυχία & Τίτλοι:

- 12/1992: Πτυχίο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστημίου Βελιγραδίου. (Γενικός βαθμός «Άριστα»)
- 08/1998: Απόκτηση Master διπλώματος, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Sweden.
- 06/1998: Αναγνώριση του τίτλου σπουδών Βιοχημείας από το ΔΙ.Κ.Α.Τ.Σ.Α

Διδακτική πείρα:

- 01/94-11/96: Εκπαίδευση-σεμινάρια εργαστηριακών ασκήσεων των φοιτητών της Ιατρικής του Karolinska Institute
- 11/04- Σήμερα: Εκπεύδευση μεταπτυχιακών φοιτητών σε εργαστηριακές ασκήσεις και τεχνικές που αφορούν την μεταπτυχιακή τους εργασία

Οργανωτική εμπειρία:

- 1993-1998: Συμμετοχή στην οργάνωση και λειτουργία του Εργαστηρίου Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Sweden σε νέες μεθόδους έρευνας που αφορούσαν την επίδραση του μονοξειδίου του αζώτου στην λειτουργία-ρύθμιση των ενζύμων.

Περιοχές επιστημονικού ενδιαφέροντος:

1. Βιοχημική ανάλυση και μελέτη της δομής των πρωτεογλυκανών και των γλυκοζαμινογλυκανών σε καλλιέργειες καλοήθων και κακοήθων ανθρώπινων όγκων.
2. Επίδραση των παραγόντων ανάπτυξης (growth factors) στη δομή και τις ιδιότητες των πρωτεογλυκανών και γλυκοζαμινογλυκανών καλοήθων και κακοήθων κυττάρων.

Δημοσιεύσεις:

Σε διεθνή περιοδικά:

1. **Nikitovic D.** and Holmgren A: S-Nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J Biol Chem*, 271: 19180-19185, 1996.
2. Holmgren A., Arner E. S. J., Aslund F., Bjornstedt M., Liang wei Z., Ljung J., Nakamura H., **Nikitovic D.**: Oxidative stress in cancer, aids and other diseases, pp. 229-246. Publishers Montagnier/Olivier/Pasquier, 1998.
3. **Nikitovic D.**, Holmgren A., Spyrou G: Inhibition of AP-1 DNA binding by nitric oxide involving conserved cysteine residues in jun and fos. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 242: 109-112, 1998.
4. Tsatsakis AM., Tsakiris IN., Maxaira K., Christakis-Hampsas M., **Tzanakakis-Nikitovic D.**, Niklis N: Assesment of safe harvesting after methyl parathion application in peaches. *Bull Environ Contam Toxicol* 68: 824-830, 2002.
5. **Nikitovic D.**, Zacharis EA., Manios EG., Malliaraki NE., Kanoupakis EM., Sfridaki KI., Skalidis EI., Margioris AN., Vardas PE. Plasma levels of Nitrites/ Nitrates in patients with chronic atrial fibrillation are increased after electrical restoration of sinus rhythm. *J Inern Card Electrophysiol.*7:171-6, 2002.
6. Tsakiris IN., Toutoudaki M., **Nikitovic DP.**, Danis TG., Stratis IA., Tsatsakis AM. Field study for degradation in apples cultivated with integrated crop management system. *Bull Environ Contam Toxicol.* 69:771-8, 2002.
7. Mitropoulou TN., Tzanakakis GN., **Nikitovic D.**, Tsatsakis A., 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.* 22:2841-6, 2002.
8. **Nikitovic D.**, Tsatsakis AM., Karamanos NK., Tzanakakis GN. The effects of genistein on synthesis and distribution of glycosaminoglycans/proteoglycans by the two osteosarcoma cell lines depends on the tyrosine kinase and the estrogen receptor density. *Anticancer Res.* 23:459-64, 2003.

9. Parthenakis FI., Patrianakos AN., Diakakis GF., Mavrakis HE., **Nikitovic D.**, Saatsaki MC., Vardas PE. Left ventricular filling pattern and neurohumoral activation in heart failure. Relationship to exercise tolerance. *Am J. Cardiol.* 91:1190-4, 2003.
10. Tsakiris IN., Danis TG., Stratis IA., **Nikitovic D.**, Alegakis AK., Tsatsakis AM. Monitoring of pesticide residues in fresh peaches produced under conventional and integrated crop management. *Food Additives & Contaminants* 21: 670-677, 2004.
11. Patrianakos AN., Parthenakis FI., Diakakis GF., Mavrakis HE., Tzerakis PG., **Nikitovic D.**, Vardas PE. Restrictive filling pattern is associated with increased humoral activation and impaired exercise in dilated cardiopathy. *Eur J Heart Fail* 6:735-43, 2004.
12. Mitropoulou T., **Nikitovic D.**, Theocharis AD., Karamanos N., Tzanakakis GN. IGF-I affects synthesis of GAGs/PGs by epithelial breast cancer cells through a tyrosine kinase pathway. *Biochemie* 86:251-9, 2003.
13. **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.* 25:2851-2856, 2005.
14. Germanakis I, Kalmanti M, Parthenakis F, **Nikitovic D.**, Stiakaki E, Patrianakos A, and Vardas PE. (2006) Correlation of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels with left ventricle mass in children treated with anthracyclines. *Int J Cardiol.* 108:212-5, 2006.
15. Marketou ME, Zacharis EA, **Nikitovic D.**, Ganotakis ES, Parthenakis FI, Maliaraki N, and Vardas PE. Early effects of simvastatin versus atorvastatin on oxidative stress and proinflammatory cytokines in hyperlipidemic subjects. *Angiology.* 2006 Mar-Apr;57(2):211-8.
16. **Nikitovic D.**, Zafiroopoulos A, Katonis P, Tsatsakis A, Theocharis AD, Karamanos NK and Tzanakakis GN. (2006) Transforming growth factor-beta as a key molecule triggering the expression of versican isoforms v0 and v1, hyaluronan synthase-2 and synthesis of hyaluronan in malignant osteosarcoma cells. *IUBMB Life.* 58:47-53, 2006.
17. Tzanakakis GN, **Nikitovic D.**, Katonis P, Kanakis I and Karamanos NK. Expression and distribution of N-acetyl and N-glycolylneuraminic acids in secreted and cell-associated glycoconjugates by two human osteosarcoma cell lines. *Biomed Chromatogr.* 21:406-409, 2006.
18. Karakitsos D, Patrianakos AP, Parthenakis FI, Malliaraki N, **Nikitovic D.**, Kyriazis J, Karabinis A, Groothoff JW, de Groot E, Fourtounas C, Daphnis E and Vardas PE. Altered proximal aortic stiffness and endothelin plasma levels in diabetic patients with end-stage renal disease. *ASAIO J.* 53:343-50, 2007.
19. 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.* 27:4101-6, 2007.

20. **Nikitovic D**, Berdiaki A, Zafiropoulos A, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos N.K and Tzanakakis GN. (2008) Lumican expression is positively correlated with human osteosarcoma cell differentiation and negatively with their growth. *FEBS J.* 275: 350-361, 2008.

21. **Nikitovic D**, Assouti M, Sifaki M, Katonis P, Krasagakis K, Karamanos NK and Tzanakakis GN. 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, 2008.

22. Zafiropoulos A, **Nikitovic D**, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK and Tzanakakis GN. MG63 osteosarcoma cells evade the decorin-induced growth arrest by the protracted expression and activation of EGFR. *In press: Molecular Cancer Res* (2008)

23. **Nikitovic D**, Berdiaki K, Chalkiadaki G, Karamanos K and Tzanakakis G (2008) The role of SLRP-proteoglycans in osteosarcoma pathogenesis *In press: Connect Tissue Res* (2008).

24. Chatzinikolaou G, **Nikitovic D**, Asimakopoulou A, Tsatsakis A, Karamanos N.K. and Tzanakakis G.N. Heparin is a unique stimulator of human colon cancer cells' growth. *In press: IUBMB Life.* (2008)

Ανακοινώσεις σε συνέδρια:

Διεθνή

1. Kuprin S., **Nikitovic D.**, Holmgren A: Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by selenide. 24th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Barcelona, July 7-12, 1996. Abstract 45.

2. Holmgren A., Arner E., Bjornstedt M., **Nikitovic D.**, Aslund F., Liangwei Z., Nakamura H: Redox regulation by the thioredoxin and glutaredoxin systems. Institut Pasteur, Paris, May 21-24, 1996. Abstract 65.

3. E. Skalidis, **D. Nikitovic**, E. Zacharis, E. Manios, N. Malliaraki, E. Kanoupakis, H. Mavrakakis, S. Chrysostomakis, A. Margioris, P. Vardas. Nitric Oxide Bioactivity Returns to Physiologic After Restoration of Sinus Rhythm in Patients With Chronic Atrial Fibrillation. NASPE 2001, 22nd Annual Scientific Sessions Boston, MA, Hynes Convention Center, May 2-5, 2001

4. **Nikitovic D**, Karamanos NK, Tzanakakis GN *In vitro* effects of genistein on synthesis and distribution of glycosaminoglycans/proteoglycans by osteosarcoma cell lines. XVII th

Federation of the European Connective Societies Meeting, Brighton, UK, 27-31 July, 2002. Abstract P125.

5. **Nikitovic D**, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Synthesis of glycosaminoglycans by osteosarcoma cell lines in culture and its dependence on various growth factors. XVII th Federation of the European Connective Societies Meeting, Brighton, UK, 27-31 July, 2002. Abstract P131.

6. Mitropoulou TN., Tzanakakis GN., **Nikitovic D.**, Tsatsakis A., Karamanos NK. *In vitro* effects of genistein on synthesis and distribution of glycosamino/proteoglycans by estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer epithelial cells. XVII th Federation of the European Connective Societies Meeting, Brighton, UK, 27-31 July, 2002. Abstract P78.

7. Parthenakis FI., Patrianakos AN., Chrysostomakis EN., Simantirakis EN., Tzerakis PG., **Nikitovic D.**, Vardas PE. The atrial fibrillation as an independent factor of increased circulating pro-inflammatory cytokines levels in heart failure. European Society of Cardiology Congress, Berlin, Germany, 31 August- 4 September, 2002. Abstract Supplement Vol. 23, P1999.

8. Marketou ME, Simantirakis EN., **Nikitovic D.**, Chrysostomakis SI., Tzerakis PG., Klapsinos NC., Vardas PE. Impact of asynchronous ventricular activation sequence on cytokine activation and oxidative stress in paced patients. European Society of Cardiology Congress, Berlin, Germany, 31 August- 4 September, 2002. Abstract Supplement Vol. 23, P1296.

9. Parthenakis FI., Patrianakos AN., Diakakis GF., Mavrakis HE., **Nikitovic D.**, Saatsaki MC., Vardas PE. Left ventricular filling pattern and neurohumoral activation in heart failure. Relationship to exercise tolerance. European Society of Cardiology Congress, Berlin, Germany, 31 August- 4 September, 2002. Abstract Supplement Vol. 23, P1739.

10. Zacharis EA., **Nikitovic DP.**, Manios EG., Kanoupakis EM., Mavrakis HE., Skalidis EI., Margioris AN., Vardas PE. Plasma levels of nitric oxide return to physiological after cardioversion in patients with chronic atrial fibrillation. . European Society of Cardiology Congress, Berlin, Germany, 31 August- 4 September, 2002. Abstract 82076.

11. F.I. Parthenakis, A.P.Patrianakos, G.F.Diakakis, E.A.Papadimitriou, **D.Nikitovic**, D.C. Kambouraki, P.E. Vardas. Relationship of myocardial inotropic reverse and neurohumoral activation in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. (Board 294) Heraklion University Hospital, Cardiology Dept. Heraklion, Greece European Journal of Echocardiography, Dec 2002, Volume 3, Supplement I, S32.

12. M.E.Marketou, E.N.Simantirakis, **D.Nikitovic**, S.I.Chrysostomakis, K.E.Vardakis, N.C.Klapsinos, P.E.Vardas Impact of Asynchronous Ventricular Activation Sequence on Cytokine Activation and Oxidative Stress in Paced Patients. March 19, 2003, American College of Cardiology, 52st Annual Scientific Session. Board 129

13. D. **Nikitovic**, AM. Tsatsakis, A. Zafiroopoulos, NK. Karamanos and GN. Tzanakakis TGF-b2 regulates osteosarcoma cells growth by modulating the biosynthesis of glycosaminoglycans/ proteoglycans. XIX th Meeting of the Federation of the European

Connective Tissue Societies, Taormina-Giardini Naxos, Italy, 9-13 July, 2004. (Abstract PJ29)

14. **D. Nikitovic**, AM. Tsatsakis, A. Zafiropoulos, NK. Karamanos and GN. Tzanakakis. TGF-B2 by modulating the biosynthesis of glycosaminoglycans/proteoglycans may regulate osteosarcoma cell growth. Seventh International Conference of Anticancer Research, Corfu, Greece, October 25-30, 2004 (Abstracts 357).

15. **D. Nikitovic**, A. Zafiropoulos., AM. Tsatsakis, NK. Karamanos and Tzanakakis GN. Normal and cancerous osteoblastic cells display distinct differences in the expression of matrix chondroitin sulphate proteoglycans. 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary, July 2-7, 2005 (Abstract D1-035P).

16. **D. Nikitovic**, A. Zafiropoulos, E. Phenou, A. Tsatsakis, NK. Karamanos and Tzanakakis GN. The role of TGF-B in regulating gene expression and biosynthesis of matrix macromolecules in human osteosarcoma. 10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Crete, Greece, October 13-15, 2005 (Abstract 312)

17. A. Zafiropoulos, **D. Nikitovic**, E. Phenou, A. Tsatsakis, NK. Karamanos and Tzanakakis GN. Biosynthetic pathways of matrix proteoglycans decorin and biglycan, are differentially regulated between tumor and normal osteoblastic cells. 10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Crete, Greece, October 13-15, 2005 (Abstract 313)

18. A. Zafiropoulos, **D. Nikitovic**, E. Pthenou, A. Tsatsakis, NK. Karamanos and GN. Tzanakakis. Biosynthetic pathways of matrix proteoglycans decorin and biglycan, are differentially regulated between tumor and normal osteoblastic cells. 10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Crete, Greece, October 13-15, 2005 (Abstract 313)

19. A. Zafiropoulos, A. Berdiaki, E. Fthenou, **D. Nikitovic** and Tzanakakis GN. MG-63 osteosarcoma cells are resistant to decorin induced cell cycle arrest. FECTS XXth & ISMB meeting, Oulu, Finland, July 1-5, 2006 (Abstract E3476).

20. G. Chazinikolaou, **D. Nikitovic** and GN. Tzanakakis. 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).

21. **D. Nikitovic**, M. Assouti, A. Zafiropoulos and GN. Tzanakakis. TGF-b2 differentially regulates lumican and biglycan expression in two human osteosarcoma cell lines. 31st FEBS Congress, Istanbul, Turkey, June 24-29, 2006 (Abstract PP-696).

22. M. Assouti, M. Sifaki, A. Berdiaki, **D. Nikitovic** and GN. Tzanakakis.. A novel finding of lumican expression in human malignant melanoma cell lines. 31st FEBS Congress, Istanbul, Turkey, June 24-29, 2006 (Abstract PP-698).

23. A. Zafiropoulos, **D. Nikitovic**, P. Katonis, A. Tsatsakis, NK. Karamanos and GN. Tzanakakis. MG-63 osteosarcoma cells evade the decorin-induced growth arrest by the

protracted expression and activation of EGFR. FEBS Advanced Lecture Course, Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets, Patras, Greece, May 21-26, 2007. P 25

24. E. Fthenou, A. Zafiropoulos, **D. Nikitovic**, K. Dobra, A. Hjerpe and GN. Tzanakakis. Specific syndecan-1 domains distinctly regulates fibrosarcoma migration. FEBS Advanced Lecture Course, Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets, Patras, Greece, May 21-26, 2007. P 66

25. G Chatzinikolaou, **D. Nikitovic**, A. Berdiaki and GN. Tzanakakis. Protein tyrosine kinase and estrogen receptor dependent pathways regulate the synthesis and distribution of glycosaminoglycans / proteoglycans produced by two human cancer cell lines. FEBS Advanced Lecture Course, Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets, Patras, Greece, May 21-26, 2007. P 69

26. G. Chatzinikolaou, **D. Nikitovic** and GN. Tzanakakis. 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

27. A. Berdiaki, **D. Nikitovic**, D. Panutsopoulos, DA. Spandidos., I. Hasoulas, GN. Tzanakakis and A. Zafiropoulos. The SRI/SRB-total balance is significantly altered in human coronary atheroma plaques. 32nd FEBS Congress Molecular Machines, Vienna, Austria, July 7-12, 2007. F1-105

Ελληνικά

1. **D.P. Nikitovic**, E.A. Ζάχαρης, E.Γ. Μανιός, N.E. Μαλλιαράκη, E.M. Κανουπάκης, H.E. Μαυράκης, E.I. Σκαλίδης, A.N. Μαργιωής, Π.Ε. Βάρδας. Πρώιμη βελτίωση της βιοδραστικότητας του οξειδίου του αζώτου (NO) μετά την ανάταξη σε φλεβοκομβικό ρυθμό ασθενών με χρόνια κολπική μαρμαρυγή. 21^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο Αθήνα, 2-4 Νοεμβρίου 2000. Ελληνική Καρδιολογική Επιθεώρηση 2000; 41 Συμπλ.Β, 282.

2. **D.P. Nikitovic**, N. Μαλλιαράκη, E. Ζάχαρης, E. Μανιός, E. Κανουπάκης, H. Μαυράκης, E. Σκαλίδης, A. Μαργιωής, Βάρδας Π. Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου σε ασθενείς με χρόνια κολπική μαρμαρυγή: Ο ρόλος των νιτρικών και νιτροδών ιόντων. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας, Αθήνα, 9-11 Νοεμβρίου 2000.

3. E.A. Ζάχαρης¹, **D.P. Nikitovic**², E.Γ. Μανιός¹, N.E. Μαλλιαράκη², E.M. Κανουπάκης¹, A.I. Σφυριδάκη², H.E. Μαυράκης¹, E.I. Σκαλίδης¹, A.N. Μαργιωής², Π.Ε. Βάρδας¹. Τα επίπεδα του οξειδίου του αζώτου βελτιώνονται μετά την ανάταξη σε φλεβοκομβικό ρυθμό σε ασθενείς με χρόνια κολπική μαρμαρυγή. 22^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, 22-24 Νοεμβρίου 2001 Ελληνική Καρδιολογική Επιθεώρηση 2001; Συμπλ.Β: 227.

4. A.Π.Πατριανάκος, Φ.Ι.Παρθενάκης, H.E.Μαυράκης E.A.Παπαδημητρίου, **D.Nikitovic**, E. Καλλέργης, Γ.Φ.Διακάκης, Π.Ε.Βάρδας. 23^ο Μεταβλητότητα των κυκλοφορούντων επιπέδων των προφλεγμονωδών κυτοκινών και του εξειδωτικού stress σε ασθενείς με ιδιοπαθή διατακτική μυοκαρδιοπάθεια. Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 30 Οκτωβρίου-2 Νοεμβρίου 2002. Ελληνική Καρδιολογική Επιθεώρηση 2002; Συμπλ. 418.

5. Α.Π.Πατριανάκος, Ε.Α.Παπαδημητρίου, Η.Ε.Μαυράκης, Γ.Φ.Διακάκης, **D.Nikitovic**, Φ.Ι.Παρθενάκης, Π.Ε.Βάρδας. Συσχέτιση του τύπου πλήρωσης της αρ. κοιλίας με τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυττοκινών και πεπτιδίων σε ασθενείς με ιδιοπαθή διατατική μυοκαρδιοπάθεια. 23^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 30 Οκτωβρίου-2 Νοεμβρίου 2002. Ελληνική Καρδιολογική Επιθεώρηση 2002; Συμπλ. 417.
6. Α.Π.Πατριανάκος, Φ.Ι.Παρθενάκης, Η.Ε.Μαυράκης, Ε.Α.Παπαδημητρίου, Γ.Φ.Διακάκης, **D.Nikitovic**, Π.Ε.Βάρδας. Η μειωμένη καρδιακή συμπαθητική νεύρωση συσχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυττοκινών που παρατηρούνται σε ασθενείς με ιδιοπαθή διατατική μυοκαρδιοπάθεια. 23^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 30 Οκτωβρίου-2 Νοεμβρίου 2002. Ελληνική Καρδιολογική Επιθεώρηση 2002; Συμπλ.13
7. **D. Nikitovic**, N.K. Karamanos, G.N. Tzanakakis. In vitro effects of genistein on synthesis and distribution of glycosaminoglycans/proteoglycans by osteosarcoma cell lines. Hellenic Connective Tissue Club, 5th Annual Meeting, N.C.S.R. Demokritos, Athens, May 17, 2003.
8. **D. Nikitovic** , A. Zafiropoulos, I. Dialyna, NK. Karamanos, and GN. Tzanakakis. Effects of glycosaminoglycans on proliferation of human osteosarcoma and normal osteoblasts: a structure-function relationship. 7th Annual Meeting of the Hellenic Research Club for Connective Tissue & Matrix Biology, Patras 8-9 April 2005
9. Zafiropoulos A., **Nikitovic D.**, Tsatsakis A., Karamanos NK., Tzanakakis GN. Distinct differences in the expression of matrix chondroitin sulphate proteoglycans between normal and cancerous osteoblastic cells. 7th Annual Meeting of the Hellenic Research Club for Connective Tissue & Matrix Biology, Patras 8-9 April 2005
10. **D. Nikitovic**, A. Zafiropoulos, E. Fthenou, NK. Karamanos and GN. Tzanakakis. Decorin and biglycan are differentially regulated by growth factors in human osteosarcoma and osteoblastic cells. Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, 57th National Conference, Athens, 9-11 December 2005.
11. **D. Nikitovic**, A Zafiropoulos, M. Assouti., A. Berdiaki and GN. Tzanakakis. TGF-B2 modulates the expression of pericellular matrix components in osteosarcoma cells. Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, 57th National Conference, Athens, 9-11 December 2005.
- 12 E. Fthenou, A. Zafiropoulos, **D. Nikitovic**, M. Assouti, NK. Karamanos and GN. Tzanakakis. Chondroitin sulfate A chain enhance PDGF-BB-mediated signaling in fibrosarcoma cells. Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, 57th National Conference, Athens, 9-11 December 2005.
13. A. Zafiropoulos, E. Berdiaki, D. Fthenou, **D. Nikitovic** and GN. Tzanakakis. Decorin in osteosarcoma cells: control of gene transcription, secretion and assessment of its effects on osteosarcoma cell growth. 8th Annual Meeting of the Hellenic Research Club for Connective Tissue & Matrix Biology, Heraklion 14-15 April 2006.
14. **D. Nikitovic**, A. Zafiropoulos, G. Chatzinicolaou, GN. and Tzanakakis. The expression of SLRP proteoglycans lumican and biglycan differs among osteosarcoma cell

lines of different metastatic potential and is specifically regulated by TGF- β . 8th Annual Meeting of the Hellenic Research Club for Connective Tissue & Matrix Biology, Heraklion 14-15 April 2006.

15. Γ. Χατζηνικολάου, **N. Νικίτοβιτς**, Α. Ζαφειρόπουλος και ΓΝ. Τζανακάκης. Επίδραση της γενιστεΐνης στην σύνθεση και την κατανομή των γλυκοζαμινογλυκανών / πρωτεογλυκανών σε δύο κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου. 3^ο Πανελλήνιο Διαιτηρικό Αντικαρκινικό Συνέδριο, Αθήνα 26-29 Απριλίου 2007.

16. G. Chatzinikolaou., **D. Nikitovic** and GN. Tzanakakis. 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

Συγγραφικό έργο:

1. Επιμέλεια, δακτυλογράφηση και αναζήτηση βιβλιογραφίας των σημειώσεων του μαθήματος της Ιστολογίας, στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «ΕΠΕΑΕΚ-Προγράμματα Σπουδών-Συγγράμματα ΠΡΟΜΗΘΕΑΣ», Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Βιβλιογραφικές αναφορές (citations): Αναφέρονται 261 αναφορές στο Science Citation Index