ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η
Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

Μελέτη του ρόλου των συνδεκανών στην παθογένεια του ινοσαρκώματος και διερεύνηση της επίδρασης των αυξητικών παραγόντων

ΜΑΡΙΑ ΜΥΤΙΛΗΝΑΙΟΥ

Ειδικευόμενη Ιατρός Ενδοκρινολογίας

Επιβλέπων Καθηγητής κ. Γεώργιος Τζανακάκης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Έφτασε η ώρα να ΄΄αποβιβαστώ΄΄. Μετά από ένα απίθανο ταξίδι μέσα στη γνώση, την πρωτοπορία, την απόκτηση νέων δεξιοτήτων και τη δημιουργία στενής σύνδεσης με ενδιαφέροντες ανθρώπους, παρατηρώ ότι στο τέλος της διαδρομής είμαι ένας διαφορετικός άνθρωπος. Όχι μόνο έχει λαξευτεί ο χαρακτήρας μου, αλλά έχει ικανοποιηθεί σε ένα σημαντικό βαθμό η επιστημονική μου περιέργεια. Μία λέξη τριγυρνά συνεχώς στο μυαλό μου: ευγνωμοσύνη.

Το ενδιαφέρον μου για την έρευνα ήταν αρχικά μέρος της παιδικής μου φαντασίας. Όταν πρωτοαντιλήφθηκα την ελπίδα που έδινε στον κόσμο η δημιουργία νέων και εξελιγμένων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, ευχήθηκα να έχω κάποτε τη δυνατότητα να προσφέρω έστω το ελάχιστο στον τομέα της Ογκολογίας/Βιολογίας του Καρκίνου. Πάντα έτρεφα βαθύ σεβασμό για τους ερευνητές-επιστήμονες που αφιέρωναν τη ζωή τους στην παρατήρηση, την καταγραφή νέας γνώσης και τη μετέπειτα εφαρμογή αυτής.

Την πραγματοποίηση της ευχής μου τη χρωστάω στον Καθηγητή Ανατομίας-Ιστολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης, κ. Γεώργιο Τζανακάκη. Νιώθω απέραντη ευγνωμοσύνη που με εμπιστεύτηκε, με εκπαίδευσε, με συμβούλευσε, με καθοδήγησε και με υποστήριξε από την πρώτη μέχρι την τελευταία στιγμή. Από τη διδασκαλία του στα έδρανα της Ιατρικής Σχολής, προτού ακόμα καταλάβω τι σημαίνει να θεραπεύεις έναν άρρωστο, μέχρι τις συναντήσεις μας ως διδακτορική φοιτήτρια πλέον, φρόντιζε να μας διδάσκει. Νιώθω πως του χρωστάω πολλά.

Είμαι πολύ τυχερή επίσης, που είχα την ευκαιρία να συνεργαστώ με την Επίκουρη Καθηγήτρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, κ. Dragana Nikitovic-Τζανακάκη. Η κ. Nikitovic δεν σταμάτησε λεπτό να με καθοδηγεί, να με στηρίζει και να με εκπαιδεύει με σκοπό να γίνομαι συνεχώς καλύτερη. Ποτέ, καθ΄όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής, δεν ένιωσα μόνη. Ήξερα πάντα ότι είχα τη βοήθειά της. Ακόμα και μετά την απογοήτευση που επιφέρει η αποτυχία ενός

πειράματος, ή κατά τη δύσκολη ερμηνεία και συγγραφή περίπλοκων αποτελεσμάτων, ήξερα ότι ήταν δίπλα μου να με συμβουλεύσει.

Δεν μπορώ να μην αναφερθώ σε έναν ακόμη άνθρωπο του εργαστηρίου, την αστείρευτη πηγή έμπνευσης και ενέργειας για όλους τους φοιτητές (προπτυχιακούς και διδακτορικούς), τη Μεταδιδακτορικό Ερευνήτρια Δρ.Αικατερίνη Μπερδιάκη. Η συνεισφορά της στη δουλειά μου αυτά τα 7 χρόνια που συμμετέχω στην έρευνα είναι ανεκτίμητη. Την ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου για όσα έχει κάνει. Για την τεχνική, θεωρητική, αλλά και ψυχολογική υποστήριξη. Ήταν πάντα διαθέσιμη, παρά το φόρτο εργασίας της.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω και σε όλους τους διδακτορικούς φοιτητές που συνάντησα στο εργαστήριο: Δρ. Ελένη Φθενού, Δρ. Γεωργία Χατζηνικολάου, Δρ. Γιούλη Χαλκιαδάκη, Δρ. Κατερίνα Κουβίδη, Δρ. Καλλιρρόη Βουδούρη, Ραφαέλα-Μαρία Καβάση, Δρ. Γιάννη Αγγελιδάκη και Δρ. Αντώνη Παπουτσιδάκη, με τους οποίους δουλέψαμε ως ομάδα για την καλή πρόοδο του εργαστηρίου. Πολύτιμη βέβαια, ήταν και η παρουσία των προπτυχιακών φοιτητών Δρ. Γιάννη Μαντά, Δρ. Κωνσταντίνου Κεχαγιά, Ρενάτας Μωραΐτη, οι οποίοι μας προσέφεραν βοήθεια κατά τη μύησή τους στην έρευνα, δημιουργώντας έτσι, μια πολύ ευχάριστη καθημερινότητα στο εργαστήριο.

Ένας ακόμη άνθρωπος που με φρόντιζε αυτά τα χρόνια ήταν η τεχνικός του εργαστηρίου κ. Μαρία Μπουραντά. Ήταν πάντα διαθέσιμη να μας βοηθήσει και να μας στηρίξει προκειμένου να καταφέρουμε τους στόχους μας. Η κ.Μπουραντά αποτελεί έναν απαραίτητο συνδετικό κρίκο της ομάδας μας.

Παράλληλα, ένα πρόσωπο πολύ σημαντικό για μένα, του οποίου η συμβολή ήταν καθοριστική για την εκπόνιση της συγκεκριμένης διατριβής, ήταν ο Δρ. Γιώργος Δάτσης. Η αξιοθαύμαστη επιστημονική του κατάρτιση, ο επαγγελματισμός του και το ταλέντο του στην έρευνα με επηρέασαν βαθύτατα. Χάριν στην ενθάρρυνση, την καθοδήγηση και την υπομονή του ξεκίνησα και έφερα εις πέρας αυτή τη μελέτη. Με χαροποιεί ιδιαίτερα η φαντασίωση να διαβαστεί κάποια στιγμή αυτή η διατριβή από την κόρη μας, με την ελπίδα να εξάψω την περιέργειά της και να της εμφυσήσω το δικό μου πάθος για γνώση.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω φυσικά τους γονείς μου, Χαράλαμπο Μυτιληναίο και Γερακίνα Μαμούχα και τον αδερφό μου, Κωνσταντίνο-Ιωάννη Μυτιληναίο για την υποστήριξη και την αστείρευτη αγάπη και υπομονή τους σε όλη μου τη ζωή. Εμπνευσμένη από το ήθος και τα βιώματά τους θέλησα να γίνω επιστήμονας και να προσπαθώ καθημερινά να απαλύνω έστω και ελάχιστα τον ανθρώπινο πόνο. Σκοπός μου είναι να συνεχίσω να βελτιώνομαι και να προσφέρω όσο περισσότερα μπορώ.

Πρόλογος

Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή φιλοδοξεί να προσθέσει στοιχεία στη μακροχρόνια και κοπιώδη προσπάθεια μελέτης της βιολογίας του καρκίνου. Συγκεκριμένα, εμβαθύνει στους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην πρόοδο του ινοσαρκώματος, στο επίπεδο του κυττάρου και του περιβάλλοντός του.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.
1.1 Ινοσάρκωμα: Γενικά
1.1.1 Προέλευση/Μορφολογία
1.1.2 Επιδημιολογικά στοιχεία/Μεταλλάξεις/Ταξινόμηση
1.1.3 Ινοσάρκωμα: Αντιμετώπιση
1.2 Εξωκυττάριος χώρος
1.2.1 Εξωκυττάριος χώρος: στον υγιή οργανισμό και στον καρκίνο
1.2.2 Εξωκυττάριος χώρος στο ινοσάρκωμα
1.3 Δομή και βασικά χαρακτηριστικά των πρωτεογλυκανών/γλυκοζαμινογλυκανών
1.3.1 Η συμμετοχή των πρωτεογλυκανών/γλυκοζαμινογλυκανών στην καρκινογένεση/ινοσάρκωμα
1.3.1.1 Ιδιαιτερότητες των πρωτεογλυκανών θειϊκή ηπαράνης στον καρκίνο

1.3.1.2 Συνδεκάνες στο ινοσάρκωμα
1.4 Αυξητικοί παράγοντες στον καρκίνο
1.4.1 Δράση του TGFβ γενικά στον καρκίνο
1.4.2 Ρόλος του TGFβ στο ινοσάρκωμα
1.4.3 Ο IGF κατά την ογκογένεση
1.4.4 Συμμετοχή του IGF στο ινοσάρκωμα
Σκοπός
2. Υλικά και μέθοδος
2.1 Κυτταροκαλλιέργιες
2.2 Απομόνωση RNA – Ποσοτικός Προσδιορισμός
2.3 Αντίστροφη Μεταγραφή
2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-time PCR)
2.5 Απομόνωση και Ανάλυση Πρωτεϊνών
2.6 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών (SDS PAGE) και Ανοσοαποτύπωση κατά WESTERN (Western Blot)
2.7 Αναστολή Έκφρασης Γονιδίων με siRNA (transfection)
2.8 Δοκιμή κυτταρικής προσκόλλησης
2.9 Ανοσοφθορισμός
2.10 Ανοσοκατακρήμνιση με A/G πρωτεΐνη αγαρόζη
2.11 Δοκιμή κυτταρικής μετανάστευσης
2.12 Στατιστική Ανάλυση
2.13 Διαλύματα
2.14 Αντισώματα
2.15 Εκκινητές
3. Αποτελέσματα (1)
Μηχανισμοί συμμετοχής της SDC2 στην εξαρτώμενη από τον TGFβ2 προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος μέσω του Smad2.
3.1 Η SDC2 είναι απαραίτητη για την επαγώμενη από τον TGFβ2 προσκόλληση στην FN
3.2 Η μεσολάβηση της SDC2 στην επαγόμενη από τον TGFβ2 ενεργοποίηση

του Smad

3.3 Η επίδραση της SDC2 στην έκφραση/εντόπιση των υποδοχέων TGFRI, II και III

3.4 Η SDC2 ρυθμίζει την επαγόμενη από τον TGFβ2 έκφραση της ιντεγκρίνης β1 και της FAK

3.5 Ο ρόλος του TGFβ2 στην έκφραση της SDC2

Πειράματα που προστέθηκαν στη δημοσίευση (Supporting information)

3.6 Συζήτηση

4. Αποτελέσματα (2)

Μηχανισμοί συμμετοχής των HS αλυσίδων στην προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος που επάγεται από τον TGFβ2.

4.1 Οι HS είναι απαραίτητες για την επαγόμενη από τον TGFβ2 προσκόλληση στην FN

4.2 Ο ρόλος των κυτταρικών αλυσίδων HS στο μονοπάτι σηματοδότησης Smad του TGFβ2

4.3 Η έκφραση των κυτταρικών HS έχει αντίστροφη συσχέτιση με την ενεργοποίηση του Smad2

4.4 Η συνδεκάνη 2 και όχι η συνδεκάνη 4, ρυθμίζει τη σηματοδότηση του TGFβ2 μέσω Smad

4.5 Συζήτηση

5. Αποτελέσματα (3)

Η διαμεσολάβηση της συνδεκάνης 2/EPK/ezrin στη μετανάστευση των κυττάρων του ινοσρκώματος HT1080 που προκαλείται από τον IGF-I.

5.1 Η επίδραση του IGF-I στη μεταναστευτική ικανότητα των HT1080 και ο ρόλος της SDC2

5.2 Η ενεργοποίηση του μονοπατιού IGF-I/ERK1,2 από τη SDC2

5.3 Ο ρόλος της SDC2 στη φωσφωρυλίωση της ezrin

5.4 Ο σχηματισμός συμπλεγμάτων ανοσοκατακρήμνισης SDC2/p-ezrin

5.5 Ο ρόλος του IGF-I στις αλληλεπιδράσεις SDC2/ezrin και SDC2/IGF-IR

5.6 Ο έλεγχος της συνεντόπισης της ezrin και της φαλλοϊδίνης από τον IGF-I

5.7 Η ρύθμιση της έκφρασης της SDC2 από τον IGF-I

Πειράματα που προστέθηκαν στη δημοσίευση (Supporting information)
5.8 Συζήτηση
6. Συμπεράσματα
7. Δημοσιεύσεις
8. Βιβλιογραφία
9. Βιογραφικό

Περίληψη

Η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη των μηχανισμών λειτουργίας του ανθρώπινου ινοσαρκώματος. Πρόκειται για έναν σπάνιο όγκο βάσει της τελευταίας ιστολογικής ταξινόμησης, ο οποίος όμως, εμφανίζει πτωχή πρόγνωση. Το συγκεκριμένο σάρκωμα μαλακών μορίων προέρχεται από την κακοήθη εξαλλαγή των ινοβλαστών, κυττάρων που διαμορφώνουν τον εξωκυττάριο χώρο (ECM) και στηρίζουν τους ιστούς. Τα κύτταρα του ινοσαρκώματος είναι χαρακτηριστικά ατρακτοειδή, με επέκταση του προσθίου άκρου τους και μεγάλη κινητικότητα.

Είναι γνωστό ότι τα κύτταρα του ινοσαρκώματος έχουν ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας του ECM. Πρόκειται για ένα περίπλοκο δίκτυο πρωτεογλυκανών, ινωδών πρωτεϊνών και υαλουρονικού οξέος, που υποστηρίζει και προστατεύει τα κύτταρα εντός των ιστών. Επιπλέον, ο ECM δημιουργεί και μεταφέρει πολλαπλά σύνθετα ερεθίσματα σε κύτταρα, επηρεάζοντας τη συμπεριφορά τους και τις βασικές τους λειτουργίες. Πράγματι, ο ECM είναι μια δεξαμενή αυξητικών παραγόντων, όπως ο αυξητικός παράγοντας του μετασχηματισμού (TGF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών 2 (FGF2), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας (IGF), αλλά και ενζύμων όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs), οι συνθάσες, οι τρανσφεράσες και οι σουλφάσες, καθώς και άλλων μακρομορίων που ρυθμίζουν τη κυτταρική συμπεριφορά.

Οι πρωτεογλυκάνες είναι μόρια που αποτελούνται από γλυκοζαμινογλυκανικές αλυσίδες (GAG), ομοιοπολικά συνδεδεμένες σε ένα

πρωτεϊνικό κορμό και ταξινομούνται με βάση τις αλυσίδες τους σε πρωτεογλυκάνες θειϊκής κερατάνης (KSPGs), θειϊκής ηπαράνης (HSPGs), θειϊκής χονδροϊτίνης (CSPGs) και θειϊκής δερματάνης (DSPGs). Έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τις κυτταρικές λειτουργίες και εν τέλει την πρόοδο ενός όγκου με διάφορους τρόπους. Την πολυδύναμη λειτουργικότητά τους την οφείλουν στη μοναδική τους μορφολογία, αλλά και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίστανται από ένζυμα. Το αποτέλεσμα είναι διαφορετική εντόπιση, αποδόμηση, ανακύκλωση, αλληλεπίδραση με άλλα μακρομόρια (όπως αυξητικούς παράγοντες) και διαφορετική σηματοδότηση επί τα εντός και επί τα εκτός του κυττάρου. Οι πρωτεογλυκάνες έχουν ως ιδιαίτερο χαρακτηριστικό την άμεση επαφή με τον εξωκυττάριο χώρο και κατά συνέπεια τη μεταβίβαση των περιβαλλοντικών αλλαγών προς τα ενδότερα του κυττάρου, μεταφρασμένων πλέον ως ενδοκυττάρια σήματα.

Η συνδεκάνη 2 (SDC2), μία πρωτεογλυκάνη θειϊκής ηπαράνης, είναι πολύ σημαντική για τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων του ανθρώπινου ινοσαρκώματος (HT1080). Ένα μονοπάτι που επάγεται από τη SDC2, είναι το FAK (focal adhesion kinase)/PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), μέσω του οποίου αλλάζει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και κατά συνέπεια αυξάνει τη μετανάστευση των κυττάρων του ινοσαρκώματος HT1080.

Ένας από του αυξητικούς παράγοντες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του ινοσαρκώματος είναι ο TGFβ2. Έχει καταγραφεί ότι ρυθμίζει την παραγωγή μορίων στον εξωκυττάριο χώρο, καθώς και τη διεισδυτικότητα και τη μετανάστευση των κυττάρων του ανθρώπινου ινοσαρκώματος.

Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζουμε την ικανότητα του TGFβ2 να ενισχύει την προσκόλληση των κυττάρων HT1080 στην ινονεκτίνη (FN) ($p \leq 0.01$), μία λειτουργία που σχετίζεται με την ικανότητα διείσδυσης ενός όγκου. Η επίδραση του TGFβ2 στην ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων επηρεάζεται από την παρουσία της SDC2, καθώς τα ελλιπή σε SDC2 κύτταρα εμφανίζουν έντονη αναστολή της TGFβ2-εξαρτώμενης προσκόλλησης στην FN ($p \leq 0.01$).

Διαπιστώσαμε επίσης ότι η SDC2 ρυθμίζει την ενεργοποίηση του Smad2, ενός κύριου διαμεσολαβητή της δράσης του TGFβ2. Φάνηκε ότι η απουσία της SDC2,

οδηγεί σε σημαντική καταστολή της επαγόμενης από τον TGFβ2 φωσφορυλίωσης του Smad2 ($p \leq 0.05$).

Είναι γνωστό ότι η SDC2 εντοπίζεται μαζί με έναν από τους υποδοχείς του TGF, τον TGFRIII. Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι ελέγχει τόσο την παραγωγή του TGFRIII, όσο και των TGFRI και II. Στη δική μας μελέτη επιβεβαιώσαμε την αναγκαιότητα της ύπαρξης της SDC2 για την έκφραση του TGFRIII ($p \leq 0.01$) και προτείνουμε ότι η συγκεκριμένη πρωτεογλυκάνη ελέγχει την παρουσίαση του TGFRIII στην κυτταρική μεμβράνη.

Δείξαμε επίσης, ότι η SDC2 ελέγχει την εξαρτώμενη από τον TGF έκφραση ($p \leq 0.05$) και ενεργοποίηση ($p \leq 0.01$) της FAK και της ιντεγκρίνης β1 ($p \leq 0.01$), δύο γονιδίων απαραίτητων για την κυτταρική προσκόλληση στην FN.

Στη συνέχεια μελετήσαμε τη σημασία των γλυκοζαμινογλυκανικών αλυσίδων θειϊκής ηπαράνης στις κυτταρικές λειτουργίες του ανθρώπινου ινοσαρκώματος. Έχει αποδειχθεί παλαιότερα ότι οι HS αλυσίδες επηρεάζουν την επαγόμενη από τον TGFβ κυτταρική κινητικότητα. Χρησιμοποιήσαμε την ηπαριτινάση για την ειδική πέψη των HS αλυσίδων δημιουργώντας ειδικούς επιτόπους (HS stubs). Με την αποκοπή των αλυσίδων HS, η προκαλούμενη από τον TGFβ2 προσκόλληση των HT1080 αναιρέθηκε σε μεγάλο βαθμό ($p \leq 0.001$), αναδεικνύοντας την καίρια συμβολή των HS αλυσίδων στη συγκεκριμένη κυτταρική λειτουργία.

Παράλληλα, η αποδόμηση των HS εμπόδισε την ενεργοποίηση του Smad2 από τον TGFβ2 ($p \leq 0.001$). Η καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ2 θα μπορούσε να ερμηνεύσει την επίδραση των HS στην αναστολή της προσκόλλησης των HT1080 από τον TGFβ2.

Τέλος, η παρούσα διατριβή διερευνά τον πιθανό ρόλο του IGF-I στην πρόοδο του ανθρώπινου ινοσαρκώματος. Πρόκειται για μία γνωστή αναβολική ορμόνη, με αποδεδειγμένες, ισχυρά ογκογόνες ιδιότητες. Για την πλειοψηφία των λειτουργιών που επιτελεί, σηματοδοτεί μέσω δύο κύριων μονοπατιών: του PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/AKT (serine/threonine kinase) και του MAPK (mitogen-activated protein kinase)/ERK (extracellular signal-regulated kinases).

Εξετάζοντας τη δράση του IGF-I στα κύτταρα HT1080, παρατηρήσαμε με ενδιαφέρον ότι ενισχύει σημαντικά τη μετανάστευση των κυττάρων ($p \leq 0.001$).

Είναι γνωστό ότι η SDC2 , η οποία βρίσκεται σε αφθονία στο ινοσάρκωμα, έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την κινητικότητα των κυττάρων διαμορφώνοντας τον κυτταροσκελετό. Έχοντας υπόψιν τις μοναδικές της ιδιότητες, διερευνήσαμε τη συμμετοχή της στις δράσεις του IGF-I. Το αποτέλεσμα της καταστολής του γονιδίου της SDC2 ήταν να παρεμποδιστεί τελικά η εξαρτώμενη από τον IGF-I μετανάστευση των κυττάρων HT1080 ($p \leq 0.001$).

Γνωρίζοντας ότι η SDC2 διαδραματίζει το ρόλο του συν-υποδοχέα για διάφορους αυξητικούς παράγοντες [FGF (αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών), GM-CSF (αυξητικός παράγοντας διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων), κτλ], εξετάσαμε το ενδεχόμενο ο IGF-IR να ανήκει σ'αυτήν την κατηγορία. Στην παρούσα διατριβή δείχνουμε για πρώτη φορά τη συνύπαρξη της SDC2 μαζί με τον IGF-IR, αναδεικνύοντας έτσι τη SDC2 ως πιθανό συν-υποδοχέα για τον IGF-I.

Στην προσπάθειά μας να μελετήσουμε σε μεγαλύτερο βάθος τον τρόπο με τον οποίο η SDC2 επηρεάζει τη σηματοδότηση και κατά συνέπεια την κυτταρική μετανάστευση μέσω του IGF-I, εξετάσαμε την επίδραση της SDC2 στην ενεργοποίηση του ERK1/2. Διαπιστώσαμε ότι η SDC2 είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση του ERK1/2 ($p \leq 0.001$), καθώς και ότι αντίστοιχα ο ERK1/2 είναι αναγκαίος για την επαγόμενη από τον IGF-I μετανάστευση των HT1080 ($p \leq 0.001$). Τα αποτελέσματα αυτά πιθανώς σημαίνουν ότι ένας τρόπος με τον οποίο η SDC2 επηρεάζει την εξαρτώμενη από τον IGF-I μετανάστευση των HT1080 είναι η ενεργοποίηση του ERK1/2, η οποία είναι γνωστό ότι ρυθμίζει τη μεταγραφή απαραίτητων γονιδίων για τη συμπεριφορά του κυττάρου.

Τέλος, μελετήσαμε την ezrin, μια πρωτεΐνη που συνδέει μεμβρανικούς υποδοχείς με τον κυτταροσκελετό και έχει βρεθεί να εντοπίζεται συγκεκριμένα μαζί με τη SDC2 σε μικροπροσεκβολές κυττάρων ομοίων με τους ινοβλάστες. Αποτέλεσε ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα η αύξηση της ενεργοποίησης της ezrin ($p \leq 0.01$) κατά χρονοεξαρτώμενο τρόπο, για πρώτη φορά στα κύτταρά μας, μετά την προσθήκη του IGF-I. Παράλληλα, επιβεβαιώσαμε ότι η ezrin συνυπάρχει με τη SDC2, καθώς και με την ακτίνη στις έντονες μικροπροσεκβολές των κυττάρων HT1080, ρυθμίζοντας εν μέρει κατ'αυτόν τον τρόπο την κινητικότητα και την επιθετική συμπεριφορά των κυττάρων.

Με τους παραπάνω μηχανισμούς, αναδεικνύεται σε σημαντικό βαθμό η δράση της SDC2 στην παθογένεια του ινοσαρκώματος και ιδιαίτερα η συμμετοχή της στη σηματοδότηση των αυξητικών παραγόντων TGFβ και IGF-I, που ρυθμίζουν την προσκόλληση και τη μετανάστευση αντίστοιχα, των κυττάρων του ανθρώπινου ινοσαρκώματος HT1080.

Abstract

The focus of the present PhD thesis was to further understand the underlying mechanisms that are responsible for the progress of human adult fibrosarcoma. With the utilization of new, specialized techniques, which have resulted in new classification systems it is defined as a rare tumor with poor prognosis. This soft tissue sarcoma is derived from the malignant transformation of the fibroblasts, cells known to produce abundant extracellular matrix (ECM) which ultimately supports surrounding tissues. Fibrosarcoma cells are morphologically characterized as spindle cells, with enhanced motility.

It is well established that fibrosarcoma cells strongly modulate the surrounding ECM. ECM is a complex extracellular network containing proteoglycans, fibrous proteins and hyaluronic acid, which supports and protects the cells within the tissues. Moreover, ECM is able to create and transfer multiple signals to the cells, thus affecting their basic functions and behaviour. Indeed, ECM is a pool of growth factors, such as TGF (transforming growth factor), EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), IGF-I (insulin-like growth factor), enzymes like the MMPs (matrix metalloproteinases), synthases, transferases, sulfases and a whole group of other interesting macromolecules which can affect cell behaviour.

Proteoglycans are molecules composed of glycosaminoglycan chains (GAG), covalently attached to their protein core. They are classified according to their GAG chains into separate groups: KSPGs (keratan sulfate proteoglycans), HSPGs (heparan sulfate proteoglycans), CSPGs (chondroitin sulfate proteoglycans) and DSPGs (dermatan sulfate proteoglycans). They possess the ability to affect cell functions and

ultimately the evolution of a tumour with various mechanisms. Their complex functionality comes not only from their basic morphology, but also from their final stereotactic modification by specialized enzymes. These alterations can induce important changes like different localization, degradation and recycling, interplay with other factors, let alone different signalling, both outwards and inwards of the cell. One of the unique proteoglycan characteristics is the direct contact with the ECM and the consequent transport of environmental signals towards the inner part of the cells.

Syndecan 2 (SDC2), a heparan sulfate proteoglycan, is known to be crucial for the proliferation and migration of human fibrosarcoma cells (HT1080). SDC2 is recognized to modify the actin cytoskeleton and consequently alter HT1080 cell migration through the FAK/PI3K/Rac signalling pathway.

One of the well-studied growth factors, proven to affect the progress of fibrosarcoma, is TGFβ2. It has been reported that TGFβ2 can control the formation of ECM and subsequently, the invasiveness and migration of HT1080 cells.

In this study, we show the ability of TGFβ2 to enhance the adhesion of HT1080 cells towards fibronectin (FN) ($p \leq 0.01$). Adhesion of cells to other cells as well as the ECM is known to affect the invasive abilities of the cells. SDC2 seems to be essential when it comes to TGFβ2-induced HT1080 cell adhesion, as this ability is remarkably down-regulated in SDC2-deficient cells ($p \leq 0.01$).

We also show that SDC2 is important for Smad2 activation, an indispensable mediator of TGFβ signalling. It seems that TGFβ2-dependent Smad2 phosphorylation is significantly decreased in HT1080 cells that lack SDC2 ($P \leq 0.05$).

The co-localization and the regulation of the expression of TGFRIII, one of the TGFβ receptors, is another interesting quality of SDC2. In our study, we confirm the importance of SDC2 in the regulation of TGFRIII expression ($p \leq 0.01$) and suggest that this proteoglycan participates in the presentation of TGFRIII on the cell membrane.

We also showed that SDC2 modulates the TGF-dependent expression ($p \leq 0.05$) and activation ($p \leq 0.01$) of FAK, as well as of integrin β1 ($p \leq 0.01$), two genes that are necessary for cell adhesion towards FN.

Additionally, we studied the effect of HS chains on human fibrosarcoma cell functions. It is already known that HS chains can influence TGFβ-induced cell motility. In order to proceed with these experiments, we used heparitinase, to achieve the specialized digestion of HS chains. This resulted in the formation of HS stubs. Interestingly, the otherwise TGFβ2-enhanced HT1080 cell adhesion was completely reversed after the addition of heparitinase and the shedding of HS chains ($p \leq 0.001$). This outcome highlights the important role of HS chains on TGFβ2-induced cell adhesion.

Furthermore, HS shedding inhibited TGFβ2-dependent Smad2 activation ($p \leq 0.001$). The consequent down-regulation of the TGFβ2 signalling pathway explains the inhibitory effect of HS chains on TGFβ2-promoted HT1080 cell adhesion.

Finally, the present PhD thesis studied the potential role of IGF-I in fibrosarcoma progression. IGF-I is a known anabolic hormone, with proven oncogenic behaviour. Most of the downstream signalling is conducted through two main signalling pathways: PI3K/AKT and MEK/ERK.

While examining the effect of IGF-I on HT1080 cells, we reported a remarkable increase in cell migration, when cells were treated with IGF-I ($p \leq 0.001$). SDC2 is abundant in fibrosarcoma and, as previously mentioned, SDC2 can regulate cell motility by changing actin cytoskeleton. Taking into account its unique abilities, we examined its possible participation in IGF-I pathways. The silencing of SDC2 gene resulted interestingly in the inhibition of IGF-I induced HT1080 cell migration ($p \leq 0.001$).

Knowing that SDC2 can play the role of the co-receptor for several growth factors, such as FGF and GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), the next step was to examine whether SDC2 could be a co-receptor for IGF-I too. In the present study, we show for the first time that SDC2 is co-localized with IGF-IR, suggesting that SDC2 could be a co-receptor for IGF-I and subsequently affect its bioavailability and downstream signalling.

Next, we examined the participation of SDC2 in IGF-I signalling and cell migration. As ERK1/2 is an important mediator of IGF-I signalling and affects cell motility in various types of cancer, we tested the effect of SDC2 in IGF-I induced

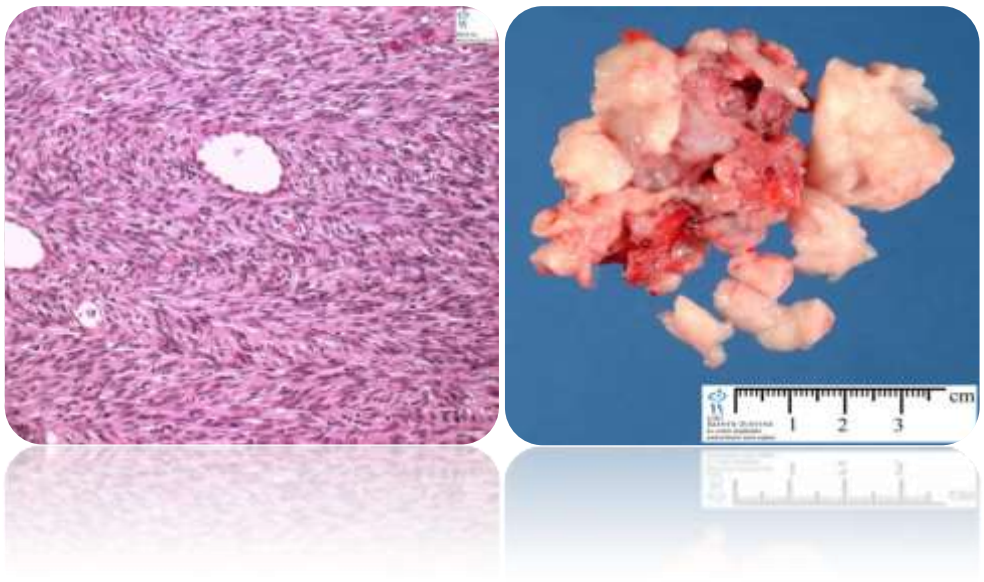
ERK1/2 activation. We show that SDC2 is essential for ERK1/2 phosphorylation ($p \leq 0.001$) and we also show that ERK1/2 is essential for the IGF-I dependent HT1080 cell migration ($p \leq 0.001$). This could mean that SDC2 regulates IGF-I induced migration, at least partly through ERK1/2 activation and via the subsequent ERK1/2-dependent gene transcription towards specific cell behaviours.

Finally, we examined the putative role of ezrin, a protein-linker between receptors of the cell membrane and actin cytoskeleton. It has been previously found to be co-localized with SDC2 in filopodia of fibroblast-like cells. Interestingly, we showed for the first time in our cells, that adding IGF-I to HT1080 cells leads to activation of ezrin ($p \leq 0.001$) and we confirmed that ezrin is co-localized with SDC2 in HT1080 cells, making their lamellipodia more prominent. With these results, we present some of the mechanisms through which SDC2 participates in IGF-I-dependent HT1080 cell migration.

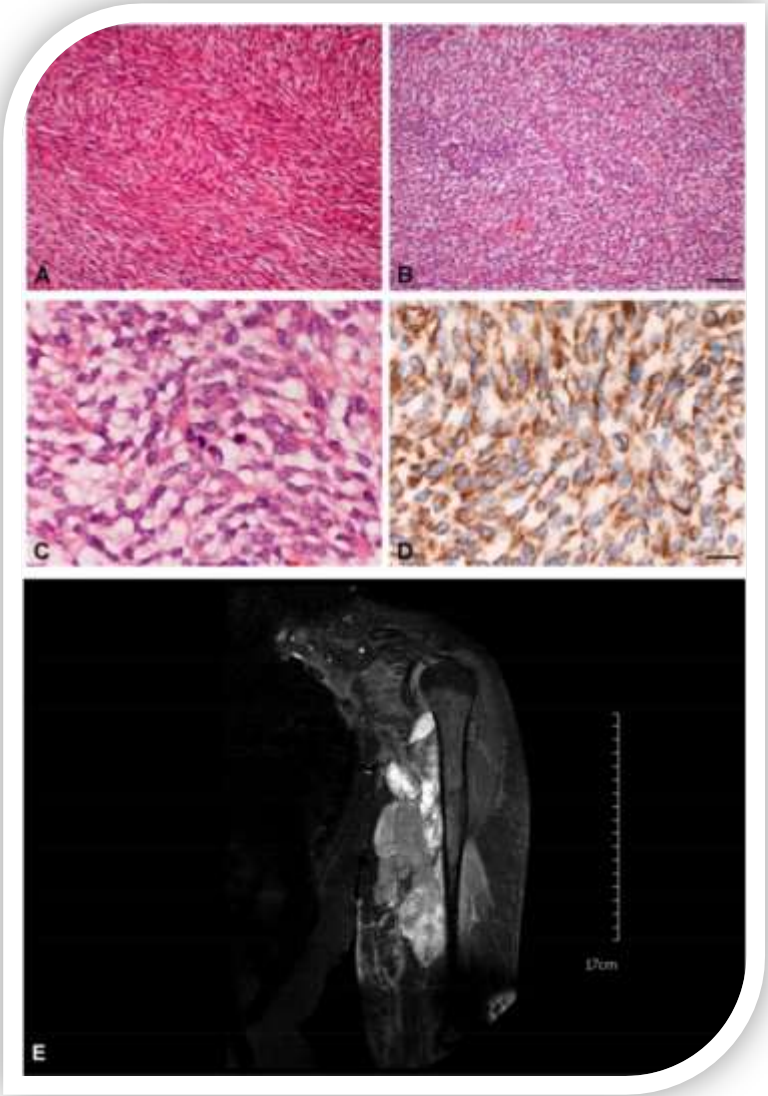
1. Εισαγωγή

1.1 Ινοσάρκωμα: Γενικά

1.1.1 Προέλευση/Μορφολογία



Humpath.com-Human Pathology, 2004



(Augsburger et al, 2017)

Το ινοσάρκωμα προκαλείται από την κακοήθη εξαλλαγή των ινοβλαστών (Augsburger et al, 2017), στηρικτικών κυττάρων, τα οποία επιτελούν δύο σημαντικά έργα (Tracy et al, 2016). Αφενός παρέχουν μηχανική στήριξη στους ιστούς και αφετέρου εκκρίνουν συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως το κολλαγόνο και την ελαστίνη (Tracy et al, 2016). Για να κατανοήσουμε καλύτερα την παθοφυσιολογία της γένεσης του συγκεκριμένου όγκου, αλλά και της δημιουργίας μεταστάσεων, είναι χρήσιμο να στρέψουμε την προσοχή μας αρχικά στη μορφολογία, τις βασικές λειτουργίες, αλλά και τις αλληλεπιδράσεις των ινοβλαστών.

Κοιτώντας στο μικροσκόπιο τους ινοβλάστες, βλέπουμε ατρακτοειδή κύτταρα με μετρίου βαθμού πλειομορφισμό και μιτωτική δραστηριότητα, οργανωμένα σε δεσμίδες δίκην ΄΄ψαροκόκκαλου΄΄. Παρατηρούμε μεγάλο ωοειδή πυρήνα με μεγάλο πυρηνίσκο, κωνοειδή διπολική ατρακτοειδή μορφολογία με μικρές κυτταρικές προσεκβολές και βασεόφιλο κυτταρόπλασμα, που αποτελεί χαρακτηριστικό κυττάρων με έντονη πρωτεϊνοσύνθεση. Εμβρυολογικά οι ινοβλάστες προέρχονται από το μεσέγχυμα, όπως τα λιποκύτταρα και τα περικύτταρα. (Ιστολογία του ανθρώπου, Χρήστος Κίττας, μετάφρ. Alan Stevens, 2008, Tracy et al, 2016).

Ουσιαστικά, η ονομασία του ΄΄ινοβλάστη΄΄ αποδίδεται σε οποιοδήποτε στρωματικό κύτταρο δεν εκφράζει δείκτες μιας άλλης συγκεκριμένης μεσεγχυματικής σειράς. Πρόκειται για μια ετερογενή κυτταρική σειρά. Παρατηρούνται διαφορές στη μορφολογία και στις λειτουργίες της, ανάλογα με την εντόπιση των κυττάρων στους ιστούς (Tracy et al, 2016). Είναι πάρα πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι έχουν τη δυνατότητα να αλλάξουν το κυτταρικό τους προφίλ και τις λειτουργίες βάσει της εντόπισής τους, ή ακόμα και να μεταμορφωθούν προς ένα καινούριο κυτταρικό τύπο. Θεωρείται το πρώτο σωματικό κύτταρο που έχει ιδιότητες πολυδύναμου βλαστοκυττάρου (Tracy et al, 2016).

Είναι γνωστό ότι οι ινοβλάστες παράγουν τον ινοκολλαγονώδη ιστό, ο οποίος αποτελείται από κολλαγόνες ίνες συνδεδεμένες με γλυκοζαμινογλυκάνες, ελαστικές και δικτυωτές ίνες. Ο ιστός αυτός μπορεί να ποικίλλει σε ποσότητα καταλήγοντας να σχηματίζει από λεπτό ενδοκυττάριο δίκτυο, έως διάχυτες ζώνες. Επίσης, ανάλογα και πάλι με την εντόπισή τους, οι ινοβλάστες παράγουν διαφορετικές ποσότητες και διαφορετικούς τύπους κολλαγόνου (Tracy et al, 2016). Έως τώρα έχει ταυτοποιηθεί μεγάλη ποικιλία στις λειτουργίες του. Έχει βρεθεί ότι ευθύνεται για τη στήριξη των νεύρων και των αγγείων, για το διαχωρισμό των λειτουργικών στιβάδων στα όργανα, τη στήριξη των κυττάρων του ανοσοποιητικού, την παραγωγή αυξητικών παραγόντων κ.α. Είναι γνωστό ότι οι ινοβλάστες συνδέονται στενά με τα κύτταρα που στηρίζουν, υποβοηθώντας έτσι σημαντικές λειτουργίες, όπως για παράδειγμα την αιμοποίηση στην περίπτωση των κυττάρων του αίματος καθώς αυτά επικοινωνούν με τα κύτταρα του στρώματος στο μυελό των οστών. (Ιστολογία του ανθρώπου, Χρήστος Κίττας, μετάφρ. Alan Stevens, 2008).

Όσον αφορά το ανθρώπινο ινοσάρκωμα, παρατηρούνται άωροι, πολλαπλασιαζόμενοι ινοβλάστες, καθώς και αναπλαστικά ατρακτοειδή κύτταρα με χαρακτηριστικό δικτυωτό μοτίβο και διαφορετικό βαθμό κακοήθειας με βάση τη διαφοροποίηση. Το ινοσάρκωμα ανευρίσκεται σε μαλακά μόρια, π.χ στους μύες, το συνδετικό ιστό, τα αγγεία, το λιπώδη ιστό κ.α (Nikitovic et al, 2013). Για τις ανάγκες τις συγκεκριμένης διατριβής χρησιμοποιείται η σειρά ανθρώπινου ινοσαρκώματος HT1080, καθώς είναι καλά χαρακτηρισμένη και μπορεί να γίνει βιβλιογραφική αναφορά και σύγκριση με τα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας.

Κατά τη δισδιάστατη και τρισδιάστατη απεικόνιση των HT1080, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους ινοβλάστες. Μία διαφορά είναι ότι μειώνονται οι εστίες προσκόλλησης, πιθανώς μέσω αλλαγών στα μόρια που τις συνθέτουν. Ένα μόριο που αλλάζει και παρουσιάζει διάχυτη κατανομή είναι η βινκουλίνη, μια πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης που βοηθά στο ΄΄αγκυροβόλημα΄΄ της ακτίνης στην κυτταρική μεμβράνη. Κατά συνέπεια, αλλάζει και η κατανομή του ίδιου του κυτταροσκελετού. Αυτές οι αλλαγές πιθανώς να συμβάλλουν στην τελική μορφολογία, που χαρακτηριστικά είναι πιο στρογγυλή στα κύτταρα του ινοσαρκώματος, σε αντίθεση με τους πιο επιμηκυσμένους ινοβλάστες (Schwartz et al, 2013). Όσον αφορά την κινητικότητά τους, τα HT1080 εμφανίζουν εντονότερη σύσπαση του κυτταρικού σώματος, προέκταση του πρόσθιου άκρου τους, καθώς και μεγαλύτερη κινητικότητα και μετανάστευση προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση. Οι χαρακτηριστικές αυτές λειτουργίες, σε συνδυασμό με τη διαφορετική μορφολογία, καθώς και τη διαφορετική έκφραση μορίων προσκόλλησης, διαχωρίζουν τους καλοήθεις ινοβλάστες από τα κακοήθη κύτταρα του ανθρώπινου ινοσαρκώματος (Schwartz et al, 2013).

1.1.2 Επιδημιολογικά στοιχεία/Μεταλλάξεις/Ταξινόμηση

Τα σαρκώματα μαλακών μορίων αποτελούν το 1% όλων των κακοήθων όγκων του ανθρώπου. Σύμφωνα με μια δημοσιευμένη μελέτη για την Αμερικάνικη Καρκινική Εταιρεία, από τους Siegel et al το 2012, είχε εκτιμηθεί ότι θα συνέβαιναν 11.280 νέες περιπτώσεις σαρκωμάτων μαλακών μορίων, καθώς και 3.900 θάνατοι και

στα δύο φύλα στις Η.Π.Α το 2012 (Siegel et al, 2012). Ανάμεσα σε αυτούς τους όγκους, υπάρχουν παλαιότερα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ταξινομούσαν το ινοσάρκωμα ως τον πιο συχνό τύπο σαρκώματος μαλακών μορίων (66% των σαρκωμάτων που καταγράφηκαν από τη Mayo Clinic κατά την περίοδο 1910-1930) (Folpe et al, 2014). Με τη χρήση όμως κατάλληλων τεχνικών που επέτρεψαν την ειδικότερη ταξινόμηση των υποτύπων των σαρκωμάτων μαλακών μορίων, έχουν πλέον κατανοηθεί και διαχωριστεί καλύτερα τα σαρκώματα που μιμούνται το ινοσάρκωμα (Folpe et al, 2014, Thway et al, 2009). Σ'αυτή την κατηγορία ανήκουν το ινομυξωματώδες σάρκωμα χαμηλής κακοήθειας, το σκληρυντικό επιθηλιοειδές ινοσάρκωμα και το ινοσάρκωμα που προέρχεται από το προέχων δερματοινοσάρκωμα. Μετά από τις πιο πρόσφατες αυτές αλλαγές στην ταξινόμηση, το ινοσάρκωμα ενηλίκων θεωρείται πλέον ένας πολύ σπάνιος όγκος (Edwards et al, 2017, Folpe et al, 2014). Αποτελεί μία διάγνωση εξ'αποκλεισμού (Augsburger et al, 2017, Folpe et al, 2014) (Πίνακας 1). Στα παιδιά εν αντιθέσει, αποτελεί τον 3ο κατά σειρά πιο συχνό όγκο μετά τις κακοήθειες του αίματος και τους όγκους του νευρικού συστήματος (Siegel et al, 2012), αποτελώντας το 24.5% όλων των σαρκωμάτων μαλακών μορίων του πρώτου έτους της ζωής (Sultan et al, 2010). Το ινοσάρκωμα ενηλίκων εμφανίζεται πιο συχνά στη μέση ηλικία 30-60 ετών (με κορύφωση στα 50 έτη) και είναι πιο συχνό στους άνδρες (Augsburger et al 2017, Folpe et al, 2014), αποτελώντας το 3,6% όλων των σαρκωμάτων των ενηλίκων (Augsburger et al 2017). Συχνά εμφανίζεται ως μία μη ειδική μάζα μαλακών μορίων και κάποιες φορές σχετίζεται με ακτινοβολημένο πεδίο (Thway et al, 2009), την παρουσία ουλώδους ιστού μετά από έγκαυμα, την εμφύτευση ξένου σώματος, όπως αγγειακά μοσχεύματα ή ενδαρθρικές προθέσεις, προϋπάρχον δερματοινοσάρκωμα, καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα, ή μονήρη ινωματώδη όγκο (Augsburger et al 2017, Folpe et al, 2014). Παράλληλα, είναι πιθανό να συνδέεται με κλινική συμπτωματολογία πόνου από την πίεση/διήθηση παρακείμενων ιστών, κυκλοφορικής δυσφορίας και περιορισμένης κίνησης (Augsburger et al, 2017), καθώς και διαταραχές γλυκόζης (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2018). Στα τελικά στάδια μπορεί να εμφανιστεί ανορεξία, απώλεια βάρους και κακουχία (Augsburger et al, 2017). Οι συγκεκριμένοι όγκοι

είναι συνήθως αρκετά μεγάλοι τη στιγμή της διάγνωσης (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2018).

Παρά τη σπανιότητά του, πρόκειται για έναν αρκετά επιθετικό όγκο (Augsburger et al, 2017). Σε πρόσφατες μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν αυστηρά τα κριτήρια για το ινοσάρκωμα ενηλίκων, βρέθηκε ότι η επιβίωση στα 2 έτη ήταν <70%, ενώ στα 5 έτη ήταν <55% (Folpe et al, 2014). Επίσης, η μέση επιβίωση σε ασθενείς με μεταστατικό σάρκωμα μαλακών μορίων είναι 12 μήνες (van der Graaf et al, 2012).

Έχει βρεθεί ότι αυτοί οι όγκοι δημιουργούνται από χρωμοσωμιακές μεταθέσεις που οδηγούν στη σύντηξη γονιδίων, με άγνωστη μέχρι τώρα την αιτία (Πίνακας 2). Η γενετική ταυτοποίηση των συγκεκριμένων όγκων είναι πλέον εφικτή με τη χρήση διαφόρων τεχνικών, όπως τον in situ φθορίζοντα υβριδισμό (FISH) και την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Με τη χρήση αυτών των γονιδιακών τεχνικών, είμαστε πλέον σε θέση να ταυτοποιήσουμε κάθε υπότυπο.

Το νεανικό ινοσάρκωμα απαντά συνήθως κατά την παιδική ηλικία (4 πρώτα χρόνια της ζωής, με πιο συχνούς τους 3 πρώτους μήνες της ζωής), ή κατά τα πρώτα χρόνια της ενηλίκου ζωής (Fisher et al, 2010, PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2018). Η συγκεκριμένη μορφή παρουσιάζεται ως ανώδυνη, ετερογενής σε μέγεθος (με μέσο μέγεθος 3-8 cm) και σύσταση μάζα, πτωχά περιγεγραμμένη, εντοπιζόμενη πιο συχνά στα μαλακά μόρια των άκρων, με σπάνια εντόπιση στον κορμό, στην κεφαλή και τον τράχηλο (Fisher et al, 2010, Parida et al, 2013, Augsburger et al, 2017). Εξορμάται κυρίως από το μυελικό κανάλι των οστών, αλλά και από το περιόστεο (Augsburger et al, 2017). Παράλληλα, το υπερκείμενο δέρμα μπορεί να παρουσιάζει τάση, ερυθρότητα και τελικά να εξελκωθεί (Sargar et al, 2016). Πολύ σπάνια, το ινοσάρκωμα ενηλίκων μπορεί να εμφανιστεί με έκτοπη εντόπιση, για παράδειγμα στο κοιλιακό τοίχωμα (Smith et al, 2017), ή στο μεσοθωράκιο (Augsburger et al, 2017), καθώς και στις ωοθήκες κυρίως μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών (Ozdemir et al, 2016) και ακόμα πιο σπάνια νεαρών κοριτσιών, σύμφωνα με αναφορές περιστατικών (Kurtmen et al, 2017).

Το ινοσάρκωμα ενηλίκων ταξινομείται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως κακόηθες (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2018), με

επιδεινούμενο προσδόκιμο επιβίωσης όταν συντελούν οι παρακάτω παράμετροι: α) υψηλός βαθμός ιστολογικής ταξινόμησης, β) εκτεταμένη ιστική νέκρωση (> 50%), γ) αυξημένη μίτωση (>20/10 κ.ο.π), δ) μειωμένο πηλίκο κολλαγόνων ινών ως προς την κυτταρικότητα, ε) εν τω βάθει εντοπισμένοι όγκοι και στ) όγκοι υπερβαίνοντες τα 5 εκ., με την ιστοπαθολογική ταξινόμηση να αποτελεί τον ισχυρότερο προγνωστικό παράγοντα (Augsburger et al, 2017).

Αντιθέτως, το νεανικό ινοσάρκωμα έχει πολύ καλύτερη πρόγνωση (Fisher et al, 2010), ενώ ταξινομείται ως ενδιάμεσης κακοήθειας, καλά διαφοροποιημένος όγκος (Grade I) που μεθίσταται σπάνια (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2018). Η πιθανότητα απομακρυσμένων μεταστάσεων εκτιμάται περίπου στο 5-10% (Sargar et al, 2016) και αφορά κυρίως τους πνεύμονες (Augsburger et al, 2017, Sargar et al, 2016), τα οστά, αλλά και τους λεμφαδένες πιο σπάνια (Augsburger et al, 2017), ενώ ο κίνδυνος για τοπική υποτροπή εκτιμάται 17-43%, αλλά με άριστη συνολική επιβίωση ελευθέρας νόσου (Sargar et al, 2016). Ενώ 1/3 των περιπτώσεων υποτροπιάζουν, πολύ λίγες μεθίστανται (0-5%) και η 5ετής επιβίωση ξεπερνά το 90% (Fisher et al, 2010). Η συνολική επιβίωση του παιδικού ινοσαρκώματος υπολογίζεται περίπου στο 80-94% (Dasgupta et al, 2016).

Το παιδικό ινοσάρκωμα θεωρείται ένα από τα σαρκώματα με non-EWS (Ewing Sarcoma Protein) μεταθέσεις. Η πιο συχνή μετάθεση είναι η t(12;15)(p13;q25), που οδηγεί στη σύντηξη του *ETV6 (TEL)*, μέλος μιας ομάδας μεταγραφικών παραγόντων που κωδικοποιεί έναν υποδοχέα/τυροσινική κινάση, ο οποίος έχει την ικανότητα να αυτο-φωσφορυλιώνεται (Fisher et al, 2010). Το αποτέλεσμα αυτής της φωσφορυλίωσης είναι η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών των Ras-MAPK και PI3K-AKT μέσω της συνεπαγόμενης φωσφορυλίωσης του υποστρώματος ινσουλίνης-1 (Fisher et al, 2010). Τελευταία έχουν περιγραφεί δύο τύποι παιδικού ινοσαρκώματος, με τα μικρότερα παιδιά (< 4 ετών) να παρουσιάζουν τη μετάθεση t(12;15)(*ETV-NTRK3*), ενώ τα μεγαλύτερα να εντοπίζουν τη σύντηξη του γονιδίου *BRAF* (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2018) .

Παρακάτω ακολουθούν ο Πίνακας 1, ο οποίος εμπεριέχει την πιο πρόσφατη ιστολογική ταξινόμηση των σαρκωμάτων μαλακών μορίων με βάση το έγκυρο Αμερικάνικο διαδικτυακό σύγγραμμα UpToDate και ο Πίνακας 2, στον οποίο

περιλαμβάνονται οι ταυτοποιημένες επί του παρόντος μεταλλάξεις ορισμένων σαρκωμάτων.

Σημείωση: Οι παρακάτω πίνακες, οι οποίοι έχουν αναφορά σε δημοσιευμένα άρθρα, έχουν μεταφερθεί στην αρχική γλώσσα της δημοσίευσης (αγγλική) χάριν ακριβείας.

Πίνακας 1: ©2013 UpToDate ®

Histologic classification of soft tissue sarcomas - I

Tumors of adipose tissue		
Benign	**Intermediate (locally aggressive)**	**Malignant**
Lipoma Angiolipoma Lipoblastoma Hibernoma Myolipoma Angiomyolipoma	Atypical lipoma/well-differentiated liposarcoma	Dedifferentiated liposarcoma Myxoid liposarcoma Pleomorphic liposarcoma Round cell liposarcoma, Mixed-type liposarcoma

So-called fibrohistiocytic tumors		
Benign	**Intermediate (rarely metastasizing)**	**Malignant**
Giant cell tumor of the tendon sheath Diffuse-type giant cell tumor Deep benign fibrous histiocytoma	Plexiform fibrohistiocytic tumor Giant cell tumor of soft tissues	Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma (MFH)/undifferentiated pleomorphic sarcoma Giant cell MFH/undifferentiated pleomorphic sarcoma with giant cells Inflammatory MFH/undifferentiated pleomorphic sarcoma with prominent inflammation

Tumors of skeletal muscle	
Benign	**Malignant**
Rhabdomyoma	Rhabdomyosarcoma
Tumors of smooth muscle	
Benign	**Malignant**
Deep leiomyoma, Genital leiomyoma Angioleiomyoma	Leiomyosarcoma
Perivascular tumors	
Benign	**Malignant**
Glomus tumor	Malignant glomus tumor

From: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, Eds. Pathology and Genetics of tumours of soft tissue and bone. Lyon, IARC 2002.

Histologic classification of soft tissue sarcomas – II

Tumors of blood and lymph vessels			
Benign	**Intermediate (locally aggressive)**	**Intermediate (rarely metastasizing)**	**Malignant**
Hemangioma Epithelioid hemangioma Lymphangioma	Kaposiform hemangioendothelio ma	Hemangioendothelio ma, retiform and composite Papillary	Angiosarcoma Epithelioid hemangioendothelioma

Angiomatosis		intralymphatic angioendothelioma Kaposi sarcoma	
Fibroblastic and myofibroblastic tumors			
Benign	**Intermediate (locally aggressive)**	**Intermediate (rarely metastasizing)**	**Malignant**
Nodular fasciitis Proliferative fasciitis, proliferative myositis Myositis ossificans (fibro-osseous pseudotumor of the digits) Elastofibroma Juvenile hyaline fibromatosis Inclusion body fibromatosis Fibroma of tendon sheath Desmoplastic fibroblastoma Mammary-type myofibroblastoma Angiomy of fibroblastoma Gardner fibroma Calcifying fibrous	Superficial fibromatoses (palmar, plantar) Desmoid-type fibromatoses Lipofibromatoses	Solitary fibrous tumor, with or without hemangiopericytoma Inflammatory myofibroblastic tumor Low-grade myofibroblastic sarcoma Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma Infantile fibrosarcoma	Adult fibrosarcoma Myxofibrosarcoma Low-grade fibromyxoid sarcoma Sclerosing epthelioid fibrosarcoma

tumor
Giant cell
angiofibroma,
Cellular
angiofibroma

From: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, Eds. Pathology and Genetics of tumours of soft tissue and bone. Lyon, France, IARC 2002.

Histologic classification of soft tissue sarcomas – III

Tumors of cranial and peripheral nerves	
Benign	**Malignant**
Neuroma Nerve sheath ganglion Neuromuscular hamartoma (benign Triton tumor) Schwannoma (neurilemoma) Neurofibroma Ganglioneuroma	Malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST, neurofibrosarcoma) Malignant Triton tumor (MPNST with rhabdomyosarcoma) Malignant granular cell tumor Gastrointestinal autonomic nerve tumor (plexosarcoma) Primitive

		neuroectodermal tumor (PNET) (including extraskeletal Ewing sarcoma, neuroblastoma, and peripheral neuroectodermal tumor [neuroepithelioma])
Extraskeletal cartilaginous and osseous tumors		
Benign		**Malignant**
Soft tissue chondroma		Mesenchymal chondrosarcoma Extraskeletal osteosarcoma
Tumors of uncertain histogenesis		
Benign	**Intermediate (rarely metastasizing)**	**Malignant**
Intramuscular myxoma Juxtaarticular myxoma Deep angiomyxoma Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor Ectopic hamartomatous	Angiomatoid fibrous histiocytoma Ossifying fibromyxoid tumor Mixed tumor/myoepithelioma/parachordoma	Synovial sarcoma Epithelioid sarcoma Alveolar soft part sarcoma Clear cell sarcoma of the soft tissue Extraskeletal myxoid chondrosarcoma (chordoid type) Desmoplastic small

thymoma

round cell tumor
Extrarenal rhabdoid tumor
Malignant mesenchymoma
Neoplasms with perivascular epithelioid cell differentiation (PEComa)
Intimal sarcoma

From: World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone, Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, Eds. Lyon, IARC 2002 and World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics of Tumours of the nervous system, Kleihues P, Cavenee WK, Eds, Lyon, IARC, 2000.

Πίνακας 2: Χρωμοσωμιακές μεταθέσεις στα σαρκώματα

(Chromosomal Translocations in Sarcomas: New Perspectives, An ESUN Article by Gabriela Mercado, MD and Frederic Barr, MD PhD, Copyright © 2006 Liddy Shriver Sarcoma Initiative, PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, Childhood Soft Tissue Sarcoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. 2018)

Diagnosis	Chromosomal Abnormality	Genes Involved
Alveolar rhabdomyosarcoma	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)	PAX3-FKHR PAX7-FKHR
Alveolar soft part sarcoma	t(X;17)(p11.2;q25)	TFE3-ASPL
Angiomatoid fibrous histiocytoma	t(12;16)(q13;p11), t(2;22)(q33;q12),	FUS-ATF1

	t(12;22)(q13;q12)	EWSR1/CREB1 EWS/ATF1
Clear cell sarcoma	t(12;22)(q13;q12), t(2;22)(q33;q12)	EWS-ATF1 EWSR1/CREB1
Congenital fibrosarcoma/ Congenital mesoblastic nephroma	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3
Dermatofibrosarcoma protuberans	t(17;22)(q22;q13)	PDFGB-COL1A1
Desmoid fibromatosis	Trisomy 8 or 20, loss of 5q21	CTNNB1 APC mutations
Desmoplastic small round cell tumor	t(11;22)(p13;q12)	EWS-WT1
Endometrial stromal sarcoma	t(7;17)(p15;q21)	JAZF1-JJAZ1
Epithelioid hemangioendothelioma	t(1;3)(p36;q25)	WWTR1/CAMTA1
Epithelioid sarcoma	Inactivation SMARCB1	SMARCB1
Ewing's sarcoma/ Peripheral primitive neuroectodermal tumor	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(7;22)(p22;q12) t(17;22)(q12;q12) t(2;22)(q33;q12) t(16;21)(p11;q22)	EWS-FLI1 EWS-ERG EWS-ETV1 EWS-FEV EWS-E1AF FUS-ERG
Extraskeletal myxoid chondrosarcoma	t(9;22)(q22;q12), t(9;17)(q22;q11), t(9;15)(q22;q21), t(3;9)(q11;q22)	EWSR1/NR4A3 TAF2N/NR4A3 TCF12/NR4A3 TGF/NR4A3
Hemangiopericytoma	t(12;19)(q13;q13.3) and t(13;22)(q22;q13.3)	
Inflammatory myofibroblastic tumor	t(1;2)(q22;p23) t(2;19)(p23;p13) t(2;17)(p23;q23), t(2;2)(p23;q13), t(2;11)(p23;p15)	TPM3-ALK TPM4-ALK CLTC-ALK RANBP2/ALK, CARS/ALK RAS
Low grade fibromyxoid sarcoma	t(7;16)((q33;p11), t(11;16)(p11;p11)	FUS-CREB3l2 FUS/CREB3L1
Myxoid chondrosarcoma	t(9;22)(q22;q12) t(9;15)(q22;q21)	EWS-CHN TFC12-CHN

	t(9;17)q22;q11)	TAF2N-CHN
Myxoid liposarcoma	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q12)	FUS/DD1T3 EWSR/DD1T3
Synovial Sarcoma	t(X;18)(p11;q11.2)	SSX1-SYT SSX2-SYT SSX4-SYT

Πίνακας 3: Σταδιοποίηση σαρκωμάτων κατά TNM (Augsburger et al , 2017).

Βασιζόμενο στη Διεθνή και Αμερικάνικη Εταιρεία κατά του Καρκίνου (International Union against Cancer (UICC)/American Joint Committee on Cancer (AJCC))

Stage	Grade of differentiation (FNCLCC)	Primary tumour	Local lymph nodes	Distant metastasis
IA	G1, GX	T1a	N0	M0
		T1b	N0	M0
IB	G1, GX	T2a	N0	M0
		T2b	N0	M0
IIA	G2, G3	T1a	N0	M0
		T1b	N0	M0
IIB	G2	T2a	N0	M0
		T2b	N0	M0
III	G3	T2a	N0	M0
		T2b	N1	M0
	Any G	any T	N1	M0
IV	Any G	any T	Any N	M1

Ιστολογική σταδιοποίηση (G), GX: δεν μπορεί να εκτιμηθεί ο βαθμός; G1: χαμηλού βαθμού; G2, G3: υψηλού βαθμού, Πρωτοπαθής όγκος (T), TX: δεν μπορεί να εκτιμηθεί ο πρωτοπαθής όγκος; T0: απουσία ένδειξης πρωτοπαθούς όγκου; T1: μέγεθος > 5 εκ.; T1a: επιφανειακός όγκος; T1b: εν τω βάθει όγκος, T2 μέγεθος < 5 εκ.; T2a: επιφανειακός όγκος ; T2b: εν τω βάθει όγκος, Τοπικοί λεμφαδένες (N), NX: δεν μπορούν να εκτιμηθούν οι τοπικοί λεμφαδένες; N0: απουσία μετάστασης σε τοπικούς λεμφαδένες; N1: μετάσταση σε τοπικούς λεμφαδένες, Απομακρυσμένη μετάσταση (M), M0: απουσία μετάστασης σε λεμφαδένες; M1: μετάσταση σε τοπικούς λεμφαδένες.

1.1.3 Ινοσάρκωμα: Αντιμετώπιση

Στα παιδιά, το ινοσάρκωμα έχει καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τους ενήλικες, παρ'όλο που παρουσιάζει υποτροπές (Hiradfar et al, 2015). Η θεραπεία εκλογής είναι η χειρουργική αφαίρεση, η οποία στις περιπτώσεις του παιδικού ινοσαρκώματος φαίνεται να είναι πολύ συχνά θεραπευτική, ανεξαρτήτως του τμήματος των υγιών ορίων κατά την εκτομή (Dasgupta et al, 2016). Σε διαφορετικές περιπτώσεις όμως, η χημειοθεραπεία (είτε ως επικουρική, είτε ως μονοθεραπεία), έχει δείξει θετικά αποτελέσματα ως προς την πρόληψη της τοπικής υποτροπής και μετάστασης (Ferrari et al, 2005, Hiradfar et al, 2015, Parida et al, 2013, PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2018).

Η συνηθισμένη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής που δίνεται στα προχωρημένα σαρκώματα μαλακών μορίων (με εξαίρεση τους στρωματικούς όγκους του γαστρεντερικού) είναι συνήθως ανθρακυκλίνες όπως η δοξορουβυκίνη ως μονοθεραπεία (Augsburger et al , 2017), ή σε συνδυασμό με την ιφωσφαμίδη (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2018). Στις περιπτώσεις που αποτυγχάνουν αυτά τα φάρμακα, έχει έγκριση η τραμπεκτιδίνη. Η αναμενόμενη βελτίωση της συνολικής επιβίωσης έχει εκτιμηθεί να ανέρχεται στο 4-11% (Augsburger et al, 2017).

Στις περιπτώσεις του παιδικού ινοσαρκώματος όμως, τα χημειοθεραπευτικά που στερούνται αλκυλοποιητικών παραγόντων και ανθρακυκλινών φαίνεται να είναι αποτελεσματικά ως πρώτη χημειοθεραπευτική αντιμετώπιση ανεγχείρητων όγκων (Orbach et al, 2010, Orbach et al, 2016), με την ανταπόκριση σε σχήμα βινκριστίνης-ακτινομυκίνης Δ να ανέρχεται στο 68% (Orbach et al, 2016). Άλλα χημειοθεραπευτικά που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος στο παιδικό ινοσάρκωμα είναι η δακτινομυκίνη και η κυκλοφωσφαμίδη και ο κατάλληλος συνδυασμός όλων των παραπάνω μπορεί να δώσει την ευκαιρία στους μικρούς ασθενείς να αποφύγουν ακρωτηριαστικά χειρουργεία και περαιτέρω τοξικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Dasgupta et al, 2016). Χρειάζεται όμως επαγρύπνιση για τις περιπτώσεις πολυφαρμακευτικής αντοχής που παρουσιάζεται κυρίως με τη χορήγηση δοξορουβικίνης (Augsburger et al , 2017).

Μεταξύ των χημειοθεραπευτικών όπλων που διαθέτουμε σήμερα για την αντιμετώπιση αυτού του σπάνιου αλλά συνάμα επιθετικού όγκου, αναφέρονται σε πρόσφατες μελέτες οι υποσχόμενοι αναστολείς τυροσινικών κινασών. Ένας από αυτούς είναι το pazopanib, που μεταξύ άλλων, στοχεύει και τον υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR) (Yanagisawa et al, 2016). Το pazopanib ερευνήθηκε σε μία διεθνή τυχαιοποιημένη διπλή τυφλή μελέτη φάσης III (PALETTE) που μελέτησε 369 ασθενείς με διάφορους τύπους σαρκωμάτων μαλακών μορίων (συμπεριλαμβανομένου και του ινοσαρκώματος), στους οποίους η συνηθισμένη χημειοθεραπεία είχε αποτύχει. Η μελέτη αυτή έδειξε σημαντικά μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου σε ασθενείς που λάμβαναν το φάρμακο σε σχέση με αυτούς που έλαβαν placebo (van der Graaf et al, 2012).

Παρομοίως, το crizotinib, ένας αναστολέας της κινάσης του αναπλαστικού λεμφώματος (ALK) και αναστολέας του ROS1 (c-ros oncogene 1) έχει δείξει θετικά αποτελέσματα σε συγκεκριμένα παιδιά με συντήξεις των *LMNA/NTRK1* γονιδίων (Mody et al, 2015, Wong et al, 2015).

Κατά τη συγκεριμένη διατριβή μελετήθηκε συγκεκριμένα το ινοσάρκωμα ενηλίκων και χάριν απλούστευσης, όταν αναφέρεται ο όρος αυτός, δεν θα διαχωρίζεται ξανά από τους άλλους όμοιους τύπους. ‘Οπως προαναφέρθηκε, οι πειραματικές διαδικασίες διενεργήθηκαν σε κυτταροκαλλιέργιες ανθρώπινου ινοσαρκώματος HT1080.

1.2 Εξωκυττάριος χώρος

1.2.1 Εξωκυττάριος χώρος: στον υγιή οργανισμό και στον καρκίνο

Ο ΄΄εξωκυττάριος χώρος΄΄ (ECM: extracellular matrix) αποτελεί ένα ακύτταρο, τρισδιάστατο, πολυδύναμο δίκτυο μακρομορίων, το οποίο περιβάλλει τα κύτταρα (Theocharis et al, 2016). Αυτός ο χώρος χαρακτηρίζεται από μία περίπλοκη δυναμική, με φυσικές, βιοχημικές και βιομηχανικές ιδιότητες. Άμεσα ή έμμεσα, ο ECM μπορεί να καθορίζει τις κυτταρικές λειτουργίες και γενικότερα την ανάπτυξη του οργανισμού. Ανάμεσα στις λειτουργίες του, η παραγωγή μορίων, καθώς και η

αποδόμηση και η ανακατασκευή του είναι απαραίτητες για την ομοιόσταση του οργανισμού. Η παρεμπόδιση των λειτουργιών αυτών οδηγεί στη νόσηση και πιο ειδικά, στον καρκίνο (Lu et al, 2012).

Τα συστατικά του ECM μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με τη βασική τους λειτουργία σε 3 ομάδες (Tracy et al, 2016). Στην πρώτη συμπεριλαμβάνονται αυτά που δημιουργούν ένα περίπλοκο τρισδιάστατο δίκτυο από άκαμπτες πρωτεΐνες (fiber-forming), στην οποία ανήκουν το κολλαγόνο, η ινονεκτίνη, η βιτρονεκτίνη, η ελαστίνη και η φιμπριλίνη. Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν πρωτεογλυκάνες (PG) και γλυκοζαμινογλυκάνες (GAG), οι οποίες δεν σχηματίζουν ίνες, αλλά δημιουργούν έναν φορτισμένο, δυναμικό και οσμωτικά ενεργό χώρο. Και τέλος, στην τρίτη ομάδα περιλαμβάνονται πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στην αυτοκρινή ή παρακρινή σηματοδότηση μεταξύ του κυττάρου και του εξωκυττάριου χώρου, χωρίς να συμμετέχουν στη μηχανική στήριξη του ECM. Σε αυτές ανήκουν οι οστεοποντίνη, η τενασκίνη-C, οι ινουλίνες και η οικογένεια πρωτεϊνών CCN (Tracy et al, 2016). Δομικά, τα συστατικά αυτά συνθέτουν τόσο τη βασική μεμβράνη, η οποία συντίθεται από κοινού από τα επιθηλιακά, ενδοθηλιακά και τα στρωματικά κύτταρα προκειμένου να διαχωριστεί το επιθήλιο ή το ενδοθήλιο από το στρώμα, αλλά και το διάμεσο ιστό, ο οποίος αποτελείται κατά κύριο λόγο από τα στρωματικά κύτταρα (Lu et al, 2012). Τα μόρια του ECM έχουν άμεση επαφή και επικοινωνία μεταξύ τους, αλλά και με υποδοχείς κυτταρικής προσκόλλησης, με συνεπακόλουθη τη μετάδοση σημάτων από τον ECM προς τον ενδοκυττάριο χώρο, και τελικά τη ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης, ανάπτυξης, διαφοροποίησης και μετανάστευσης (Theocharis et al, 2016).

Η παρακρινής δραστηριότητα που παρατηρείται μέσα στον ECM είναι προϊόν της αλληλεπίδρασης μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντός τους. Ουσιαστικά ενεργοποιούνται στρωματικά κύτταρα, ινοβλάστες, λιποκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, και ελκύονται παρακρινώς κύτταρα της άμυνας, ενδοθηλιακά, αλλά και μεσεγχυματικά πρόδρομα κύτταρα (Augsburger et al, 2017).

Η βασική μεμβράνη αποτελεί ένα εξειδικευμένο κομμάτι του ECM, πιο συμπαγές και λιγότερο πορώδες από το διάμεσο ιστό. Συντίθεται χαρακτηριστικά

από κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνες, ινονεκτίνη, και συνδετικές πρωτεΐνες, οι οποίες συνδέουν τα κολλαγόνα με άλλες πρωτεΐνες. Εν αντιθέσει, ο διάμεσος ιστός είναι πλούσιος σε ινιδώδη κολλαγόνα, ινονεκτίνη, πρωτεογλυκάνες, και διάφορες γλυκοπρωτεΐνες όπως τενασκίνη C. Αυτή η σύνθεση του προσδίδει φορτία, ενυδάτωση και συμβάλλει σημαντικά στην αντοχή σε εφελκυσμό των ιστών (Lu et al, 2012).

Όσον αφορά τις φυσικές ιδιότητές του, ο ECM προσδίδει στα όργανα την κατάλληλη ελαστικότητα, καθορίζει το πόσο αραιός, ακέραιος και αδιάλυτος είναι ο ιστός και επίσης τον προσανατολίζει και τον στηρίζει. Παράλληλα, μπορεί να λειτουργήσει ως φραγμός και είτε να βοηθήσει τα κύτταρα να αγκυροβολήσουν, ή να μετακινηθούν (Lu et al, 2012, Theocharis et al, 2016).

Οι βιοχημικές ιδιότητες του ECM αφορούν τη δυνατότητα άμεσης και έμμεσης σηματοδότησης που επιτρέπει στα κύτταρα να αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον τους, όπως προαναφέρθηκε (Augsburger et al , 2017). Τα κύτταρα καταφέρνουν να επικοινωνούν με το περιβάλλον τους με τη χρήση διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών από την κυτταρική επιφάνεια προς τον πυρήνα, με αποτέλεσμα την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων και ανάλογες αλλαγές στην κυτταρική συμπεριφορά. Για παράδειγμα, εμπεριέχοντας ένα έντονα φορτισμένο δίκτυο πρωτεϊνών πλούσιο σε τροποποιήσεις των πολυσακχαριτών, ο ECM έχει τη δυνατότητα να συνδεθεί με μια πλειάδα αυξητικών παραγόντων, όπως τις μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών, τους αυξητικούς παράγοντες των ινοβλαστών (FGFs), τις πρωτεΐνες Hedgehogs, Wnts πρωτεΐνες κ.α. (Lu et al, 2012). Κατ'αυτόν τον τρόπο, ο ECM περιορίζει τη διαθεσιμότητα των παραγόντων αυτών, ελέγχει τη σύνδεσή τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς και κατά συνέπεια ελέγχει τη βιολογική τους δράση (Lu et al, 2012).

Βιομηχανικά, ο ECM καταφέρνει μέσω της ελαστικότητάς του να καθορίσει το πώς το κύτταρο αντιλαμβάνεται τις περιβαλλοντικές αλλαγές και να προσαρμοστεί καταλλήλως. Πιο συγκεκριμένα, το κύτταρο αισθάνεται τις μηχανικές αλλαγές μέσω των σύνθετων εστιακών συμπλεγμάτων προσκόλλησης, τα οποία συνδέουν τον ECM με τον κυτταροσκελετό ακτίνης/μυοσίνης (Lu et al, 2012). Αντίστοιχα, οι εστίες προσκόλλησης μπορούν να δημιουργηθούν και να αυξηθούν μόνο όταν ασκούνται

οι κατάλληλες δυνάμεις μέσω του κυτταροσκελετού. Κατ'αυτόν τον τρόπο, η περιεκτικότητα και ο βαθμός ακαμψίας του ECM μπορεί να επηρεάσει κυτταρικές λειτουργίες, όπως η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωσή τους (Kim et al, 2011). Τα σύμπλοκα εστιακής προσκόλλησης περιλαμβάνουν τις ιντεγκρίνες και άλλες πρωτεΐνες, όπως η talin και η p130 Cas, οι οποίες υφίστανται δομικές αλλαγές από τις δυνάμεις του ECM (Lu et al, 2012). Άλλα μόρια με τα οποία το κύτταρο επικοινωνεί με τον ECM είναι οι συνδεκάνες, το CD44 (γλυκοπρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης) και ο υποδοχέας RHAMM (υποδοχέας του υαλουρονικού οξέος) (Nikitovic et al, 2013). Οι αλλαγές στον ECM μεταβιβάζονται μέσω της κυτταρικής σηματοδότησης συμβατικών μονοπατιών, όπως για παράδειγμα του TGFβ. Ως αποτέλεσμα, ο ECM μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία των ιστών μέσω των βιομηχανικών ιδιοτήτων του (Nikitovic et al, 2013).

Φυσιολογικά, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ώστε να διατηρούν την ομοιόσταση του οργανισμού και να προστατεύονται, ώστε να μην μετατραπούν σε καρκινικά. Όταν όμως συσσωρευτούν πολλαπλές ογκογόνες μετατροπές, τα κύτταρα χάνουν τη διαφοροποίησή τους και την πολικότητά τους, με αποτέλεσμα να διασπούν την ακεραιότητα των ιστών και να προωθούν την ίδια τους την ανάπτυξη και μετανάστευση σε απομακρυσμένα σημεία. Ο ECM συμμετέχει στην καρκινογένεση, καθώς δομικές αλλαγές, ανωμαλίες στην ανακατασκευή του ή ανωμαλίες άλλων λειτουργιών του μπορούν να πυροδοτήσουν αλλαγές στα κύτταρα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία όγκων. Τέτοιες αλλαγές αφορούν την πολικότητα, την πάχυνση των κολλαγόνων ινών που υποβοηθά τη μετάσταση των όγκων, την καταστροφή των βασικών μεμβρανών ως φυσικό φραγμό (μέσω υπερέκφρασης μεταλλοπρωτεϊνασών (MMPs) που μπορούν να αποδομούν πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου), την επίδραση στα στρωματικά κύτταρα (ενδοθηλιακά, ινοβλάστες, κύτταρα ανοσοποιητικού) και τη μετατροπή των επιθηλιακών σε μεσεγχυματικά κύτταρα, που αυτομάτως τα καθιστά περισσότερο επιθετικά. Η αγγειογένεση, η λεμφαγγειογένεση και η φλεγμονή, οι οποίες είναι απαραίτητες διαδικασίες για την εξάπλωση του όγκου, βασίζονται στον ECM (Lu et al, 2012).

Στον ECM ενός όγκου τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες που στρατολογούν στρωματικά κύτταρα, όπως ινοβλάστες, φλεγμονώδη και ενδοθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα να αναδιαμορφώνεται ο ECM και να προωθείται η αγγειογένεση που είναι απαραίτητη για την εξέλιξη του όγκου. Παράλληλα, τα ενεργοποιημένα στρωματικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με αυξητικούς παράγοντες και οι ιδιότητές του αλλάζουν δραματικά. Θεωρείται ότι ο καρκινικός ECM έχει αρκετές ομοιότητες με τον ECM που υφίσταται ιστική ανάπλαση, οποίος είναι πλούσιος σε γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες, υαλουρονικό οξύ, κολλαγόνα, αυξητικούς παράγοντες, ένζυμα (όπως MMPs), κυτοκίνες και χημειοκίνες, προκειμένου να υποστηρίξει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κινητικότητα (Theocharis, Karamanos et al, 2017).

Οι MMPs εκκρίνονται από τα καρκινικά αλλά και από τα στρωματικά κύτταρα των όγκων (van der Horst et al, 2012) και συμμετέχουν σημαντικά στην αποδόμηση/αναδιαμόρφωση του ECM, με την ιδιότητα της αποδόμησης να υπερτερεί στις περιπτώσεις της εμβρυογένεσης και της επούλωσης των ιστών (Augsburger et al, 2017). Η δράση τους φαίνεται να τελεί υπό τον έλεγχο πολλαπλών διαφορετικών παραγόντων, όπως τη διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη RECK (reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs) η οποία ρυθμίζει την κατασκευαστική ισορροπία του ECM (Nagini et al, 2012, Alexius-Lindgren et al, 2014), την α2-μακροσφαιρίνη, τις θρομβοσπονδίνες 1 & 2 (Augsburger et al, 2017), τους ιστικούς ανασταλτές των μεταλλοπρωτεϊνασών (TIMPS) (Nagase et al, 2006), τον αναστολέα ιστικού παράγοντα-2 TFPI-2 (tissue factor pathway inhibitor-2 (Herman et al, 2001), καθώς και την καρβοξυτελική περιοχή του ενισχυτή πρωτεάσης του προκολλαγόνου CT-PCPE (procollagen C-terminal proteinase enhancer) (Mott et al, 2000).

Η αποδόμηση του ECM, με την αναίρεση των γύρω φραγμών, επιτρέπει τη διήθηση του όγκου στους παρακείμενους ιστούς, καθώς και τις απομακρυσμένες μεταστάσεις. Αναμενόμενο είναι, επομένως, στις περιοχές με ανάλογη δραστηριότητα να παρατηρείται αυξημένη έκφραση MMPs (Augsburger et al, 2017). Παράλληλα, η αποδόμηση του ECM γεννά την απελευθέρωση χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων, ενώ εκθέτει περιοχές κατάλληλες για την πρόσδεση

ιντεγκρινών που βρίσκονται πάνω στα καρκινικά κύτταρα, υποβοηθώντας με αυτόν τον τρόπο την κινητικότητα του όγκου (van der Horst et al, 2012). Εν συνεχεία, η παρελκόμενη ενεργοποίηση μονοπατιών, όπως το RAS, MAPK/ERK και PI3K/AKT/mTOR, ενισχύει τον πολλαπλασιασμό και την προωθητικότητα των καρκινικών κυττάρων. Παράλληλα, μέσω περίπλοκων μονοπατιών, εκκλυόμενων από αυξητικούς παράγοντες, ιντεγκρίνες, ανοσιακά κύτταρα κ.α., διαμορφώνεται η αγγειογένεση και τελικά η επιβίωση και αύξηση του όγκου (van der Horst et al, 2012).

Γενικά, ο ECM, δρώντας ως δεξαμενή για αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες μπορεί να επηρεάσει την κακοήθη συμπεριφορά των κυττάρων (Berdiaki et al, 2009). Λαμβάνοντας υπόψιν όλες τις παράνω ιδιότητες, φαίνεται φυσικό να αποτελεί 'αγκυροβόλιο' για τα κύτταρα. Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι απαιτείται για την κινητικότητα, τον πολλαπλασιασμό, τη διείσδυση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, εφόσον τους δίνει τη δυνατότητα να προσκολληθούν και στη συνέχεια να μετακινηθούν (Nikitovic et al, 2013).

1.2.2 Εξωκυττάριος χώρος στο ινοσάρκωμα

Ο ECM του ινοσαρκώματος χαρακτηρίζεται από αυξημένη σύσταση, καθώς και μεταβολισμό πρωτεογλυκανών, κολλαγόνων, ινονεκτίνης, λαμινίνης και υαλουρονικού οξέος (Kouvidi et al, 2014, Augsburger et al , 2017).

Προκειμένου να μιμηθεί ο ECM το φυσιολογικό περιβάλλον των κυττάρων, πρόσφατες έρευνες έχουν στραφεί περισσότερο προς την τεχνητή δημιουργία τρισδιάστατων (3D) ή μαλακών υποστρωμάτων ανανεώνοντας σε μεγάλο βαθμό την παρούσα γνώση (Fraley et al, 2010, Tovari et al, 2014). Λόγω των γεωμετρικών αλλαγών, παρατηρούνται πολύ σημαντικές διαφορές στον τρόπο με τον οποίο κινούνται τα κύτταρα του ινοσαρκώματος στον ECM σε σχέση με τις προϋπάρχουσες πληροφορίες από δισδιάστατα (2D) μοντέλα. Σε αντίθεση με τα 2D πειράματα, μία από τις τρισδιάστατες μελέτες ζωντανής μικροσκόπησης κυττάρων σε 3D ECM έδειξε ότι οι πρωτεΐνες εστιακής προσκόλλησης βρίσκονταν διασκορπισμένες στο κυτταρόπλασμα, ενώ δεν ανευρέθησαν εστίες προσκόλλησης όπως ήταν

αναμενόμενο. Αντιθέτως, βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες εστιακής προσκόλλησης ρυθμίζουν την κινητικότητα/ταχύτητα των κυττάρων του ινοσαρκώματος επηρεάζοντας τις μεμβρανικές προβολές του κυττάρου αλλά και τη διαμόρφωση του ECM (Fraley et al, 2010). Στη συνέχεια, μεταγενέστερη τρισδιάστατη μελέτη ανέδειξε την παρουσία εστιών προσκόλλησης που περιείχαν βινκουλίνη στην κορυφή μόνο των κυττάρων του ινοσαρκώματος, σχηματίζοντας ένα δακτύλιο ο οποίος διευρυνόταν καθώς το κύτταρο προχωρούσε από τους πόρους του φίλτρου προς το έδαφος του θαλαμίσκου, όπου βρισκόταν και ο χημειοτακτικός παράγοντας (ινονεκτίνη, matrigel, ή κολλαγόνο τύπου I), ενώ η ακτίνη εντοπίστηκε κάτω από την πλασματική μεμβράνη (Tovari et al, 2014).

Ένα φαινόμενο που παρατηρείται στο ινοσάρκωμα είναι η αντοχή στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα (Fidler et al, 1994, Poland et al, 2002) και ένας πιθανός μηχανισμός είναι η κυτταρική προσκόλληση CAM-DR (cell adhesion mediated drug resistance) (Cukierman et al, 2012, Shain et al, 2001). Η αλληλεπίδραση αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών και χημειοκινών με τα καρκινικά κύτταρα επιδρά στα ενδοκυττάρια μονοπάτια που χρησιμοποιούν οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες και ως εκ τούτου, παρακωλύει την αποτελεσματική θεραπεία (Augsburger et al , 2017).

Παράλληλα, το ινοσάρκωμα προστατεύεται από την επίδραση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων στον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική μετανάστευσή του μέσω της αφθονίας του ομοτριμερούς κολλαγόνου τύπου I (Fourre et al, 2008, Makareeva et al, 2010), μία μορφή κολλαγόνου που αμύνεται της αποδόμησης από MMPs (Han et al, 2010, Makareeva et al, 2010). Η αυτοκρινής αλληλεπίδραση μεταξύ του κολλαγόνου και των καρκινικών κυττάρων και πιθανώς η καταστροφή του κολλαγόνου τύπου I μπορεί να βελτιώσει το αποτέλεσμα των φαρμάκων. Τέλος, εφόσον το συγκεκριμένο είδος κολλαγόνου δεν εκκρίνεται από φυσιολογικούς ινοβλάστες (Makareeva et al, 2010), αλλά στην περίπτωση εμβρυϊκού ιστού, σε κατάσταση ίνωσης και καρκίνου (Han et al, 2010), η παρουσία του μπορεί να σημαίνει υποτροπή του όγκου μετά από χειρουργείο.

Επιπλέον, διερευνώντας την αντίσταση στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, οι ερευνητές έχουν στραφεί επιτυχημένα στα καρκινικά βλαστοκύτταρα. Πρόκειται για πολυδύναμα κύτταρα που, εκτός από τα

φυσιολογικά όργανα, συναντώνται και μέσα στον όγκο ως μειονότητα και έχουν δυνατότητες ανανέωσης και διαφοροποίησης σε πολλές κυτταρικές σειρές (Feng et al, 2013). Προκειμένου να τελέσουν τις λειτουργίες τους με επιτυχία, τα βλαστοκύτταρα επικοινωνούν με τον ECM, όπως τα μόρια κολλαγόνου και τις μορφοποιητικές πρωτεΐνες του οστού (BMPs) στην περίπτωση της ωοθήκης (Hynes et al, 2009).

Η συμμετοχή των καρκινικών βλαστοκυττάρων στην ογκογένεση έχει περιγραφεί περισσότερο τις τελευταίες 2 δεκαετίες, καθώς φαίνεται να καθοδηγούν τον κακοήθη μετασχηματισμό και τον συνεχή πολλαπλασιασμό και αύξηση των όγκων (Clarke et al, 2006, Feng et al, 2013, Reya et al, 2001, Zhao et al, 2012). Χρησιμοποιώντας ειδικούς δείκτες-μόρια (όπως τα CD29, CD34, CD44, CD90, CD117 και CD133) μπορούν να ανιχνευτούν αυτά τα κύτταρα ανάμεσα στα καρκινικά (Dela Cruz et al, 2013, Tirino et al, 2011). Όσον αφορά το ινοσάρκωμα, τα κύτταρα με το ειδικό αντιγόνο-δείκτη της παρουσίας των καρκινικών βλαστοκυττάρων CD133 παρουσιάζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό, υπερέκφραση γονιδίων που προωθούν τον καρκίνο και τελικά, αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα (Feng et al, 2013). Ένας δείκτης ακόμα που έχει συσχετιστεί με βλαστοκύτταρα μέσα στο ινοσάρκωμα είναι ο ALDH (Dela Cruz et al, 2013).

Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, ο ECM του ινοσαρκώματος φιλοξενεί διάφορους αυξητικούς παράγοντες. Ένας μεγάλος αριθμός αυτών, όπως ο αυξητικός παράγοντας του μετασχηματισμού (TGF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών 2 (FGF2), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας (IGF-I) έχουν τη δύναμη να οδηγήσουν τον ECM σε ανακατασκευή, δημιουργία στρώματος και τελικά στην πρόοδο του ινοσαρκώματος. Το επιτυγχάνουν αυτό μέσω της παραγωγής πρωτεογλυκανών, υαλουρονικού οξέος μαζί με τους υποδοχείς του (CD44 και RHAMM), καθώς και MMPs (Nikitovic et al, Curr Med Chem, 2013). Τα μόρια αυτά έχουν την ικανότητα να διαμορφώνουν τον εξωκυττάριο χώρο και να ενδυναμώνουν το ινοσάρκωμα (Nikitovic et al, Curr Med Chem, 2013).

Ο ECM είναι απαραίτητος ακόμα και για τις βασικές λειτουργίες ενός όγκου. Έτσι και στην περίπτωση του ινοσαρκώματος, ένα μόριο του ECM, το MULTI

MERIN2 (MMRN2) εμποδίζει την αγγειογένεση και κατά συνέπεια την πρόοδο του όγκου μέσω της σύνδεσής του με τον VEGF-A (Colladel et al, 2016).

Παράλληλα, το υαλουρονικό οξύ αποτελεί έναν άλλο παράγοντα, ο οποίος μέσω του ECM επιδρά στην εξέλιξη του ινοσαρκώματος (Nikitovic et al, 2013). Είναι γνωστό ότι ο FGF-2 καταφέρνει μέσω της αυξημένης σύνθεσης ισομορφών της συνθάσης του υαλουρονικού οξέος (HAS) και κατά συνέπεια του ίδιου του υαλουρονικού στον περικυττάριο χώρο του ινοσαρκώματος, να ρυθμίσει την κυτταρική μετανάστευση (Nikitovic et al, 2013). Μία σχετικά πρόσφατη μελέτη από το εργαστήριό μας έδειξε ότι ο υποδοχέας του υαλουρονικού οξέος, RHAMM, συνυπάρχει με τη β-catenin, ένα διαμεσολαβητή της δράσης του Wnt, που επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Κατά αυτόν τον τρόπο, ο RHAMM προστατεύει τη β-catenin από αποδόμηση και ενισχύει τη μετάβασή της στον πυρήνα, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του c-myc και την αύξηση του όγκου του ινοσαρκώματος (Kouvidi et al, 2016).

Η εφαρμογή ανοσοφθορισμού στο ινοσάρκωμα έχει αναδείξει μεγάλη περιεκτικότητα του ECM σε κολλαγόνο I, III και V, με το κολλαγόνο III να υπερέχει του I. Τα αποτελέσματα αυτά το ξεχωρίζουν από άλλους παρόμοιους όγκους, όπως το προέχων ινοσάρκωμα, το κακόηθες ινώδες ιστιοκύτωμα και το νευρογενές ινοσάρκωμα, καθώς σε αυτά παρατηρείται κολλαγόνο IV και επίσης το I προέχει του III (Smirnov et al, 1988). Η ισορροπία των συστατικών του ECM είναι καθοριστική για την πρόοδο του όγκου, καθώς αλλαγές των σχέσεων μπορεί να επηρεάσουν τις κυτταρικές λειτουργίες. Αυτό αποδείχθηκε σε μελέτη in vitro των κυττάρων του ινοσαρκώματος, όπου η προσθήκη κολλαγόνου XV αναχαίτισε την ικανότητα προσκόλλησης και μετανάστευσης των κυττάρων (Hurskainen et al, 2010).

Στην προσπάθεια να κατανοηθεί η παθογένεση του ινοσαρκώματος και ιδιαίτερα όσον αφορά τον ECM, έχουν διερευνηθεί συγκεκριμένα μόρια, όπως το ADAMTS-1, μία δυσιντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεϊνάση με μοτίβα θρομβοσπονδίνης, η οποία έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τον ECM σε φυσιολογικούς και παθολογικούς ιστούς (Noriega-Guerra et al, 2018). Φαίνεται από πειράματα ότι μέσω του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF) το ADAMTS-1 μπορεί να επηρεάσει μονοπάτια όπως το c-Met, ERK1/2 και FAK και

τελικά να αλλάξει τον σχηματισμό του όγκου και την κυτταρική συμπεριφορά (Noriega-Guerra et al, 2018).

Κατά τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του ινοσαρκώματος με τον ECM ένα ακόμη μόριο έχει έλθει πρόσφατα στο φως με την τεχνική των ανοσολιποσωμάτων. Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη ενεργοποίησης των ινοβλαστών (FAP) ενισχύει την κινητικότητα και τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του ινοσαρκώματος, τα οποία τη χρησιμοποιούν στη συνέχεια για την ενδαγγείωσή τους και την κυκλοφορία στα διάφορα συστήματα (Tansi et al, 2016).

Τέλος, μία ενδιαφέρουσα μελέτη με στόχο τη δημιουργία τεχνητού ECM που ωστόσο μιμείται τη δυναμικότητα και τις λειτουργίες του, έχει δημοσιευτεί πρόσφατα. Σύμφωνα με αυτήν, αποδεικνύεται μία άμεση σχέση απάντησης των ινών του ECM στα κύτταρα του ανθρώπινου ινοσαρκώματος. Συγκεκριμένα, υποστηρίζεται ότι η στοίχιση των ινών επηρεάζει θετικά την πολικότητα και ταχύτητα κίνησης των κυττάρων του ινοσαρκώματος (Wang et al, 2017). Οι συγκεκριμένες τεχνικές αναμένεται να διαφωτίσουν όλο και περισσότερο τους ερευνητές όσον αφορά τη σχέση των καρκινικών κυττάρων και της μηχανικής/λειτουργικότητας του ECM.

1.3 Δομή και βασικά χαρακτηριστικά των πρωτεογλυκανών /γλυκοζαμινογλυκανών

Με τον όρο πρωτεογλυκάνες αναφερόμαστε σε πολυδύναμα μόρια με καλά χαρακτηρισμένους ρόλους έως τώρα για τη μοίρα του κυττάρου. Περιλαμβάνουν τουλάχιστον μία γλυκοζαμινογλυκανική (GAG) αλυσίδα, όπως η θειϊκή ηπαράνη (HS)/ηπαρίνη, η θειϊκή δερματάνη (DS), η θειϊκή χονδροϊτίνη (CS) και η θειϊκή κερατάνη (KS), ομοιοπολικά προσδεδεμένη σε ένα πρωτεϊνικό κορμό (Baghy et al, 2016, Theocharis, Karamanos et al, 2017). Παράλληλα, υπάρχουν και οι υβριδικές πρωτεογλυκάνες, οι οποίες μπορεί να έχουν περισσότερες από μία GAG αλυσίδες στον πρωτεϊνικό τους κορμό (Theocharis, Karamanos et al, 2017). Οι πρωτεογλυκάνες μπορεί να ταξινομηθούν ανάλογα με την εντόπισή τους (εξωκυττάριες, περικυττάριες, κυτταρικής μεμβράνης και ενδοκυττάριες), τη

γονιδιακή τους ομολογία, τη σύσταση και τις μοναδικές ιδιότητές τους (Iozzo et al, 2015). Στις ενδοκυττάριες ανήκει η σεργλυκίνη (με αλυσίδες ηπαρίνης) που βρίσκεται σε κοκκία σιτευτικών κυττάρων, ενώ με την κυτταρική μεμβράνη σχετίζονται οι γλυπικάνες, οι συνδεκάνες, η βηταγλυκάνη, η φωσφακάνη και το CD44. Η περλεκάνη, η αγκρίνη, το κολλαγόνο XV και XVIII αποτελούν περικυττάριες PGs, ενώ στις εξωκυττάριες ανήκουν οι υαλεκτάνες (αγκρεκάνη, βερσικάνη, νευροκάνη, μπρεβικάνη), οι μικρές πρωτεογλυκάνες πλούσιες σε λευκίνη (SLRPs) (διγλυκάνη, ντεκορίνη, ασπορίνη, ινομοδουλίνη, ECM2, ECMX, λουμικάνη, PRELP, κερατοκάνη, επιφυκάνη, οπτικίνη, οστεογλυκίνη, χονδρονεκτίνη, νυκταλοπίνη, ποδοκάνη, podocan-like 1, Tsukushi, οι τεστικάνες και η οστεονεκτίνη (Iozzo et al, 2015).

Η GAG αλυσίδα των πρωτεογλυκανών δομείται με επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες, η κάθε μία από τις οποίες περιλαμβάνει ουρονικό οξύ και μία ακετυλιωμένη ή θειωμένη εξοζαμίνη (D-γλυκοζαμίνη, N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη, ή N-ακετυλ-D-γαλακτοζαμίνη). Το μήκος των GAG αλυσίδων ποικίλλει. Οι HS αλυσίδες αποτελούνται από γλυκουρονικό οξύ και N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη, οι CS περιλαμβάνουν γλυκουρονικό οξύ και N-ακετυλ-D-γαλακτοζαμίνη, οι DS έχουν ιδουρονικό οξύ και N-ακετυλ-D-γαλακτοζαμίνη και οι KS αποτελούνται από θειωμένη γαλακτόζη με κατάλοιπα N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης. Μερική θείωση της D-γλυκοζαμίνης στις HS δημιουργεί εναλασσόμενες N-ακετυλιωμένες και N-θειωμένες περιοχές. Οι N-θειωμένες περιοχές έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με αυξητικούς παράγοντες και τους υποδοχείς τους, λιποπρωτεΐνες καθώς και ιούς (Baghy et al, 2016).

Παρακάτω, στον Πίνακα 4 παρατίθεται μία ταξινόμηση των πρωτεογλυκανών βάσει εντόπισης σε σχέση με το κύτταρο, καθώς και ταυτότητας των GAG αλυσίδων.

Πίνακας 4: Ταξινόμηση πρωτεογλυκανών

(Baghy et al, 2016, Gomez-Herrera et al, 2018, Iozzo et al, 2015)

Localization	Class	Eponym	Gene symbol	GAG
Intracellular	secretory granules	Serglycin	SRGN	Hep
Cell surface	transmembrane	Syndecans 1, 3	SDC1, 3	HS/CS
		Syndecans 2, 4	SDC2, 4	HS
		Betaglycan	TGFBRIII	HS/CS
		NG2		CS
		Phosphacan		CS
		CD44(part-time hybrid PG)		HS/CS
	GPI-anchored	Glypicans 1-6	GPC1-6	HS/CS
Extracellular	SLRPs:	Decorin	DCN	DS/CS
	(Class I)	Biglycan	BGN	CS
		Asporin	ASPN	
		ECM2	ECM2	
		ECMX	ECMX	
	(Class II)	Fibromodulin	FMOD	KS
		Lumican	LUM	KS
		Keratocan	KERA	KS
		PRELP	PRELP	
		Osteoadherin	OMD	KS
	(Class III)	Epiphycan	EPYC	CS/DS

		Osteoglycin	OGN	
		Opticin	OPTC	
	(Class IV)	Chondroadherin	CHAD	
		Nyctalopin	NYX	
		Tsukushi	TSKU	
	(Class V)	Podocan	PODN	
		Podocan-like 1	PODNL1	
	SPOCK	Testicans 1-3	SPOCK	HS
	Hyalectans	Versican	VCAN	CS
		Neurocan	NCAN	CS
		Brevican	BCAN	CS
		Aggrecan	ACAN	CS/KS
Pericellular	BM zone	Agrin	AGRN	HS
		Collagen XVIII	COL18A1	HS
		Collagen XV	COL15A1	HS/CS
		Perlecan	HSPG2	HS

SLRPs: Small leucine-rich proteoglycans (μικρές πρωτεογλυκάνες πλούσιες σε λευκίνη);

BM: Basement membrane (βασική μεμβράνη).

Παρατηρείται ότι οι CS και οι DS πρωτεογλυκάνες βρίσκονται πιο συχνά στο συνδετικό ιστό οστών, αρθρώσεων και τενόντων, ενώ οι περισσότερες HS πρωτεογλυκάνες εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια (Baghy et al, 2016).

Οι πρωτεογλυκάνες και οι γλυκοζαμινογλυκάνες του ECM διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο κατά τη μορφογένεση, την ιστική επούλωση, τη φλεγμονή (Theocharis, Karamanos et al, 2017), καθώς και την αγγειογένεση και την αυτοφαγία (Schaefer et al, 2017), ρυθμίζοντας τελικά την ογκογένεση (Theocharis, Karamanos et al, 2017). Όσον αφορά την αυτοφαγία και τη μιτοφαγία, πρόκειται για δύο αρκετά σημαντικές ιδιότητες των κυττάρων, απαραίτητες για την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και ενέργειας, τη σωστή λειτουργία των κυττάρων και εν τέλει την ομοιόσταση. Σημαντικά μονοπάτια για τη συντέλεσή τους αποτελούν η αλληλεπίδραση των κυττάρων με υποδοχείς τυροσινικών κινασών, όπως ο υποδοχέας VEGFR2 και ο Met (Buraschi et al, 2017).

Οι πρωτεογλυκάνες έχουν τη δυνατότητα να επηρεάζουν διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, να διασταυρώνονται με άλλα μόρια του ECM, κυτταρικούς υποδοχείς ή ένζυμα, ενισχύοντας ή εμποδίζοντας τη δράση αυξητικών παραγόντων, να μεταφέρουν πληροφορίες προς τα εντός ή προς τα εκτός του κυττάρου και να ελέγχουν σημαντικές λειτουργίες (Baghy et al, 2016, Szatmari et al, 2013, Theocharis, Karamanos et al, 2017). Γνωρίζουμε πλέον ότι η έκφραση και η δομική ποικιλομορφία τους έχει τη δυνατότητα να διαμορφώσει χαρακτηριστικά τον καρκινικό εξωκυττάριο χώρο (Theocharis, Karamanos et al, 2017).

1.3.1 Η συμμετοχή των πρωτεογλυκανών/γλυκοζαμινογλυκανών στην καρκινογένεση/ινοσάρκωμα.

Με ενδιαφέρον έχει παρατηρηθεί ότι κάθε όγκος έχει χαρακτηριστικό προφίλ πρωτεογλυκανών, το οποίο σχετίζεται με συγκεκριμένη βιολογική συμπεριφορά και ιδιαίτερα, την ιστική οργάνωση, τις αλληλεπιδράσεις κυττάρων μεταξύ τους, αλλά και του κυττάρου με τον εξωκυττάριο χώρο, καθώς και την κυτταρική σηματοδότηση που επηρεάζει το φαινότυπο των κυττάρων, την ευαισθησία στα χημειοθεραπευτικά

φάρμακα και την αγγειογένεση (Szatmari et al, 2013, Theocharis, Karamanos et al, 2017). Συγκεκριμένα, μαζί με τις ιντεγκρίνες, οι πρωτεογλυκάνες είναι σε άμεση επαφή με τον ECM και αντιλαμβάνονται τις περιβαλλοντικές αλλαγές (φυσικές και χημικές) εκτός του κυττάρου. Στη συνέχεια, είτε άμεσα μέσω εστιακών περιοχών προσκόλλησης, ή έμμεσα μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών των αυξητικών παραγόντων, ενσωματώνουν τις νέες πληροφορίες στο βασικό δίκτυο δεδομένων του κυττάρου (Kim et al, 2011, Lu et al, 2012, Szatmari et al, 2013).

Μία σημαντική ομάδα πρωτεογλυκανών για τον καρκίνο είναι οι CSPGs. Οι πρωτεϊνικοί κορμοί τους εκκρίνονται απευθείας στον ECM. Μπορούν να απαντούν σε μεγάλα μοριακά βάρη, όπως >1.000.000 μοριακό βάρος και να συνδέονται με πρωτεΐνες του ECM, ή με αυξητικούς παράγοντες, όπως την οικογένεια του TGF. Σ'αυτή την ομάδα πρωτεογλυκανών, όπως προαναφέρθηκε, ανήκουν η αγκρεκάνη, η βερσικάνη, η μπρεβικάνη και οι μικρές, πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες, όπως η ντεκορίνη και η διγλυκάνη (Kim et al, 2011). Η βερσικάνη έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τη συμπεριφορά του ινοσαρκώματος και ιδιαίτερα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αγγειογένεση, μέσω αλλαγών στην παραγωγή υαλουρονικού, ινών κολλαγόνου και τη σηματοδότηση των TGFβ και VEGF (Fanhchaksai et al, 2016). Αντιθέτως, η διγλυκάνη παρουσιάζεται μειωμένη σε λεμφαγγειακά κύτταρα λεμφαδενικής μετάστασης T-241/VEGF-C ινοσαρκώματος (Clasper et al, 2008). Η συγκεκριμένη πρωτεογλυκάνη εμπλέκεται επιπλέον στην αγγειογένεση πιθανώς μέσω της επίδρασής της σε σημαντικά μόρια, όπως την ενδοστατίνη, η οποία είναι γνωστή για τις αντι- αγγειογενετικές ιδιότητές της στα οστά (Myren et al, 2016).

Παράλληλα, η ντεκορίνη βρίσκεται μειωμένη στα κύτταρα του ανθρώπινου ινοσαρκώματος HT1080 που εκφράζουν την πρωτεΐνη N-ras. Μέσω της μειωμένης έκφρασης της ντεκορίνης καθώς και άλλων στόχων του μονοπατιού του TGFβ επιτυγχάνεται μείωση του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων (Benet et al, 2012). Όσον αφορά στην αγγειογένεση όμως, όγκοι ινοσαρκώματος που υπερεκφράζουν ντεκορίνη εμφανίζουν λιγότερα αγγεία επηρεάζοντας βέβαια την τελική πρόοδο του όγκου (Grant et al, 2002).

Επιπλέον, μία πρωτεογλυκάνη θειϊκής κερατάνης, η λουμικάνη, παρουσιάζει αντι-αγγειογενετική δράση στα κύτταρα του ινοσαρκώματος, μία ιδιότητα που

πιθανώς παρατηρείται μόνο σε καρκινικό μικροπεριβάλλον (Sharma et al, 2013). Η παρουσία της μεταλλοπρωτεϊνάσης μεμβρανικού τύπου -1 στα HT1080 κύτταρα του ανθρώπινου ινοσαρκώματος φαίνεται να επαναφέρει την αύξηση του όγκου, κάτι που καταστέλλεται κανονικά από τη λουμικάνη. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω της αποδόμησης της συγκεκριμένης πρωτεογλυκάνης (Li et al, 2004). Όσον αφορά τη διήθηση του όγκου, σε *in vitro* πειράματα κυττάρων ινοσαρκώματος ποντικού με υπερέκφραση λουμικάνης παρουσιάζεται μειωμένη, ενώ σε μελέτες *in vivo* παρατηρείται μείωση του μεγέθους του όγκου λόγω της αυξημένης απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων του όγκου (Williams et al, 2010).

Μεγάλο ενδιαφέρον έχει προκαλέσει η δράση του υαλουρονικού οξέος (HA) στο ινοσάρκωμα τα τελευταία έτη. Πρόκειται για μια γλυκοζαμινογλυκάνη υψηλού μοριακού βάρους (10^5 έως 10^7 Da), που συντίθεται από εναλλασσόμενες μονάδες N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης και β-D-γλυκουρονικού οξέος. Διαφέρει από τις άλλες γλυκοζαμινογλυκάνες, καθώς δεν περιλαμβάνει θειϊκές ομάδες, ούτε είναι ομοιοπολικά συνδεδένη με πρωτεϊνικό κορμό. Συντίθεται από τις συνθάσες του υαλουρονικού (HAS 1-3), με αποτέλεσμα τη δημιουργία μορίων διαφορετικού μοριακού βάρους. Η τελική διαμόρφωσή τους γίνεται από τις υαλουρονιδάσες (HYAL 1,2). Είναι γνωστό ότι η εναπόθεση του HA είναι μεγαλύτερη στους κακοήθεις όγκους, σε σχέση με τους καλοήθεις. Ένα παράδειγμα είναι και το κακόηθες προέχον δερματοινοσάρκωμα, όπου η έκφρασή του HA είναι αυξημένη σε σχέση με το δερματοίνωμα. Η υπερέκφραση της HAS 2 έχει φανεί ότι ενισχύει την αύξηση του όγκου, καθώς και την κακοήθη συμπεριφορά των κυττάρων και μαζί με τη HAS 1 και την HYAL2 προκαλούν αύξηση της μεταναστευτικής ικανότητας των HT1080. Όσον αφορά το RHAMM, έναν υποδοχέα του HA που εκφράζεται σε αφθονία σε πολλούς καρκίνους, παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του ινοσαρκώματος. Η σηματοδότηση του HA μέσω RHAMM είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση των κυττάρων που πυροδοτείται από τον TGFβ1. Επίσης, το HA επηρεάζει την κυτταρική προσκόλληση στο ινοσάρκωμα μέσω του RHAMM, επιδρώντας στη συνέχεια στην κινάση εστιακής προσκόλλησης (FAK), καθώς και τις κινάσες εξωκυττάριου σήματος (ERK1/2). Παράλληλα, η πρόσδεση του HA στον άλλο του υποδοχέα, το CD44 είναι πολύ σημαντική για τη μετάσταση των κυττάρων

του ινοσαρκώματος, ανάλογα όμως με το στάδιο εξέλιξης του όγκου (Nikitovic et al, 2013).

1.3.1.1 Ιδιαιτερότητες των πρωτεογλυκανών θειϊκής ηπαράνης στον καρκίνο.

Λόγω της ιδιαίτερης δομής τους, της επεξεργασίας που υφίστανται από ειδικά ένζυμα καθώς και της συνεργασίας τους με αυξητικούς παράγοντες και μορφογενετικές πρωτεΐνες, οι HSPGs αποδεικνύονται απαραίτητες για την οργανογένεση (Habuchi et al, 2004). Βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και μέσα στον ECM, κυρίως στη βασική μεμβράνη. Σ'αυτές ανήκουν η περλεκάνη, η αγκρίνη, το κολλαγόνο, οι συνδεκάνες, οι γλυπικάνες και το κολλαγόνο τύπου XI. Βρίσκονται σε στενή επαφή με πρωτεΐνες του ECM, όπως την ινονεκτίνη, τη λαμινίνη και το κολλαγόνο, ενισχύοντας έτσι τη μηχανική σταθερότητα του κυτταρικού περιβάλλοντος. Τη σύνδεση με τις πρωτεΐνες αυτές την επιτυγχάνουν είτε μέσω του πρωτεϊνικού τους κορμού, είτε μέσω των γραμμικών, αρνητικά φορτισμένων HS αλυσίδων τους. Η περλεκάνη, η αγκρίνη και τα κολλαγόνα εκκρίνονται ενεργά στον ECM, ενώ οι συνδεκάνες και οι γλυπικάνες διαμορφώνονται από τις πρωτεάσες και τις φωσφολιπάσες αντίστοιχα (Kim et al, 2011). Παράλληλα, είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν τη βιοδιαθεσιμότητα αυξητικών παραγόντων, προστατεύοντας τους από ένζυμα αποδόμησης και τους παρουσιάζουν όταν χρειαστεί στους υποδοχείς τους, ενισχύοντας έτσι τη σηματοδότησή τους. Η άμεση αλληλεπίδρασή τους με τους υποδοχείς αυξητικών παραγότων και ιντεγκρίνες επιφέρει άμεσες συνέπειες στην επικοινωνία κυττάρων-ECM και συνεπακόλουθα στις ιδιότητες του όγκου αλλά και του ενδοθηλίου (Theocharis, Karamanos et al, 2017).

Όσον αφορά συγκεκριμένους όγκους, οι HS GAGs ανευρίσκονται σε αυξημένη συγκέντρωση στα κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα και στο αδενοκαρκίνωμα, γεγονός που δεν συμβαίνει στα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα (Rangel et al, 2018).

Η περλεκάνη, ως παράδειγμα, βρίσκεται σε δομές τύπου βασικής μεμβράνης γύρω από χονδροκύτταρα και συνδέεται με πολλούς αυξητικούς παράγοντες, όπως τους FGFs και VEGFs. Επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τον πολλαπλασιασμό και τη

μετανάστευση των κυττάρων στον καρκίνο και παρουσιάζει ταυτόχρονα προ- και αντι- αγγειογενετικές ιδιότητες (Kim et al, 2011). Όσον αφορά το ινοσάρκωμα, έχει βρεθεί ότι η καταστολή έκφρασης της περλεκάνης σε επίπεδο mRNA επιτρέπει στα κύτταρα να μεταστεύσουν, να προσκολληθούν και τελικά να διηθήσουν τον εξωκυττάριο χώρο πιο επιτυχημένα (Mathiak et al, 1997). Όπως έχει προαναφερθεί, οι πρωτεογλυκάνες έχουν δράση ειδική του κυτταρικού τύπου, γεγονός που επιβεβαιώνεται στην περίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα, όπου η αυξημένη περλεκάνη συνδέεται με καλύτερη πρόγνωση (Rangel et al, 2018).

Εκτός από τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση, οι HSPGs εμπλέκονται σημαντικά στην προσκόλληση και τη διαφοροποίηση. Γενικότερα, έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν σήματα αμφίδρομα (επί τα εντός και επί τα εκτός του κυττάρου), καθώς και να συσσωρεύουν πρωτεΐνες μέσα σε εκκριτικά κυστίδια. Οι HS αλυσίδες μπορούν να επηρεάζουν την κινητικότητα και την κυτταρική προσκόλληση μέσω της ανασυγκρότησης των ινών της ακτίνης. Κύτταρα χωρίς HS αδυνατούν να δημιουργήσουν εστίες προσκόλλησης. Παράλληλα, οι HSPGs μπορούν να αποθηκεύσουν εξωκυττάρια αυξητικούς παράγοντες που συνδέονται με ηπαρίνες (η ηπαρίνη αποτελεί μια περισσότερο θειωμένη μορφή των HS). Το αποτέλεσμα είναι να μπορούν να ρυθμίσουν τη βιοδιαθεσιμότητά τους (Nikitovic et al, 2014).

Είναι γνωστό ότι η ηπαρίνη μπορεί να συνδεθεί με μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών, από αυξητικούς παράγοντες {τους FGFs, όπως προαναφέρθηκε, τους VEGFs, τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF), τον νευροτροπικό παράγοντα των γλοιακών κυττάρων (GDNF) και τον αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF)}, έως κυτοκίνες (ιντερλευκίνες, ιντερφερόνη, PF4 και RANTES), μεταβολικά ένζυμα (λιποπρωτεϊνική λιπάση), δομικές πρωτεΐνες {λαμινίνη και ινονεκτίνη (FN)} και υποδοχείς ενδοκυττάρωσης.

Οι ξεχωριστές ιδιότητες των HS αλυσίδων οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στη τελική τους μορφολογία. Συνήθως αποτελούνται από 50-200 επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες, οι οποίες περιλαμβάνουν ξυλόζη, γαλακτόζη και D-γλυκουρονικό οξύ σε κατάλοιπο σερίνης του πρωτεϊνικού κορμού. Το επόμενο σάκχαρο που προστίθεται είναι η N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη. Στη συνέχεια, τα ένζυμα

EXT1 και EXT2 πολυμερίζουν την αλυσίδα με την εναλασσόμενη προσθήκη D-γλυκουρονικού και N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης. Η ποικιλομορφία των HS δημιουργείται από τις τροποιήσεις των θειο-τρανσφερασών. Οι περιοχές σύνδεσης με τις HS στις πρωτεΐνες, όπως στον FGFR υποδοχέα και στον FGF-1, χαρακτηρίζονται από την ανεύρεση βασικών καταλοίπων, όπως η αργινίνη και η λυσίνη πολύ κοντά σε αλληλουχία. Τα θειϊκά κατάλοιπα και η ομάδα καρβοξυλικού οξέως σχετίζονται κυρίως με την ιοντική αλληλεπίδραση των HS και των πρωτεϊνών, αλλά επίσης, σημαντικό ρόλο σ'αυτή τη σύνδεση παίζουν οι υδρογονικοί δεσμοί και οι δεσμοί van der Waals. Πέραν των συγκεκριμένων αλληλουχιών και των δεσμών όμως, η τελική τρισδιάστατη διαμόρφωση των HS διαδραματίζει εξίσου σημαντικό ρόλο (Kim et al, 2011). Γνωστά ένζυμα που ρυθμίζουν την στερεοτακτική δομή των HS είναι η 3-O-θειοτρανσφεράση, η 6-O-θειο-τρανσφεράση, καταβολικά ένζυμα, όπως οι HSulf-1,2 και η ηπαρινάση. Οι τελικές εξειδικευμένες μορφές των αλυσίδων βοηθούν τα καρνικικά κύτταρα να διασπάσουν τον ECM, να αλλάξουν σηματοδοτικά μονοπάτια, οδηγώντας σε αυξημένο πολλαπλασιασμό και να ενισχύσουν την αγγειογένεση και την επιβίωσή τους μέσω της προστασίας τους από τα κύτταρα-φυσικούς φονείς (Raman et al, 2010). Παράλληλα, η αποκοπή των συνδεκανών από την ηπαρινάση οδηγεί στην απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων στον ECM, με αποτέλεσμα να επηρεάζει τη μετανάστευση και διήθηση των καρκινικών κυττάρων (Karamanos et al, 2017).

Μεταξύ των HSPGs της κυτταρικής μεμβράνης, θα γίνει λόγος στη συνέχεια για τις γλυπικάνες και περισσότερο τις συνδεκάνες, καθώς στη συγκεκριμένη διατριβή μελετήθηκε ιδιαίτερα η συνδεκάνη 2 (SDC2) στο ινοσάρκωμα.

Οι γλυπικάνες αγκυροβολούν στην κυτταρική μεμβράνη μέσω ένος GPI συνδέσμου και γι'αυτό περιορίζονται στην οργάνωση εξωκυττάριων μορίων-συνδετών (Nikitovic et al, 2014). Εμπλέκονται ιδιαίτερα στη κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση (Matsuda et al, 2001).

Η GPC1 εμφανίζεται με αυξημένη έκφραση στον καρκίνο του μαστού και με χαμηλή έκφραση στο φυσιολογικό μαστικό ιστό. Συνεχίζοντας για τον καρκίνο του μαστού, η GPC3 και 4 ακολουθούν με μικρή αύξηση έκφρασης μόνο. Η GPC1 φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη μιτογόνο δράση αυξητικών παραγόντων που

προσδένουν ηπαρίνη, όπως μεταξύ άλλων, του HGF, FGF-2 και του αυξητικού παράγοντα heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) (Matsuda et al, 2001).

Η GPC3 έχει παρουσιάσει σημαντική δράση στην καρκινογένεση του ήπατος. Η έκφρασή της είναι αυξημένη σε εμβρυϊκούς καρκίνους, στο μελάνωμα και στο ηπάτωμα, ενώ είναι μειωμένη στο μεσοθηλίωμα και στον καρκίνο της ωοθήκης. Οι δράσεις της στον καρκίνο μεσολαβούνται από τη ρύθμιση των μονοπατιών Hedgehog, Wnt και ERK1/2 (Baghy et al, 2016).

Αντιθέτως, οι συνδεκάνες περιλαμβάνουν μια εξωτερική, μια διαμεμβρανική και μια μικρή κυτταροπλασματική περιοχή (με υποπεριοχές C1-εγγύς στη μεμβράνη, C2-άπω, καθώς και τη μεταβλητή V υποπεριοχή ανάμεσα στις C1 και C2). Αυτό το μοναδικό χαρακτηριστικό τους επιτρέπει να σχηματίζουν ομοδιμερή ως απάντηση της πρόσδεσης εξωκυττάριων συνδετών. Η κυτταροπλασματική περιοχή των συνδεκανών (C1, C2) συνδέεται με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ERM (ezrin/radixin/moesin), καθώς και με τη συντενίνη, μια πρωτεΐνη που ενισχύει την ένωση των συνδεκανών με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Παράλληλα, υπάρχουν στοιχεία ότι και η περιοχή V ρυθμίζει τη στερεοδομή της ακτίνης. Η αναδιοργάνωση αυτή του κυτταροσκελετού, είναι γνωστό ότι οδηγεί στη δημιουργία μικροπροσεκβολών στα κύτταρα.

Οι SDC χωρίζονται σε 2 υπο-ομάδες βάσει αλληλουχίας (SDC 1, 3 και SDC 2, 4). Έχει βρεθεί ότι κάθε μέλος ξεχωριστά επιτελεί διαφορετικές λειτουργίες κατά την καρκινογένεση (Kim et al, 2011, Nikitovic et al, 2014) και γενικά, καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την επιθηλιακή/μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), κυρίως μέσω της πρόσδεσης με αυξητικούς παράγοντες και της επίδρασής τους στα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια που ακολουθούν (Szatmari et al, 2013). Παράλληλα, μια σχετικά πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι SDC είναι υπεύθυνες και για την ενεργοποίηση παροδικών καναλιών δυναμικού των υποδοχέων, με αποτέλεσμα να ρυθμίζουν την ισορροπία του ενδοκυττάριου ασβεστίου και κατά συνέπεια την κυτταρική συμπεριφορά (Gopal et al, 2015).

Γενικά, είναι γνωστό ότι οι HSPGs υφίστανται τροποποιήσεις μεταξύ άλλων από μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) και τις μεταλλοπρωτεάσες ADAM10 και ADAM17. Η επίδραση αυτών των ενζύμων στις HSPGs τους προσδίδει διαφορετικές

ιδιότητες (Szatmári et al, 2013). Όμως έχει παρατηρηθεί επιπλέον ότι οι ίδιες μπορούν να ρυθμίσουν τις μεταλλοπρωτεϊνάσες, προσδένοντάς τις στην κυτταρική μεμβράνη μέσω των GAG αλυσίδων τους (Szatmári et al, 2013).

Ένα παράδειγμα αποτελεί η SDC1, της οποίας η τροποποίηση από ένζυμα ADAMs, επιτυγχάνει πιο επιθετικό φαινότυπο στην περίπτωση υποτροπιάζοντος όγκου (Szatmári et al, 2013).

Η SDC1 γενικότερα φαίνεται να εμπλέκεται στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και τη συνεπακόλουθη αύξηση του όγκου, στην αυξημένη κινητικότητα και μεταστατική ικανότητα των κυττάρων, αλλά και την κατάλληλη στοίχιση των ινών του ECM (Theocharis, Karamanos et al, 2017). Παρατηρείται συχνότερα σε επιθηλιακά φυσιολογικά κύτταρα και η παρεμπόδιση της έκφρασής της σε κυταροκαλλιέργειες οδηγεί σε μετάβαση του επιθηλιακού χαρακτήρα των κυττάρων προς έναν μεσεγχυματικό φαινότυπο (EMT). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αλλαγών στην πολικότητα, τη διακυτταρική προσκόλληση και την έκφραση συγκεκριμένων επιθηλιακών γονιδίων (Endo et al, 2003). Είναι ενδιαφέρον ότι καταφέρνει να διεισδύσει στον πυρήνα καρκινικών κυττάρων, όπως του πολλαπλού μυελώματος και η παρουσία της εκεί ρυθμίζεται από την ποσότητα της ηπαρινάσης. Υψηλά επίπεδα ηπαρινάσης οδηγούν σε χαμηλά επίπεδα SDC1 στον πυρήνα και κατά συνέπεια αυξημένη ακετυλ-τρανσφεράση των ιστονών (HAT), η οποία οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή των VEGF και MMP-9, παράγοντες που σχετίζονται με πιο επιθετικό φαινότυπο (Purushothaman et al, 2011). Με αυτόν τον τρόπο έχει φανεί ότι η SDC1 επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Purushothaman et al, 2011).

Η SDC1 εντοπίζεται κυρίως στις επιθηλιακού τύπου κακοήθειες, ενώ στα σαρκώματα είναι σπάνια (Szatmari et al, 2013). Η έκφρασή της έχει βρεθεί αυξημένη στο αδενοσάρκωμα (Szatmari et al, 2013), στον παγκρεατικό καρκίνο (Conejo et al, 2000) και στον καρκίνο του μαστού (Szatmari et al, 2015) και χρησιμοποιείται ως διαγνωστικός δείκτης στο πολλαπλούν μυέλωμα (Szatmari et al, 2015), όπου η παρουσία της σχετίζεται με την καλή διαφοροποίηση του όγκου και την ικανότητα των κυττάρων του μυελώματος να προσδένονται στο κολλαγόνο τύπου I, χρησιμοποιώντας τις αλυσίδες θειϊκής ηπαράνης (Ridley et al, 1993), ενώ ανευρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα σε διάφορους τύπους κακοήθειας, όπως στον

καρκίνο του πνεύμονα (Anttonen et al, 2001), του νεφρού (Gokden et al, 2006) και στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου (Anttonen et al, 1999), σχετιζόμενο με πτωχή πρόγνωση. Ουσιαστικά, από τα παραπάνω, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο ρόλος της εξαρτάται εξολοκλήρου από τον συγκεκριμένο τύπο κακοήθεας.

Στην περίπτωση του μεσοθηλιώματος, η υπερέκφραση της SDC1 καταστέλλει την έκφραση του PDGF και του FGF, ενισχύοντας ταυτόχρονα την έκφραση των υποδοχέων τους, ενώ, επιτείνει την έκφραση του EGF και του υποδοχέα του. Μετέπειτα, εμποδίζει τα μονοπάτια ERK/MAPK, JNK και p38/MAPK, καθώς και τους μεταγραφικούς παράγοντες MYC, FOS, JNK και JUN (Szatmari et al, 2012). Ταυτοχρόνως ενισχύει την έκφραση του ETS-1 (Szatmari et al, 2012), ενός πρωτο-ογκογονιδίου και μεταγραφικού παράγοντα που συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση του ECM, ενώ αντίθετη σχέση παρατηρείται στον καρκίνο του κόλου (Pap et al, 2009), αναδεικνύοντας για ακόμα μια φορά την εξειδικευμένη της δράση βάσει κυτταρικού τύπου.

Η έκφραση της SDC1 σε μεσεγχυματικούς όγκους οδηγεί στη απόκτηση επιθηλιοειδούς μορφολογίας από τα κύτταρα, ενώ η μειωμένη έκφρασή της τους προσδίδει, όπως και στα φυσιολογικά κύτταρα, ατρακτοειδή φαινότυπο (Szatmári et al, 2013). Πιο συγκεκριμένα, η SDC1 επηρεάζει την προσκόλληση, τη διείσδυση, τη μετάσταση και την αγγειογένεση σε κύτταρα που εκφράζουν τις ιντεγκρίνες ανβ3 και ανβ5, ρυθμίζοντας τη σηματοδότησή τους (Nikitovic et al, 2014).

Στην περίπτωση του αμελοβλαστώματος, η SDC1 σχετίζεται αντίστροφα με την αύξηση του όγκου και τη διηθητική ικανότητα του όγκου (Gomez-Herrera et al, 2018), καθώς παρατηρούνται αλλαγές στην πρωτεΐνη Wnt1 (Leocata et al, 2007), που είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιθετικότητα του όγκου (Gomez-Herrera et al, 2018).

Η SDC2, που όπως προαναφέρθηκε απαντάται περισσότερο σε μεσεγχυματικά κύτταρα, ανευρίσκεται και σε κάποια παρεγχυματικά, καθώς και νευρίτες (Oh et al, 2004), ενώ η παρουσία της σε επιθηλιακούς όγκους σχετίζεται με επιθετικότερη συμπεριφορά (Han et al, 2004, Ryu et al, 2009). Η δομή της καθορίζει τις λειτουργικές της ιδιότητες στο φυσιολογικό οργανισμό αλλά και στον καρκίνο. Συγκεκριμένα, ο πρωτεϊνικός της κορμός αποτελείται από μία εξωτερική περιοχή με

ένα αμινοτελικό σηματοδοτικό πεπτίδιο, αλληλουχίες για τις HS αλυσίδες και μία διβασική αλληλουχία κοντά στην κυτταρική μεμβράνη, που υφίσταται εύκολα αποκοπή από πρωτεάσες. Επιπλέον, ο πρωτεϊνικός της κορμός καταλαμβάνεται από μία μονήρη διαμεμβρανική περιοχή, καθώς και μία μικρή καρβοξυτελική κυτταροπλασματική περιοχή, με δύο καλά συντηρημένες πάγιες δομές (C1 και C2) σε κάθε τύπο συνδεκανών, χωρισμένες από μία παραλασσόμενη περιοχή (V) (Carey et al, 1997, Mansouri et al, 2015). Όπως προαναφέρθηκε γενικότερα στις συνδεκάνες, έτσι και στη SDC2 η καλά συντηρημένη C1 περιοχή μπορεί να αλληλεπιδρά με τις ERM πρωτεΐνες, όπως την ezrin που θα αναλυθεί στη συνέχεια. Η V περιοχή είναι ειδική στην περίπτωση της SDC2, ενώ η C2 περιοχή μπορεί να προσδένει τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που περιέχουν το μοτίβο PDZ (Carey et al, 1997, Mansouri et al, 2015, Szatmari et al, 2013).

Τα μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά της ευθύνονται για τις ιδιαίτερες λειτουργίες της. Παρατηρούνται HS αλλά και CS αλυσίδες πάνω στον πρωτεϊνικό της κορμό και συγκεκριμένα πάνω σε μοτίβα σερίνης-γλυκίνης (Afratis et al, 2012). Όπως προαναφέρθηκε, η δομή των HS αλυσίδων περιπλέκεται ακόμα περισσότερο μετά τη δράση των ειδικών ενζύμων (σουλφατάσες, επιμεράσεις και γλυκοτρανσφεράσες) (Skidmore et al, 2008) και έτσι η SDC2 εμφανίζεται να προσδένει πλειάδα αυξητικών παραγόντων, ενζύμων, μεμβρανικών υποδοχέων και άλλων μορίων του ECM (Essner et al, 2006). Είναι πολύ ενδιαφέρουσα η παρατήρηση ότι η καταστολή ενδοσουλφατασών και συγκεκριμένα της HSulf-1 στον καρκίνο των ωωθηκών, του μαστού, του παγκρέατος, του νεφρού, αλλά και του ήπατος ενισχύει την πρόσδεση συνδετών στις HS και κατά συνέπεια την ενδοκυττάρια σηματοδότησή τους (Lai et al, 2003). Αποδεικνύεται ότι η δράση της βασίζεται τουλάχιστον εν μέρει στη ρύθμιση υποδοχέων τυροσινικής κινάσης και στην αλλαγή των ενδοκυττάριων μονοπατιών, με αποτέλεσμα να επηρεάζει την ευαισθησία του όγκου στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Lai et al, 2003).

Αλλαγές στη διαμεμβρανική περιοχή της SDC2, όπως ο διμερισμός και ο ολιγομερισμός μπορεί να επιφέρει στρατηγικές ανακατατάξεις στις ισορροπίες της με περιβάλλοντες παράγοντες (Hu et al, 2016). Πρόκειται για μία περιοχή απαραίτητη για τη διάδραση του κυττάρου με τον ECM και ειδικότερα για την κυτταρική

προσκόλληση και εξάπλωση πάνω στην ινονεκτίνη στον καρκίνο του κόλου (Kwon et al, 2013). Για τον επιτυχή ολιγομερισμό φαίνεται να χρειάζεται ένα ειδικό κατάλοιπο φαινυλαλανίνης Phe (167) (Kwon et al, 2015), αλλά και το διατηρημένο κατάλοιπο Phe (169) που μεσολαβεί για το σχηματισμό ετεροδιμερών με τη SDC4 (Kwon et al, 2016) για την κυτταρική μετανάστευση και τη δημιουργία εστιών προσκόλλησης (Kwon et al, 2015, Kwon et al, 2016). Ο σχηματισμός ετεροδιμερών με τη SDC4 έχει αναδειχθεί σημαντικός ιδιαίτερα στον καρκίνο του κόλου, επηρεάζοντας την κυτταρική μετανάστευση και την αύξηση του όγκου (Choi et al, 2015).

Συνολικά, εμπλέκεται ιδιαίτερα στην αυξημένη προσκόλληση και κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων, τη διηθητική τους ικανότητα, τη μετάβαση από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό χαρακτήρα (EMT) (Theocharis, Karamanos et al, 2017), καθώς και την αγγειογένεση (Noguer et al, 2009). Επίσης είναι γνωστό ότι οργανώνει τον κυτταροσκελετό και δημιουργεί μικροπροσεκβολές στο κύτταρο μέσω σύνδεσης με την πρωτεΐνη ezrin. Αυτή η διαδικασία καταλύεται από το ένζυμο RhoA GTPase (Nikitovic et al, 2014).

Η SDC2 δεν συνδέεται με τις ιντεγκρίνες, αλλά μπορεί να ρυθμίσει την ενεργοποίησή τους. Αυτό αποδεικνύεται στην περίπτωση των ινοβλαστών, όπου υποβοηθά την προσκόλληση μέσω της β1 ιντεγκρίνης, αφού συνδεθεί με τον υποδοχέα τυροσινικής κινάσης CD148. Μέσω της σύνδεσης αυτής, παρουσιάζει αντι-αγγειογενετική δράση όταν υφίσταται τροποποίηση (shedding). Επίσης, έχει βρεθεί ότι ενισχύει την προσκόλληση στην ινονεκτίνη σε μελέτες με ινοβλάστες, μέσω του σηματοδοτικού μορίου ROCK (Soares et al, 2015).

Παρατηρείται αυξημένη έκφραση σε διάφορους όγκους, όπως τον καρκίνο πνεύμονα, ωοθηκών, κόλου, προστάτη, οισοφάγου, στο μελάνωμα, σε όγκους του εγκεφάλου, οστεοσάρκωμα και μεσοθηλίωμα (Theocharis, Karamanos et al, 2017). Όμως έχει παρατηρηθεί ότι τα μονοπάτια που επηρεάζει είναι ειδικά για τον τύπο κακοήθειας και το βαθμό διαφοροποίησης (Garcia-Suarez et al, 2014, Soares et al, 2015).

Στην περίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα φαίνεται να αλλάζει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω του συμπλέγματός της με την ιντεγκρίνη α5β1

(Munesue et al, 2002) και σε υπερέκφραση εμποδίζει τη μετάσταση μέσω καταστολής του ενζύμου MMP-2 (Munesue et al, 2007). Η διαμόρφωση του κυτταροσκελετού και η συνεργασία της με την ακτίνη φαίνεται να διαμεσολαβείται από την αλληλεπίδραση των HS αλυσίδων με την ινονεκτίνη (Kusano et al, 2000). Αντίστοιχα, στους νευροενδοκρινείς όγκους, αυξημένη έκφρασή της αναλογεί σε πιο καλά διαφοροποιημένους όγκους με καλύτερα ποσοστά επιβίωσης (Garcia-Suarez et al, 2014).

Αντιθέτως, στο μελάνωμα και στο ινοσάρκωμα η SDC2 σχετίζεται με αυξημένη κυτταρική μετανάστευση (Kwon et al, 2014, Lee et al, 2009, Park et al, 2005). Σε ιστοπαθολογικά δείγματα σπίλων, αλλά και μελανώματος η SDC2 βρίσκεται αυξημένη και η παρουσία της σχετίζεται με ενισχυμένη κινητικότητα των κυττάρων (Lee et al, 2009). Παράλληλα, έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει τη μετανάστευση των κυττάρων του μελανώματος που μεσολαβείται από το tacrolimus, έναν αναστολέα καλσινευρίνης (FK506), μέσω ενεργοποίησης του FAK (Jung et al, 2016). Το tacrolimus είναι γνωστό ότι προωθεί τη μετανάστευση των μελανοκυττάρων και τελικά την μελανογένεση, ενώ παράλληλα αυξάνει τη SDC2 μέσω της σηματοδότησης του JNK (Jung et al, 2016).

Στον καρκίνο του κόλου έχει βρεθεί ότι η SDC2 προωθεί την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου καθώς και τη διασπορά των κυττάρων (Park et al, 2002). Παράλληλα, η έκφρασή της στα καρκινικά κύτταρα του κόλου, τα οποία είναι επιθηλιακά, τους προσδίδει συνολικά πιο μεσεγχυματικό φαινότυπο (Contreras et al, 2001). Η έκφραση της SDC2 είναι αυξημένη όταν ενισχύεται ο ECM των ινοβλαστών με ινονεκτίνη, ενώ μέσω της συνεργασίας της με την α2β1 ιντεγκρίνη (Choi, et al, 2009) και την προώθηση του μονοπατιού Tiam1/Rac ενισχύει την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση του συγκεκριμένου όγκου (Choi, et al, 2010). Η μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του κόλου επηρεάζεται παράλληλα από την αλληλεπίδραση του κυτταροπλασματικού τμήματος της SDC2 με τη συντενίνη-1 (Grootjans et al, 1997, Lee, et al, 2011) με άμεση επίδραση στην ενεργοποίηση του Rac (Lee, et al, 2011). Η σύνδεσή της με την PKCγ οδηγεί στην ενεργοποίηση των FAK και ERK (Jang et al, 2017), ενισχύοντας την έκφραση της MMP-7 (Jang et al, 2017, Ryu et al, 2009), η οποία στη συνέχεια εμπλέκεται στην

αποκοπή της E-cadherin και την EMT μετάβαση (Jang et al, 2016). Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί με ενδιαφέρον ότι η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), μία πλειοτροπική φλεγμονώδης κυτοκίνη, έχει την ικανότητα να ενισχύει την έκφραση της MMP-7, μέσω ενεργοποίησης του MAPK με αποτέλεσμα να δημιουργούνται αποκομμένες SDC2 (Kwon et al, 2014). Εν συνεχεία, είναι γνωστό ότι η αποκομμένη SDC2 προωθεί τον καρκίνο *in vitro* και *in vivo* (Choi et al, 2015). Η SDC2 όμως παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον και στην παθοφυσιολογία της φλεγμονής. Συγκεκριμένα η έκφρασή της αυξάνεται μέσω της φλεγμονώδους υποξίας στα επιθήλια του κόλου και τελικά εμπλέκεται στην καρκινογένεση μέσω της χρόνιας φλεγμονής (Choi et al, 2017). Λαμβάνοντας όλα τα παραπάνω υπόψιν, η παρατήρηση ότι η μεθυλιωμένη μορφή της SDC2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ευαίσθητος δείκτης για την ανίχνευση του καρκίνου του κόλου ακούγεται ίσως λογική (Niu et al, 2017).

Δείκτης εξέλιξης του όγκου είναι όμως και για τον καρκίνο του μαστού (Lim et al, 2015). Η SDC2 βρίσκεται αυξημένη στο συγκεκριμένο όγκο και έχει την ικανότητα να επηρεάζει τον κυτταροσκελετό, την κυτταρική προσκόλληση και διήθηση τουλάχιστον εν μέρει μέσω των Rho GTPασών (Lim et al, 2014, Lim et al, 2015). Εκτός αυτού, η συγκεκριμένη πρωτεογλυκάνη ρυθμίζεται από τους υποδοχείς των EGFR/IGFR και των οιστρογόνων, επηρεάζοντας τελικά τη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων (Kousidou et al, 2008, Tsonis et al, 2013). Μέσω της αλληλεπίδρασής της με την caveolin-2, μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που μπορεί να ρυθμίσει γενικά τις διαδικασίες ενδοκυττάρωσης και την ενδοκυττάρια σηματοδότηση, έχει τη δυνατότητα να καθορίζει την κυτταρική προσκόλληση και διήθηση και κατά συνέπεια, την επιθετικότητα του όγκου (Lim et al, 2015). Η SDC2 φαίνεται επίσης να υφίσταται μείωση από την ανασταλτική κινάση RKIP/PEBP1, μέσω καταστολής της πρωτεΐνης HMGA2 σε καρκινικά κύτταρα μαστού ανθρώπου, αλλά και ποντικού (Sun et al, 2014). Η μείωση της SDC2, κατά συνέπεια, οδηγεί σε αυξημένη κυτταρική απόπτωση και μείωση του μεγέθους του όγκου στα μοντέλα ποντικού (Sun et al, 2014).

Στον παγκρεατικό καρκίνο, σύμφωνα με συγκεκριμένες μελέτες, η SDC2 προωθεί την κυτταρική μετανάστευση και διήθηση μέσω της συνεργασίας του με το K-ras. Αντιθέτως, η καταστολή της εμποδίζει τη σηματοδότηση των K-ras/Src/ERK,

αλλάζοντας κατά συνέπεια τις ιδιότητες των συγκεκριμένων κυττάρων (De Oliveira et al, 2012). Σε διαφορετικές μελέτες, όμως, η κυτταρική έκφραση της SDC2 συσχετίζεται με καλύτερη επιβίωση των ασθενών (Hrabar et al, 2010).

Στην περίπτωση του πυλαίου χολαγγειοκαρκινώματος, η αυξημένη έκφραση της SDC2 που μεσολαβείται από το ένζυμο PKM2, οδηγεί σε ενισχυμένη περινευρική διήθηση και δεινότερη πρόγνωση (Yu et al, 2015). Παρομοίως, στο πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου βρίσκεται αυξημένη στο στρώμα και ειδικότερα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα περικύτταρα των περιοχών με νεοαγγειογένεση, με αποτέλεσμα να συνδέεται με αυξημένη λεμφοζιδιακή μετάσταση και συνολικά χειρότερη πρόγνωση των ασθενών (Farnedi et al, 2015).

Στην περίπτωση του γλοιώματος, η ενδαγγειακή έκφραση της SDC2 προωθεί την αγγειογένεση (Fears et al, 2006), ενώ σε πειραματικά μοντέλα φαίνεται η αποκομμένη SDC2 να εμποδίζει την αύξηση του όγκου μέσω του υποδοχέα τυροσινικής φωσφατάσης CD148 (De Rossi et al, 2014).

Από την άλλη πλευρά, στην περίπτωση του οστεοσαρκώματος, η SDC2 οδηγεί σε κυτταρική απόπτωση (Dieudonne et al, 2010) μέσω της ενεργοποίησης του JNK και της υπερέκφρασης του Bax (Modrowski et al, 2005) και μειώνει την ικανότητα των κυττάρων για μετανάστευση/διήθηση, ενώ ενισχύει την αντι-αποπτωτική δράση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (δοξορουβικίνη, μεθοτρεξάτη και σισπλατίνη) (Orosco et al, 2007). Συγκεκριμένα η δοξορουβικίνη έχει την τάση να αυξάνει την έκφραση της SDC2 μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Foxo3a και τελικά να ενισχύει την απόπτωση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος (Dieudonne et al, 2012). Ένα ακόμα μονοπάτι που σχετίζεται με την προ-αποπτωτική δράση της SDC2 είναι η καταστολή των ERK1/2, PI3K/AKT και NFκ-B και η συνεπαγόμενη μείωση της καλπαΐνης-6 (calpain-6) (Marion et al, 2012).

Η διαδικασία της απόπτωσης είναι αρκετά περίπλοκη και φαίνεται από μελέτες ότι η SDC2 έχει πολύπλευρη συμμετοχή. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Wnt/RhoA μειώνει την έκφραση της SDC2 μέσω αποκοπής της εξωκυττάριας περιοχής της, ενώ το μονοπάτι Wnt/β-catenin/TCF εμποδίζει τα βασικά επίπεδα έκφρασης (Dieudonne et al, 2010). Παράλληλα όμως, η SDC2 μπορεί να ανταγωνιστεί το μονοπάτι του Wnt, επαναφέροντας έτσι την έκφρασή της στα

πρότερα επίπεδα μέσω ενεργοποίησης του p190RhoGAP και επακόλουθης καταστολής του RhoA (Dieudonne et al, 2010).

Όσον αφορά τη SDC3, εμπλέκεται στην αγγειογένεση μέσω του FGF-2 σε όγκους ωοθηκών (Whitworth et al, 2005) και προωθεί την κυτταρική μετάσταση στον καρκίνο του προστάτη μέσω της πλειοτροπίνης (Diamantopoulou et al, 2012).

Τέλος, η SDC4 ελέγχει το σχηματισμό εστιών προσκόλλησης και κατά συνέπεια την κυτταρική κινητικότητα (Nikitovic et al, 2014), τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων αλλά και την αύξηση του όγκου (Theocharis, Karamanos et al, 2017). Έχει παρατηρηθεί ότι σε μεταστατικά κύτταρα ανθρώπινου μελανώματος η προσθήκη FGF-2 μειώνει τα επίπεδα SDC4 και στη συνέχεια την έκφραση της FAK Y397, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της προσκόλλησης στην ινονεκτίνη και την ενίσχυση της κυτταρικής μετανάστευσης (Chalkiadaki et al, 2009). Παράλληλα, επηρεάζει τη σηματοδότηση μετά από κυτταρική σύσπαση ως μέλος των συμπλόκων SDC4/α5β1, ιντεγκρίνη/Thy-1 και ενισχύει τη σηματοδότηση του Wnt5α με τελικό αποτέλεσμα την αυξημένη διηθητικότητα των κυττάρων του μελανώματος.

Η έκφρασή της γενικά παρατηρείται αυξημένη στον καρκίνο του μαστού (Baba et al, 2006, Lendorf et al, 2011), στο οστεοσάρκωμα (Na et al, 2012), στον καρκίνο του κόλου (Gialeli et al, 2013), στο μελάνωμα (O'Connell et al, 2009) και σε όγκους βλαστικών κυττάρων των όρχεων (Labropoulou et al, 2013).

Στην περίπτωση του καρκίνου του κόλου, η ενεργοποίηση του συμπλέγματος EGF/EGFR μειώνει την έκφραση της SDC4 και τελικά αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μετανάστευση και διήθηση (Ellina et al, 2014).

Στον καρκίνο του μαστού μαζί με τη SDC1, η SDC4 εμπλέκεται στο σχηματισμό του σηματοδοτικού συμπλέγματος FGF-2/HSPG/FGFR-1 (Mundhenke et al, 2002) και επηρεάζει την κυτταρική προσκόλληση και κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων (Beauvais et al, 2003). Ανευρίσκεται ως συνυποδοχέας με τον IGF-IR στην κυτταρική επιφάνεια, ενώ η καταστολή του υποδοχέα αυτού οδηγεί σε ενδοκύτωση και μείωση της διαθέσιμης πρωτεογλυκάνης (Afratis et al, 2017).

Τέλος, στους όρχεις, χαμηλότερα επίπεδα SDC4 σχετίζονται με επιθετικότερο τύπο όγκου των βλαστικών κυττάρων, ενώ αυξημένη έκφραση σχετίζεται με ενισχυμένη αγγειογένεση και μεταστατική ικανότητα (Labropoulou et al, 2013).

Εφόσον το περιεχόμενο της συγκεκριμένης διατριβής αφορά το ρόλο των συνδεκανών στο ινοσάρκωμα και περισσότερο την αλληλεπίδραση της SDC2 με αυξητικούς παράγοντες με στόχο τη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών του όγκου, στη συνέχεια θα δοθεί περισσότερη έμφαση στους συγκεκριμένους παράγοντες.

1.3.1.2 Συνδεκάνες στο ινοσάρκωμα

Οι περισσότερες μελέτες έως τώρα έχουν εστιάσει στην εξερεύνηση των δράσεων της SDC1 και SDC2 στο ινοσάρκωμα. Η SDC1 παρουσιάζει ενδιαφέροντα αποτελέσματα ως προς την κινητικότητα των HT1080, καθώς έχει βρεθεί ότι η τροποποίησή της από τη μεμβρανική μεταλλοπρωτεϊνάση τύπου 1 οδηγεί σε ενίσχυση της κυτταρικής μετανάστευσης (Endo et al, 2003).. Οι Péterfia et al επαλήθευσαν τη δράση της SDC1 στο ινοσάρκωμα, καθώς έδειξαν ότι ολόκληρη η πρωτεογλυκάνη ρυθμίζει την ανάπτυξη των HT1080, ενώ η διαμεμβρανική και ενδοκυττάρια περιοχή μπορεί να συμμετέχει στη δημιουργία μεταστάσεων (Péterfia et al, 2006). Η υπερέκφραση της SDC1 φαίνεται παράλληλα ότι αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και τη χημειοταξία των HT1080, καθώς ενισχύει την έκφραση της SDC2. Στη συνέχεια αυτών των αποτελεσμάτων βέβαια, η ίδια ομάδα δείχνει το 2012 ότι η εξωκυττάρια μονάδα της SDC1 δεν είναι απαραίτητη για την ενίσχυση του όγκου στα HT1080 *in vitro*, ενώ *in vivo* το συγκεκριμένο τμήμα προκαλεί αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επίσης, είναι πολύ ενδιαφέρον ότι για τις προ-μεταναστευτικές και πολλαπλασιαστικές ιδιότητες της SDC1 είναι απαραίτητη η SDC2.

Προχωρώντας περαιτέρω, παρόμοια με το μεσοθηλίωμα, έχει αποδειχτεί επιπλέον ότι η SDC1 προκαλεί ενεργοποίηση του IGF-IR και επίσης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-1 στα κύτταρα HT1080, ο οποίος είναι σημαντικός για τη διείσδυση και τη μετάσταση. Φαίνεται ακόμη να ενεργοποιεί και την κινάση ERK1/2, αλλά οι δράσεις της στον πολλαπλασιασμό είναι ανεξάρτητες από αυτήν

(Péterfia et al, 2012). Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι σε επιθηλιοειδή κύτταρα του ινοσαρκώματος, η SDC1 είναι αυξημένη μαζί με τη SDC2 και η εντόπισή της είναι καίριας σημασίας. Στην περίπτωση που μένει συνδεδεμένη στη μεμβράνη, η SDC1 αναστέλλει τη μετανάστευση στο κολλαγόνο, ενώ, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η τροποποίηση από την MT1-MMP ενισχύει την κινητικότητα των κυττάρων (Szatmári et al, 2013).

Όσον αφορά τη SDC2, στην προηγούμενη παράγραφο καταγράφηκαν κάποιοι μηχανισμοί που ευθύνονται τουλάχιστον εν μέρει για τη συμπεριφορά της στον καρκίνο. Γενικά η συγκεκριμένη πρωτεογλυκάνη βρίσκεται σε αφθονία στα μεσεγχυματικά κύτταρα και σχετίζεται ιδιαίτερα με την κινητικότητα των κυττάρων και τη μετανάστευσή τους (Park et al, 2005).

Στο ινοσάρκωμα, η SDC2 ανευρίσκεται αυξημένη (Park et al, 2005) και αποδεικνύεται πολύ σημαντική για τον πολλαπλασιασμό και τη διήθηση/μετανάστευση των HT1080 (Péterfia et al, 2012) μέσω της ενεργοποίησης της FAK (Park et al, 2005), μία τυροσινική κινάση που μεσολαβεί για τη μετάδοση σημάτων και σχετίζεται με τη διηθητικότητα του όγκου (Kanteti et al, 2016, Owens et al, 1995). Συγκεκριμένα, υποστηρίζεται ότι η SDC2 επιτυγχάνει καλύτερη μετανάστευση μέσω του μονοπατιού FAK/PI3K/Tiam1/Rac, επηρεάζοντας στη συνέχεια την αναδιοργάνωση της ακτίνης, ανεξάρτητα όμως από την ιντεγκρίνη α2, α5 και β1 (Park et al, 2005). Βρέθηκε ότι η έκφρασή της ρυθμίζεται από τη SDC1, καθώς και ότι μπορεί να ενεργοποιεί την κινάση ERK1/2, μία κινάση που εμπλέκεται στην κυτταρική αύξηση, διαφοροποίηση, προσκόλληση, μετανάστευση, πολλαπλασιασμό, επιβίωση και απόπτωση (Chetram et al, 2012, Cristea et al, 2016, Johnson et al, 2014, Koistinaho et al, 2002) η οποία εμπλέκεται σε διάφορες σημαντικές κυτταρικές δράσεις (Péterfia et al, 2012). Όσον αφορά την αρχιτεκτονική γλυκοπρωτεϊνών του ECM, η SDC2 προσδένει την ινονεκτίνη, την αποθηκεύει και τη βοηθά στη διαμόρφωσή της στο ινοσάρκωμα, μία διαδικασία που ρυθμίζει την κυτταρική προσκόλληση (Galante et al, 2007).

Όσον αφορά τη SDC4, έχει βρεθεί ότι η έκφρασή της είναι μειωμένη στα σαρκωματοειδή κύτταρα του ινοσαρκώματος (Szatmári et al, 2013). Πέραν αυτών

των στοιχείων, μαζί με τη SDC3, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα ώστε να χαρτογραφηθούν οι δράσεις τους με λεπτομέρεια στο ινοσάρκωμα.

1.4 Αυξητικοί παράγοντες στον καρκίνο.

1.4.1 Δράση του TGFβ γενικά στον καρκίνο.

Ο αυξητικός παράγοντας του μετασχηματισμού β2 (TGFβ2) ανήκει στην υπερ-οικογένεια TGFβ και μέσω της εμπλοκής του σε κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια των κυττάρων, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις βασικές λειτουργίες τους, όπως την αύξηση, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση, την προσκόλληση, τη διείσδυση και τη διαμόρφωση του κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος. Οι ιδιότητες αυτές εξηγούν πώς ανωμαλίες στη σηματοδότησή του οδηγούν σε νόσηση, όπως στην καρκινογένεση. Περί τα 30 μέλη έχουν περιγραφεί στον άνθρωπο και η υπερ-οικογένεια χωρίζεται σε 2 ομάδες: την BMP/GDF και την TGFβ/activing/nodal. Κάποια μέλη εκφράζονται περιορισμένα και κάποια άλλα διάχυτα στους ιστούς (Massagué et al, 2000; Meulmeester et al, 2011). Υπάρχουν τρεις ισομορφές των θηλαστικών TGFβ (TGFβ1, 2 και 3), με τον TGFβ1 να είναι ο πιο άφθονος στους ιστούς. Ο ρόλος της σηματοδότησης του TGFβ είναι διττός στην ογκογένεση, καθώς κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου μπορεί να συμπεριφερθεί είτε ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας, είτε ως ισχυρός υποκινητής του όγκου (Inman et al, 2011).

Οι διάφοροι TGFβ καταφέρνουν μέσω των υποδοχέων τύπου I, II και III (TGFRI, TGFRII και TGFRIII ή βηταγλυκάνη) να ενεργοποιήσουν τους μεταγραφικούς παράγοντες Smad (Massagué et al, 1998). Η βηταγλυκάνη βοηθά τον TGFβ να συνδεθεί με τον TGFβRII. Η ισχυρή πρόσδεση του TGFβ με τον TGFβRII οδηγεί στη δημιουργία ετεροτετραμερούς με τον TGFβRI, με αποτέλεσμα ο TGFRII να φωσφορυλιώσει τον TGFβRI (Meulmeester et al, 2011). Είναι γνωστό μέχρι τώρα ότι ο TGFRIII λειτουργεί ως συν-υποδοχέας δεσμεύοντας άμεσα παράγοντες, όπως τους TGFβ 1, 2 και 3. Φαίνεται ότι συνήθως καταφέρνει έτσι να ενισχύσει την πρόσδεση των συγκεκριμένων μορίων στους TGFRI και TGFRII, με αποτέλεσμα την

εντονότερη σηματοδότησή τους μέσω των Smad πρωτεϊνών (Gatza et al, 2010). Η ικανότητα αυτή του TGFRIII να παρουσιάζει ένα συνδέτη είναι ιδιαίτερα σημαντική για ορισμένα μόρια της υπεροικογένειας, όπως τον TGFβ2 καθώς δεν μπορεί να προσδεθεί στον αντίστοιχο υποδοχέα μόνος του (López-Casillas et al, 1993).

Η βηταγλυκάνη αποτελεί ουσιαστικά μια πρωτεογλυκάνη, όπως προαναφέρθηκε, με αλυσίδες θειϊκής ηπαράνης, ή θειϊκής χονδροϊτίνης των οποίων η συμβολή στη σηματοδότηση του TGFβ δεν είναι πλήρως κατανοητή μέχρι τώρα. Ο πρωτεϊνικός κορμός συνδέεται με τον TGFβ, χωρίς όμως να συμμετέχουν οι γλυκοζαμινογλυκανικές (GAG) αλυσίδες του (Cheifetz et al, 1989). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι στα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας οι HS ενισχύουν την πρόσδεση του TGFβ2 στον υποδοχέα του, με αποτέλεσμα την εντονότερη ανάπτυξη των οφθαλμικών κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας (Iwao et al, 2009). Αντιθέτως, οι HS φαίνεται να ρυθμίζουν αρνητικά τη δράση του TGFβ1 μειώνοντας τη σύνδεση του TGFβ1 με τους TGFRII και TGFRI, διευκολύνοντας έτσι την ενδοκυττάρωση και την ταχεία αποδόμηση του αυξητικού παράγοντα. Κατά συνέπεια οι HS φαίνεται να μειώνουν τη σηματοδότηση του TGFβ1 στα επιθηλιακά κύτταρα (Chen et al, 2006).

1.4.2 Ρόλος του TGFβ στο ινοσάρκωμα.

Οι TGFβ διαδραματίζουν σύνθετο ρόλο στη βιολογία του ινοσαρκώματος. Συγκεκριμένα, ο TGFβ1 φαίνεται ότι ρυθμίζει την ισορροπία των MMPs /TIMPs σε κύτταρα HT1080, αναστέλλοντας τις μεταναστευτικές τους ικανότητες. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού της ERK1 / 2 και της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 (Kwak et al, 2006). Επιπλέον, η αυξημένη έκφραση και ενεργοποίηση του TGFβ1, που είναι γνωστό ότι ενισχύει την παραγωγή και τη σταθεροποίηση του ECM φαίνεται να προκαλεί καταστολή του ινοσαρκώματος σε ένα μοντέλο ποντικού (Haroon et al, 2004). Από την άλλη πλευρά όμως, σε παλαιότερη μελέτη, οι Spearman et al, δείχνουν ότι όταν σε κύτταρα ινοσαρκώματος ποντικού ανασταλεί η έκφραση του TGFβ1, οι διεισδυτικές και μεταστατικές τους ιδιότητες μειώνονται σημαντικά (Spearman et al, 1994).

Παράλληλα, έχει αναφερθεί ότι ο TGFβ1 ευθύνεται για την έκφραση του μορίου προσκόλλησης ποδοπλανίνη σε κύτταρα HT1080 (Suzuki et al, 2008).

Όσον αφορά τον TGFβ2, έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να ρυθμίζει τη δημιουργία εξωκυττάριου χώρου στην προαναφερθείσα κυτταρική σειρά (Berdiaki et al, 2008). Η δράση του TGFβ έχει αναδειχθεί επίσης σε κύτταρα ινοσαρκώματος ποντικού 3T3-L1, καθώς φαίνεται ότι επηρεάζει τη διεισδυτικότητά τους μέσω της ρύθμισης ειδικών γονιδίων (Sokol et al, 2004). Παράλληλα, μια πρωτεΐνη του εξωκυττάριου χώρου που συνδέεται με τις ιντεγκρίνες, η Fibulin-5 (FBLN-5), ρυθμίζεται από τον TGFβ. Η υπερέκφρασή της διευκολύνει την επιθετικότητα των κυττάρων HT1080, αυξάνοντας τη μετανάστευσή τους προς την ινονεκτίνη και τη διείσδυση διαμέσου συνθετικών βασικών μεμβρανών (Schiemann et al, 2002). Τα παραπάνω δεδομένα αποδεικνύουν τον περίπλοκο και πολυδύναμο ρόλο του TGFβ στο ινοσάρκωμα. Ως εκ τούτου, στη συγκεκριμένη διατριβή θα επιχειρήσουμε να προσθέσουμε στοιχεία και να διαλευκάνουμε μερικές από τις ενδιαφέρουσες ιδιότητές του.

1.4.3 Ο IGF κατά την ογκογένεση.

Η ινσουλίνη/ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας (IGF) αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό σύστημα που ρυθμίζει το μεταβολισμό, την κυτταρική ανάπτυξη, αλλά και τον καρκίνο.

Οι υποδοχείς των IGF-I και IGF-II παρουσιάζουν διαφορετική δομή. Ο IGF-IR είναι ομόλογος του υποδοχέα της ινσουλίνης (IR) και προσδένει περισσότερο τους IGF-I/IGF-II σε σχέση με την ινσουλίνη. Ο IGF-IIR έχει μονομερή δομή και στερείται καταλυτικών ιδιοτήτων. Προσδένει τον IGF-II μόνο και προκαλεί τη λυσοσωματική αποδόμησή του (Vigneri et al, 2015).

Έχουν περιγραφεί δύο υποδοχείς για την ινσουλίνη. Η βραχύτερη ισομορφή IR-A και η μακρύτερη IR-B. Εκτός από την πρόσληψη γλυκόζης όμως, οι IR υποδοχείς φαίνεται να συμμετέχουν παράλληλα στον πολλαπλασιασμό και το μεταβολισμό των κυττάρων. Ειδικότερα, ο IR-A προσδένει τον IGF-II με όμοια

συγγένεια με την ινσουλίνη και εντοπίζεται σε εμβρυϊκούς και καρκινικούς ιστούς (Vigneri et al, 2015).

Το έργο του IGF-I διεκπεραιώνεται τόσο μέσω του υποδοχέα του IGF-IR, όσο και μέσω των προσδετικών του πρωτεϊνών (IGFBPs). Μέσω ρύθμισης της βιοδιαθεσιμότητάς του, οι IGFBPs επηρεάζουν τις δράσεις του IGF-I. Από τις 6 IGFBPs που υπάρχουν, η IGFBP3 ανιχνεύεται συχνότερα στην κυκλοφορία. Στους ιστούς, οι IGFBPs μπορούν είτε να εμποδίσουν τη σύνδεση των IGFs με τους υποδοχείς τους ανταγωνιζόμενοι την πρόσδεσή τους, ή να ενισχύσουν την επίδραση του IGF στο τοπικό μικροπεριβάλλον επιτρέποντας σταδιακά την απελευθέρωσή τους. Εκτός αυτού, είναι γνωστό ότι κάποιοι IGFBPs έχουν δράσεις στα κύτταρα ανεξάρτητα από τον IGF (Brahmkhatri et al, 2015).

Όσον αφορά τις δράσεις του IGF-I, αυτές διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: λειτουργίες που εξαρτώνται από την αυξητική ορμόνη (GH), είτε μέσω ηπατικής ή παραγωγής από άλλο ιστό στόχο και αυτές που δεν εξαρτώνται από τη GH και επιτελούνται σε συγκεκριμένους ιστούς (Hull et al, 2014). Έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς με υψηλά επίπεδα IGF-I, είτε μεγαλακρικοί, παχύσαρκοι, ή διαβητικοί τύπου ΙΙ, έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο. Αντιθέτως, άτομα με ανεπάρκεια IGF-I, όπως ασθενείς με σύνδρομο Laron (με οικογενή ανεπάρκεια IGF-I και αντίσταση στη GH), καθώς και ασθενείς με συγγενώς αμιγή ανεπάρκεια GH, είναι πιο προστατευμένοι από την ανάπτυξη καρκίνου, σε σχέση με τους υγιείς συγγενείς τους (Gallagher et al, 2011).

Η ογκογόνος δράση του IGF-I έχει μελετηθεί ευρέως έως τώρα. Όσον αφορά το επίπεδο του κυττάρου, ο IGF-I ενισχύει την ανάπτυξη του όγκου, αναστέλλοντας την απόπτωση και προωθώντας τον κυτταρικό κύκλο, την αγγειογένεση και τη μετάσταση (Brahmkhatri et al, 2015). Ο IGF-I επηρεάζει σημαντικά τόσο τους επιθηλιακούς, όσο και τους μεσεγχυματικούς όγκους (Samani et al, 2007).

Όσον αφορά τη σηματοδότηση του IGF-I στον καρκίνο, αυτή διαμεσολαβείται από τον IGF-IR, όπως προαναφέρθηκε. Ο IGF-IR είναι ένας τυροσινικός υποδοχέας, ο οποίος συχνά υπερεκφράζεται σε καρκίνους, όπως το μελάνωμα, τον καρκίνο του κόλου, του παγκρέατος, του προστάτη και του νεφρού. Η υπερέκφρασή του μπορεί να είναι αποτέλεσμα της απώλειας ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το p53,

BRCA1 και VHL. Η ενεργοποίησή του οδηγεί στην αυτοφωσφωρυλίωση των τυροσινών 1131, 1135 και 1136 και στη συνέχεια στη φωσφωρυλίωση διαμεμβρανικών τυροσινών και καρβοξυτελικών σερινών. Μετά τις φωσφορυλιώσεις αυτές, μόρια ΄΄αγκυροβόλια΄΄, όπως το υπόστρωμα του ινσουλινικού υποδοχέα (IRS) και οι πρωτεΐνες Shc και 14-3-3 προσδένονται στον IGF-IR, ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια της ανάπτυξης, διαφοροποίησης και προστασίας ενάντια στην απόπτωση.

Τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται μέσω του IGF-IR είναι κυρίως το RAS/RAF/MAPK, αλλά και το PI3K/AKT/mTOR. Αυτά ευθύνονται για τη διαφοροποίηση, απόπτωση, μετανάστευση και άλλες σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες (Εικόνα 1).

Ένας ακόμα σημαντικός ρόλος του IGF-IR στον καρκίνο είναι η εμπλοκή του στη διείσδυση και τη μετάσταση, μέσω της αύξησης της μεταγραφής της β-catenin και της αποκόλλησης της E-cadherin από τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Το αποτέλεσμα είναι να διακόπτονται οι διακυτταρικές επαφές και να διευκολύνεται η κινητοποίηση των καρκινικών κυττάρων (Riedemann et al, 2006, Klement et al, 2016).

Μελετώντας τον IGF-I σε επιμέρους κακοήθειες, επιβεβαιώνουμε την ογκογόνο συμπεριφορά του. Σε καρκίνο του προστάτη έχει παρατηρηθεί ότι οι υποδοχείς του IGF είναι αυξημένοι και η κατάργησή τους με μονοκλωνικά αντισώματα ή αναστολείς της τυροσινικής κινάσης οδηγεί στον περιορισμό του όγκου (Heidegger et al, 2015).

Παράλληλα, ο IGF-II μέσω του IR-A μπορεί να αυξήσει την αγγειογένεση, την κυτταρική επιβίωση και την τελική πρόοδο του νεφρικού καρκίνου (Solarek et al, 2015). Είναι πολλές οι μελέτες που έχουν δείξει τη συσχέτιση του άξονα IGF/IGFR/IGFBP με την πρόοδο του οισοφαγικού πλακώδους καρκινώματος, του οισοφαγικού αδενοκαρκινώματος και του γαστρικού αδενοκαρκινώματος (Kashyap et al, 2015).

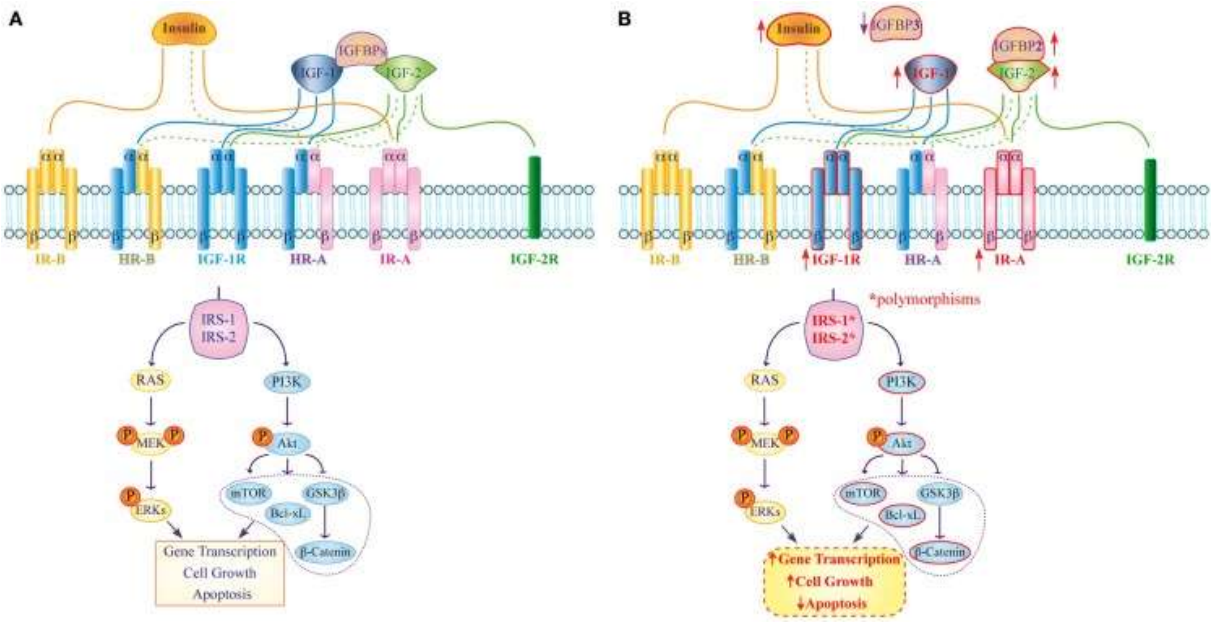
Ο IGF-I φαίνεται επίσης ότι αυξάνει τη μετανάστευση και ενός άλλου νεοπλάσματος, του πολλαπλού μυελώματος, διεγείροντας τον πολυμερισμό της F-actin. Το επιτυγχάνει μέσω ενεργοποίησης πρωτεϊνών που είναι σημαντικές για το

σχηματισμό σημείων προσκόλλησης, όπως η FAK και η paxillin και αυξάνοντας τελικά την αλληλεπίδραση αυτών των μορίων με την ιντεγκρίνη β1 (Tai et al, 2003).

Όσον αφορά τέλος το μαστό, ο IGF ενισχύει το σχηματισμό σημείων προσκόλλησης σε κύτταρα καρκίνου του μαστού, επηρεάζοντας έτσι τη μεταναστευτική ικανότητά τους. Η συνδεκάνη 1 μέσω της αλληλεπίδρασής με την ιντεγκρίνη β1, βοηθά τον IGF-IR να ενεργοποιήσει το μονοπάτι που συνδέεται με την talin, αλλάζοντας στη συνέχεια τον κυτταροσκελετό και την κινητικότητα των κυττάρων (Beauvais et al, 2010).

Εικόνα 1. **Έκφραση και λειτουργία του συστήματος ινσουλίνης/IGF σε φυσιολογικά και κύτταρα ορθοπρωκτικού καρκίνου**

(Vigneri et al, 2015)



1.4.4 Συμμετοχή του IGF στο ινοσάρκωμα.

Ένα από τα νεότερα *in vivo* πειράματα για τη διερεύνηση της δράσης του IGF-I στον καρκίνο ήταν η εφαρμογή του σε ποντίκια με υποφυσιεκτομή. Με την

χειρουργική αυτή παρέμβαση, καταστέλλεται ο άξονας GH/IGF. Παρατηρήθηκε ότι όταν στα κύτταρα προστίθεται ανασυνδυασμένη GH και γίνεται εμβολιασμός με κύτταρα ινοσαρκώματος αυξάνονται οι μεταστάσεις σε σχέση με αυτά στα οποία έλειπε η GH και ο IGF-I. Το αποτέλεσμα αυτό ανέδειξε τη σημασία των συγκεκριμένων παραγόντων στη μεταστατική ικανότητα του ινοσαρκώματος και υπέδειξε τους ανταγωνιστές τους ως πιθανούς στόχους για την καταστολή της επιθετικότητας συγκεκριμένων όγκων (Sekyi-Out et al, 1994).

Σε μία μελέτη αναφορά, συσχετίστηκε ο μετασχηματισμός ενός ινωματώδους όγκου του ήπατος σε κακόηθες ινοσάρκωμα, με τα αυξημένα επίπεδα IGF-II στο αίμα. Η αύξηση αυτή προκάλεσε υπογλυκαιμία στον ασθενή. Στη συνέχεια, μεταστάσεις συνοδεύτηκαν ξανά από υποτροπιάζουσα υπογλυκαιμία, η οποία αποδόθηκε πάλι στα αυξημένα επίπεδα του IGF-II, υποδεικνύοντας το συγκεκριμένο αυξητικό παράγοντα ως δείκτη βαρύτητας του όγκου σε αυτήν την περίπτωση (Chan et al, 2007).

Όπως προαναφέρθηκε, κλινικές μελέτες κατά το παρελθόν έχουν δείξει ότι άνθρωποι με μειωμένα επίπεδα ινσουλίνης, IGF-I και IGF-II παρουσιάζουν μικρότερες πιθανότητες για ανάπτυξη νεοπλασμάτων. Αυτή η πληροφορία έχει δώσει το έναυσμα για το σχεδιασμό σχημάτων χημειοθεραπείας, αναστέλλοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι του IGF-I (Gallagher et al, 2011).

Όσον αφορά τη σημασία του IGF-IR στο ινοσάρκωμα, έχει βρεθεί ήδη σε παλαιότερες μελέτες ότι η προσθήκη ανασυνδυασμένου IGF ενισχύει την ανάπτυξη του όγκου μέσω ενεργοποίησης της μίτωσης, ενώ για τη δράση αυτή είναι απαραίτητη η παρουσία επαρκούς ποσότητας IGF-IR (Butler et al, 1998).

Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες οι έρευνες που έχουν εστιάσει στο μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του IGF-IR. Ένα τέτοιο αντίσωμα είναι το figitumumab. Έχουν παρατηρηθεί θετικά αποτελέσματα σε ικανοποιητικό αριθμό ασθενών με σάρκωμα Ewing, άλλοτε με σταθεροποίηση και άλλοτε με ύφεση της νόσου με τη χορήγηση του αντισώματος (Olmos et al, 2010). Στο παρελθόν έχει δοκιμαστεί αναστολέας της κινάσης του IGFR στο σάρκωμα Ewing, στο ραβδομυοσάρκωμα, αλλά και σε οστεοσάρκωμα, με μεγαλύτερη επιτυχία στο σάρκωμα Ewing (Scotlandi et al, 2005). Πιο πρόσφατα, ένα άλλο μονοκλωνικό

αντίσωμα κατά του IGF-IR, το cixutumumab (IMC-A12) έδειξε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε παιδιά με ινοσάρκωμα, γεγονός που ενισχύει τον κρίσιμο ρόλο του υποδοχέα στην παθογένεση του ινοσαρκώματος (Malempati et al, 2012).

Στο επίπεδο του κυττάρου υπάρχουν περιορισμένα ευρήματα που να εξηγούν τον ογκογόνο ρόλο του IGF στο ινοσάρκωμα. Έχει αποδειχθεί ότι ο IGF-I έχει θετική επίδραση στη μετανάστευση κυττάρων του ινοσαρκώματος αλλάζοντας την έκφραση της MMP-2, η οποία προκαλεί μεταβολές στον εξωκυττάριο χώρο του όγκου, διευκολύνοντας την διεισδυτικότητά του (Yoon et al, 2001). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η SDC1 ενεργοποιεί τον IGF-IR στα HT1080 (Péterfia et al, 2012). Το συγκεκριμένο εύρημα θα μπορούσε να αποτελέσει την αρχή για τη διερεύνηση ενός πιθανού συμπλόκου που θα περιλάμβανε τη συνεργασία του υποδοχέα IGF-IR με τις συνδεκάνες. Κρίνοντας από τις μοναδικές ιδιότητες τους, θα ήταν ενδιαφέρον να δούμε αν οι συνδεκάνες, και ιδιαίτερα η συνδεκάνη 2 παίζει κάποιο ρόλο στη σηματοδότηση του IGF-I στο ινοσάρκωμα.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να μελετηθούν σε βάθος και να κατανοηθούν οι ιδιότητες της συνδεκάνης 2 (SDC2) στο ινοσάρκωμα. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η συμμετοχή της στα σηματοδοτικά μονοπάτια του αυξητικού παράγοντα του μετασχηματισμού (TGF), καθώς και του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα (IGF). Απώτερος στόχος ήταν η αναγνώριση του ρόλου που διαδραματίζει η συγκεκριμένη πρωτεογλυκάνη στις κυτταρικές λειτουργίες που επάγονται από αυτούς τους αυξητικούς παράγοντες και συγκεκριμένα την προσκόλληση στον εξωκυττάριο χώρο και τη μετανάστευση.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Κυτταρικές καλλιέργειες

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά ανθρώπινου ινοσαρκώματος HT1080 (ATCCNo.: CCL-121) (Rasheed et al, 1974). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στους 37°C και σε ατμόσφαιρα CO2 5% (v/v) σε ειδικές φλάσκες καλλιέργειας ή τριβλία με την κατάλληλη επίστρωση. Το θρεπτικό καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το DMEM (BIOCHROM) παρουσία 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum) (GIBCO), γλουταμίνης (4 mM) και των αντιβιοτικών πενικιλλίνη (100 units/ml) και στρεπτομυκίνη (100 μg/ml). Η αλλαγή του θρεπτικού καλλιέργειας γινόταν κάθε δύο μέρες. Η αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες καλλιέργειας γινόταν είτε με ήπια ενζυμική κατεργασία με 0.25% τρυψίνη σε PBS 0.1% (w/v) Na2 EDTA, (GIBCO) είτε μετά από PBS/EDTA pH 7,7 για 5 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη ενός όγκου θρεπτικού για τη λήξη της ενζυμικής δραστηριότητας και κατόπιν πραγματοποιόταν φυγοκέντρηση των κυττάρων για 10 λεπτά στις 1500 στροφές. Τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 1 ml θρεπτικού και με την κατάλληλη αραίωση, γινόταν η καλλιέργειά τους σε νέες φλάσκες. Η συνήθης αραίωση των κυττάρων ήταν 1/10 για καλλιέργεια 48 ωρών σε 10% θρεπτικό καλλιέργειας. Για τη μέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αιματοκυτταρόμετρο neubauer αφού προηγουμένως τα κύτταρα είχαν αραιωθεί σε 0,25% trypan blue. Τέλος, γινόταν ο υπολογισμός των κυττάρων και η επιλογή του κατάλληλου αριθμού τους σύμφωνα με τη διάμετρο του πιάτου χρήσης, τους χρόνους των επωάσεων και την ειδική επεξεργασία που απαιτείτο για κάθε πείραμα.

2.2 Απομόνωση RNA – Ποσοτικός Προσδιορισμός

Τα κύτταρα HT1080 στρώθηκαν σε πιάτα 24 οπών παρουσία 10% FBS για 24 ώρες και έπειτα σε συνθήκες έλλειψης FBS για 24 ή και περισσότερες ώρες. Μετά από 0, 24, ή 48 ώρες χορήγησης παραγόντων έγινε απομόνωση του ολικού RNA από τα κύτταρα. Η εκχύλιση του RNA πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο Trizol (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν παρουσία του Trizol, το οποίο είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, που διαλυτοποιεί τα κυτταρικά συστατικά χωρίς να επηρεάζει το RNA και διασπά τις κυτταρικές μεμβράνες

ελευθερώνοντας έτσι το γενετικό υλικό. Ακολούθησε η εκχύλιση του RNA με τη βοήθεια χλωροφορμίου. Το RNA των κυττάρων κατακρημνίστηκε με τη χρήση ισοπροπανόλης, στη συνέχεια καθαρίστηκε με απόλυτη αιθανόλη (100%) και τέλος έγινε επαναδιάλυση του ιζήματος σε 30 μl DEPC RNase/DNase free νερό. Η ποσότητα και η καθαρότητα του RNA που απομονώθηκε μετρήθηκε με φωτομέτρηση στα 260nm και 260/280nm αντίστοιχα και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι να αναλυθεί.

2.3 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 Primescript. Αρχικά, έγινε προετοιμασία του μίγματος της αντίδρασης προσθέτοντας τους εκκινητές, τα ολιγονουκλεοτίδια (dNTPs), το ειδικό διάλυμα αλάτων (Primescript buffer) και το ένζυμο, το οποίο μοιράστηκε σε ειδικά σωληνάρια για την αντίστροφη μεταγραφή. Σε κάθε σωληνάριο έγινε προσθήκη ενός μg του συνολικού RNA και τοποθετήθηκε στο μηχάνημα της PCR (TECNE TC-512). Σύμφωνα με το Primescript RT reagent kit η αντίστροφη μεταγραφή τελείται στους 37°C για 15 λεπτά και έπειτα το ένζυμο απενεργοποιείται στους 85°C για 5 λεπτά. Το cDNA αποθηκεύτηκε στους -20°C.

2.4 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 KAPA SYBR FAST qPCR Kit 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 στους 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 αυτό 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.

2.5 Απομόνωση και Ανάλυση Πρωτεϊνών

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

2.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS PAGE) και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 8%, το οποίο περιλαμβάνει το πήκτωμα επιστοίβαξης των πρωτεϊνών (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Το stacking gel συμβάλλει στην ομοιόμορφη εισαγωγή των δειγμάτων στο 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 160 V για 1-2 ώρες (ανάλογα με το μοριακό βάρος της υπό μελέτη πρωτεΐνης). Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη βοήθεια ειδικής συσκευής ηλεκτροφόρησης και κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (CAPs 1x, pH 11). Η μεταφορά διήρκεσε 2-3 ώρες (ανάλογα με το μέγεθος της πρωτεΐνης) και πραγματοποιήθηκε στα 16 V. Στη συνέχεια, οι ελεύθερες πρωτεϊνικές περιοχές της μεμβράνης δεσμεύτηκαν (blocking) μέσω επώασης της μεμβράνης με 5% (w/v) αποβουτυρωμένου γάλακτος σε PBS/Tween για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C για 16-20 ώρες. Έπειτα, ακολούθησαν πλύσεις της μεμβράνης για μισή ώρα με PBS/Tween (5-10 λεπτά η καθεμιά). Στη συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα ειδικής αραίωσης του πρώτου αντισώματος σε διάλυμα PBS/Tween που περιείχε 1% γάλα και επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS/Tween και στη συνέχεια έγινε η προσθήκη του αντίστοιχου δεύτερου αντισώματος σε συγκεκριμένη συγκέντρωση και επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη στη συνέχεια πλύθηκε χρησιμοποιώντας PBS/Tween, όπως και προηγουμένως. Τέλος, η μεμβράνη, μετά την επώασή της για 4 λεπτά με το διάλυμα εμφάνισης ECL, εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ όπου αποτυπώθηκε η εκπομπή χημειοφωταύγειας από τις πρωτεΐνες. Κατόπιν, τα φιλμ εμφανίστηκαν σε ειδικό μηχάνημα της Kodak. Η πυκνότητα των ζωνών χρησιμοποιήθηκε ως ποσοτική παράμετρος και υπολογίστηκε αναλύοντας τη ψηφιακή εικόνα με το πρόγραμμα J image. Η ημιποσοτικοποίηση των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό του λόγου της πυκνότητας της ζώνης της πρωτεΐνης στόχου προς την πυκνότητα της ζώνης της β-ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

2.7 Αναστολή έκφρασης γονιδίων με siRNA (transfection)

Στη συγκεκριμένη διατριβή χρειάστηκε να γίνει η καταστολή έκφρασης των γονιδίων της SDC2, 4 και της FAK, η οποία διενεργήθηκε ως εξής: Τα siRNA (100 pmol) και η Lipofectamine TM 2000 (Invitrogen) (1 μl) διαλύθηκαν σε 50μl OptiMEM I (Invitrogen) όπου και παρέμειναν για 5 λεπτά. Έπειτα τα διαλύματα

αυτά ενώθηκαν, έμειναν για 20 min σε RT και τοποθετήθηκαν στα πιάτα καλλιέργειας 24 θέσεων (100 μl). Στη συνέχεια προστέθηκαν τα κύτταρα (8 x 10^4) αφού προηγουμένως είχαν διαλυθεί σε θρεπτικό χωρίς FBS και χωρίς αντιβιοτικά. Μετά από 6 ώρες επώασης αφαιρέθηκε το θρεπτικό με το siRNA και προστέθηκε φρέσκο DMEM 0% με αντιβιοτικά. Η έκφραση των γονιδίων SDC2, 4 και FAK μετρήθηκε στις 24 ώρες με τη μέθοδο Real- Time PCR, ενώ χρησιμοποιήθηκε το western blot προκειμένου να διαπιστώσουμε τη μείωση της έκφρασης σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Ως αρνητικό control της τεχνικής χρησιμοποιήθηκε το siSCr, δηλαδή ένα siRNA που δεν αντιστοιχεί σε κανένα γονίδιο. Μετά την ένωση των αλληλουχιών (sense- antisense) που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα, ακολούθησε βράσιμο για 3 min στους 90°C και έπειτα πραγματοποιήθηκε η αναστολή της έκφρασης των γονιδίων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

2.8 Δοκιμή κυτταρικής προσκόλλησης

Τα HT1080 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πιάτο 24 οπών παρουσία ορού για 24 ώρες και έπειτα σε συνθήκες έλλειψης ορού (FBS) για άλλες 24 ώρες. Η καλλιέργεια των κυττάρων έλαβε χώρα είτε σε μικρή φλάσκα (T25) όπου τα κύτταρα στρώθηκαν σε αραίωση 1/10, είτε σε πιάτο 6 οπών όπου στρώθηκαν περίπου 2x10^5 κύτταρα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάστηκαν με τους παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή, για ακόμα 48 h. Μετά από 48h, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με το PBS/EDTA pH 7,7 και 5000 κύτταρα/πηγάδι στρώθηκαν σε πιάτο καλλιέργειας 96 οπών για 30 min. Μετά από 30 min αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησε μια πλύση με DMEM 0%. Ο αριθμός των κυττάρων που έμεινε στο πιάτο μετρήθηκε με το CyQUANT cell proliferation Assay Kit (Molecular Probes) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε όλα τα πειράματα προσκόλλησης χρησιμοποιήθηκε πιάτο που είχε επωαστεί προηγουμένως με (5 μg/ cm^2) ινονεκτίνη (FN) σε 100 μl PBS για 1h στους 37°C. Μετά την επώαση με την FN, οι ελεύθερες περιοχές του πιάτου δεσμεύτηκαν με 1% BSA σε 200 μl PBS (blocking) για 30 min σε RT, το οποίο είχε υποστεί φιλτράρισμα και βράσιμο στους 100°C για 3 min.

2.9 Ανοσοφθορισμός

$6x10^5$ κύτταρα τοποθετήθηκαν πάνω σε στρογγυλές καλυπτρίδες ενός πιάτου 24 οπών και επωάστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό παρουσία ορού. Μετά από 24 ώρες σε θρεπτικό ελλείψει ορού, προστέθηκαν οι διάφοροι παράγοντες και τα κύτταρα επωάστηκαν για 48 ώρες στους 37°C και σε 5% CO_2. Έπειτα τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 5% φορμαλδεΰδη και 2% σουκρόζη σε PBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από τρεις πλύσεις με PBS που περιείχε 1% FBS, προστέθηκε το αντιδραστήριο Triton X-100 για 10 λεπτά, ώστε να ανοίξουν οι πόροι των μεμβρανών των κυττάρων και να γίνει πιο εύκολη η διείσδυση του αντισώματος μέσα στα κύτταρα. Μετά από μια πλύση σε PBS ακολούθησε η επώαση με τα αντισώματα σε 1% FBS/PBS, η οποία πραγματοποιήθηκε για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Καλυπτρίδες οι οποίες δεν επωάστηκαν με το πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό control. Κατόπιν, οι καλυπτρίδες πλύθηκαν ξανά και επωάστηκαν για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου με δεύτερα αντισώματα Alexa fluor 488 (Invitrogen). Η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε για τα πρώτα αντισώματα ήταν 1/50 και 1/200 για τα δεύτερα. Για τη χρώση των πυρήνων χρησιμοποιήθηκε το TO-PRO3 αραιωμένο 1/1000 σε απιονισμένο νερό για 10 λεπτά στο σκοτάδι. Τα ινίδια της ακτίνης ανιχνεύτηκαν με τη χρήση της φθορίζουσας Phaloidin (Molecular Probes) αραιωμένη 1/100 σε PBS για 40min. Στο τέλος προκειμένου να μονιμοποιηθεί η καλυπτρίδα στο πλακάκι χρησιμοποιήθηκε γλυκερόλη (DACO). Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων και την ανάλυση των εικόνων χρησιμοποιήθηκε το confocal μικροσκόπιο.

2.10 Ανοσοκατακρήμνιση με A/G πρωτεΐνη αγαρόζη

Για την πραγματοποίηση της τεχνικής αυτής συλλέχθησαν $2x10^6$ κύτταρα και αραιώθηκαν σε 1ml διαλύματος NP40 το οποίο περιείχε αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών. Μια ποσότητα 100μl αποθηκεύτηκε στους -80°C. Στην υπόλοιπη ποσότητα των 900μl από κάθε πρωτεϊνικό δείγμα, προστέθηκαν 30μl του πρώτου αντισώματος anti-p-ezrin ή anti-IGF-IR και έτσι τα δείγματα επωάστηκαν στους 4°C

υπό ελαφριά ανακίνηση για 24 ώρες. Η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκε την επόμενη μέρα μετά από την προσθήκη 30μl πρωτεΐνης A/G αγαρόζης (sc 2003, Santa Cruz) για 4 ώρες στους 4°C υπό ελαφριά ανακίνηση. Μετά από μια φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 1 λεπτό στους 4°C, η πελέττα αραιώθηκε για μία ακόμη φορά σε 1ml διάλυμα NP40. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε δύο ακόμη φορές. Στο τέλος, η πελέττα αραιώθηκε σε 30μl χρωστικής 2x για western blotting.

2.11 Δοκιμή κυτταρικής μετανάστευσης

Χρησιμοποιήθηκαν πιάτα 24 οπών τα οποία καλύφθηκαν με υπόστρωμα ινονεκτίνης (10μg/ml). Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 5X10^{4} κύτταρα πάνω σε Transwell inserts, τα οποία αφέθησαν να μεταναστεύσουν προς την ινονεκτίνη για 4 ώρες σε συνθήκες επώασης. Τα κύτταρα που μετανάστευσαν συλλέχθησαν με τρυψίνη και αφού καταψύχθηκαν στους -80°C για 1 ώρα, μετρήθηκαν με τη μέθοδο CyQUANT fluorometric Assay Kit (Molecular Probes) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, σε φλουορόμετρο.

2.12 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 $p \leq 0,05$.

2.13 Διαλύματα

• Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού πρωτεϊνών (separating buffer): 1.5 M Tris-HCl, 4% SDS (w/v), pH 8.8

• Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοίβαξης πρωτεϊνών (stacking buffer): 0.5 M Tris-HCl, 1.6% SDS (w/v), pH 6.8

• Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών: 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% γλυκερόλη (glycerol), 1% μερκαπτοαιθανόλη (β-mercaptoethanol), 12.5 mM EDTA, 0.02% μπλε της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue)

• Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM γλυκίνη (glycine), 0.1% SDS

• Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών: 10 mM CAPS, pH 11, containing10% methanol

• Διάλυμα αποδιάταξης πρωτεϊνών (RIPA): Tris/HCL 50 mM, EDTA 0.5 M, Triton X-100 1%, NaCl 0.1%, and protease/phosphatase inhibitors (PMSF 1mM, NEM 5 mM, benzamidin 5 mM, sodium cholate 1%, orthovanadate 1mM)

• Διάλυμα έκπλυσης μεμβρανών: PBS, Tween 1% (v/v)

• Διάλυμα διαπερατότητας: 1% Triton in PBS

• Διάλυμα μονιμοποίησης: 0.4 gr sucrose, 5% formaldehyde, in 20ml PBS

2.14 Αντισώματα:

Πρώτα αντισώματα:

p-smad2 santa cruz, ser467 sc-101801 1:100

smad2 santa cruz, s-20 sc-6200 1:200

ΔHS F69 3G10, seikagaku Japan, 1:500

FAK santa cruz sc-557 1:50 και 1:200

pFAK MAB1144, Millipore 1:200

ERK1/2 santa cruz sc-16982 1:200

pERK1/2 santa cruz sc-136521 1:200

ezrin santa cruz sc-58758 1:200

p-ezrin santa cruz sc-101677 1:200

Actin santa cruz sc-1616 1:200

Syndecan 2 santa cruz, sc-9492 1:200

Integrin β1 santa cruz, sc-59829 1:200

TGFRI santa cruz, sc-9048 1:200

TGFRII santa cruz, sc-33929 1:200

TGFRIII santa cruz sc-74511 1:200

Δεύτερα αντισώματα:

Anti-goat sc-2304 1:2000

Anti-mouse sc2005 1:2000

Anti-rabbit sc-2004 1:2000

2.15 Εκκινητές:

Syndecan 2: F 5′ GGG AGC TGA TGA GGA TGT AG3′,

Syndecan 2: R 5′ CAC TGGATG GTT TGC GTT CT3′

GAPDH: F 5′ GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA 3′

GAPDH: R 5′ GTC ATT GAT GGCAAC AAT ATC CAC T 3′

Integrin β1: F 5′ TCCCACTGGTCCAGACATTCC 3′

Integrin: R 5′ CCATATCAGCAGTAATGCAAGGCCAATA 3′

Focal Adhesion Kinase [FAK]: F 5′ GTGCTC TTGGTTCAAGCTGGAT 3′

Focal Adhesion Kinase [FAK]: R 5′ ACTTGAGTGAAGTCAGCAAGATGTGT 3′

IGF-IR: F 5′ TCTCTTCTACCTGGCGCTGT-3′

IGF-IR: R 5′ AAGCAGCAGTCATCCACGAT-3′

Ezrin: F 5′ GTTTTCCCCAGTTGTAATAGT GCC-3′

Ezrin: R 5′ TCCGTAATTCAATCAGTCCTGC-3′

3. Αποτελέσματα (1)

Μηχανισμοί συμμετοχής της SDC2 στην εξαρτώμενη από τον TGFβ2 προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος μέσω του Smad2.

Ο TGFβ2 είναι ένα μέλος της υπεροικογένειας TGFβ, το οποίο κρατεί σημαντική θέση ανάμεσα στα σηματοδοτικά δίκτυα που ελέγχουν την τελική μοίρα

του κυττάρου (Massague et al, 2000). Υπάρχουν τρεις ισομορφές του TGFβ περιγεγραμμένες στα θηλαστικά, TGFβ1, 2, και 3, με τον TGFβ1 να αποτελεί την πιο συχνή μορφή στους ιστούς. Ειδικότερα, οι ισομορφές TGFβ ρυθμίζουν πλήθος βιολογικών δράσεων, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, προσκόλλησης, ανάπτυξης, ιστικής επούλωσης, ανοσοκαταστολής και καταστολής της ογκογένεσης (Inman et al, 2011, Massague et al, 2000, Whitman et al, 1998). Ο ρόλος της σηματοδότησης του TGFβ είναι αμφιλεγόμενος για την ογκογένεση, καθώς κατά την εξέλιξη του όγκου, ο TGF μπορεί να αλλάξει ρόλους, από ογκοκατασταλτικός, σε παράγοντας ενίσχυσης του όγκου (Inman et al, 2011). Ο TGFβ πραγματοποιεί τη σηματοδότησή του επιστρατεύοντας συμπλέγματα υποδοχέων τύπου I, II και σε κάποιες περιπτώσεις III (TGFRI, TGFRII, και TGFRIII ή βηταγλυκάνη), που ενεργοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες Smad (Massague et al, 1998). Μετά τη σύνδεσή του με συγκεκριμένα μόρια, ο TGFRII φωσφωρυλιώνει τον TGFRI και ενισχύει την ενδοκυττάρια σηματοδότησή του (Massague et al, 1998). Ο καλύτερα χαρακτηρισμένος ρόλος του TGFRIII είναι αυτός του TGFβ συνυποδοχέα που προσδένει άμεσα συνδέτες, όπως ο TGFβ1, 2 και 3. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ικανότητα του TGFRIII να παρουσιάζει συνδέτες, αυξάνει την πρόσδεσή τους στους αντίστοιχους συγγενείς υποδοχείς τύπου I και II της υπεροικογένειας του TGFβ προκειμένου να ενισχυθεί η σηματοδότησή τους μέσω των πρωτεϊνών Smad, που έχουν συγκεκριμένους ρόλους στην εξέλιξη του καρκίνου (Bilandzic et al, 2011). Η ικανότητα του TGFRIII να παρουσιάζει ένα συνδέτη είναι ιδιαίτερα σημαντική για κάποιους παράγοντες της υπεροικογένειας του TGFβ, για παράδειγμα τον TGFβ2, εφόσον ο συγκεκριμένος παράγοντας δεν μπορεί να προσδεθεί μόνος του στο συγγενή υποδοχέα του (Lopez-Casillas et al, 1993). Κάποιες μελέτες προτείνουν, εντούτοις, ότι η υπερέκφραση του TGFRII μπορεί να αντισταθμίσει την υποχρεωτική συμμετοχή της βηταγλυκάνης στην παρουσίαση του TGFβ2 (Del Re et al, 2004). Η βηταγλυκάνη περιέχει αλυσίδες θειϊκής ηπαράνης (HS), ή θειϊκής χονδροϊτίνης (CS), των οποίων η συνεισφορά στη σηματοδότηση του TGFβ δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή, αφού ο πρωτεϊνικός κορμός φαίνεται να προσδένει ειδικά τον TGFβ χωρίς απαραίτητα να συμμετέχουν οι γλυκοζαμινογλυκανικές αλυσίδες (Bilandzic et al, 2011). Η SDC2, ένα από τα

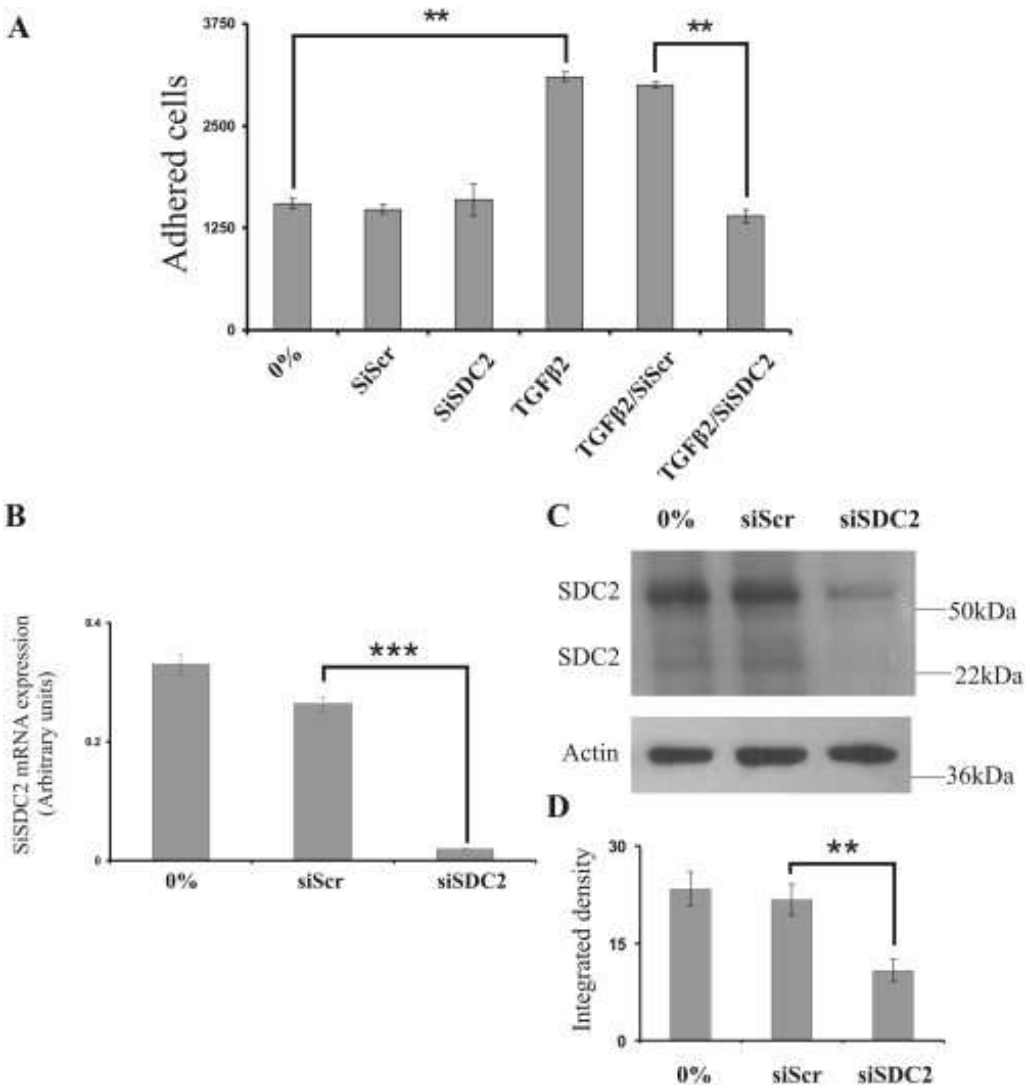
τέσσερα μέλη της οικογένειας των διαμεμβρανικών πρωτεογλυκανών με αλυσίδες HS στα θηλαστικά, φαίνεται να επηρεάζει τη δραστηριότητα του TGFβ1 στους ινοβλάστες (Chen et al, 2004).

Το ινοσάρκωμα, όπως προαναφέρθηκε, είναι σπάνιος κακοήθης όγκος προερχόμενος από ινοβλάστες. Χαρακτηρίζεται συχνά από άφθονη εναπόθεση ECM (Willems et al, 2010), που όπως φαίνεται από κυτταροκαλλιέργειες, υφίσταται πολύ συχνά αλλαγές (Berdiaki et al, 2009, Fthenou et al, 2009). Η σηματοδότηση του TGFβ φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη βιολογία των καρκινικών κυττάρων του ινοσαρκώματος. Έτσι, όταν κύτταρα ινοσαρκώματος ποντικού έλαβαν ειδικά ολιγονουλεοτίδια που καταστέλλουν την έκφραση του TGFβ1, οι διηθητικές και μεταστατικές ιδιότητές τους μειώθηκαν σημαντικά (Spearman et al, 1994). Ταυτόχρονα, ο TGFβ1 φάνηκε να ενισχύει την ικανότητα προσκόλλησης αιμοπεταλίων, όπως επίσης να αυξάνει την έκφραση του προσοκολλητικού μορίου ποδοπλανίνη, στα κύτταρα του ανθρώπινου ινοσαρκώματος HT1080 (Suzuki et al, 2008), ενώ ο TGFβ2 έδειξε να ρυθμίζει το σχηματισμό περικυττάριου στρώματος στα HT1080 (Berdiaki et al, 2008). Αντιθέτως, ο TGFβ1 βρέθηκε να ελέγχει την ισορροπία των μεταλλοπρωτεϊνασών (MMPs) / ιστικών αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνασών (TIMPs) στα κύτταρα HT1080, με τρόπο ανασταλτικό για τις διηθητικές και μεταναστευτικές τους ιδιότητες, υποστηρίζοντας τον TIMP-1 μέσω των ERK κινασών και τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 (Kwak et al, 2006). Επιπλέον, η διηθητικότητα των κυττάρων 3T3-L1 του ινοσαρκώματος ποντικών βρέθηκε να βασίζεται στη ρύθμιση ειδικών γονιδίων από τον TGFβ (Sokol et al, 2004). Τα παραπάνω δεδομένα παρουσιάζουν την πολύπλευρη επίδραση του TGFβ ως προς τις λειτουργίες του ινοσαρκώματος και τονίζουν την ανάγκη να κατανοηθούν οι λεπτοί μηχανισμοί πίσω από τα αντίστοιχα σηματοδοτικά μονοπάτια του TGFβ. Στη συγκεκριμένη μελέτη, εστιάσαμε στους μηχανισμούς δράσης του TGFβ2 στην προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος. Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι ο TGFβ2 επηρεάζει την προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος με τρόπο εξαρτώμενο από τη SDC2 και μέσω ενδοκυττάριας σηματοδότησης που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Smad.

3.1 Η SDC2 είναι απαραίτητη για την επαγώμενη από τον TGFβ2 προσκόλληση στην FN

Στην εντόνως μεταστατική κυτταρική σειρά ανθρώπινου ινοσαρκώματος, HT1080 (Rasheed et al, 1974), προστέθηκε TGFβ2, ένας παράγοντας που εκφράζεται ενδογενώς από αυτά τα κύτταρα (Berdiaki et al, 2008). Ο παράγοντας χορηγήθηκε για 48 h και η προσκολλητική ικανότητα των κυττάρων εκτιμήθηκε από μία ειδική δοκιμασία προσκόλλησης (adhesion). Όπως απεικονίζεται στην Εικ. 1A, ο TGFβ2 αυξάνει ειδικά την προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος στην FN ($P \leq 0.01$). Η επιμόλυνση των HT1080 κυττάρων με SDC2 siRNA (siSDC2) για 48 h είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης του mRNA της SDC2 έως και 95% ($P \leq 0.001$) και μια διπλάσια μείωση στην πρωτεϊνική έκφραση της SDC2 ($P \leq 0.01$), σε σχέση με τα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το αρνητικό control siScr (Εικ.1B–1D). Στα πειράματα control, όπου τα κυτταρικά θραύσματα υπέστησαν πέψη με ηπαριτινάση (0.001 unit/ml; Seikagaku, Tokyo, Japan) ώστε να αποκοπούν οι αλυσίδες HS και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα για τον πρωτεϊνικό κορμό της SDC2, φάνηκε ότι η πρωτεΐνη SDC2 των HT1080 είναι μερικώς γλυκοζυλιωμένη (Supporting Information Εικ. 1A–1B). Είναι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα ανεπαρκή σε SDC2 κύτταρα δεν ανταποκρίθηκαν στη δράση του TGFβ2 κατά την προσκόλλησή τους στη FN, σε σχέση με τα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με control siScr ($P \leq 0.01$; Εικ. 1A). Η SDC2 φάνηκε να μην επηρεάζει τη βασική ικανότητα των HT1080 στην προσκόλληση, εύρημα το οποίο σχετίζεται με προηγούμενη αναφορά (Park et al, 2005) και φαίνεται να είναι χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, αφού η SDC2 ενισχύει την προσκόλληση των ινοβλαστών μέσω της ιντεγκρίνης (Whiteford et al 2007, Whiteford, 2011). Αυτά τα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η SDC2 είναι άμεσος διαμεσολαβητής της προσκόλλησης των κυττάρων του ινοσαρκώματος που επάγεται από τον TGFβ2.

Εικόνα 1



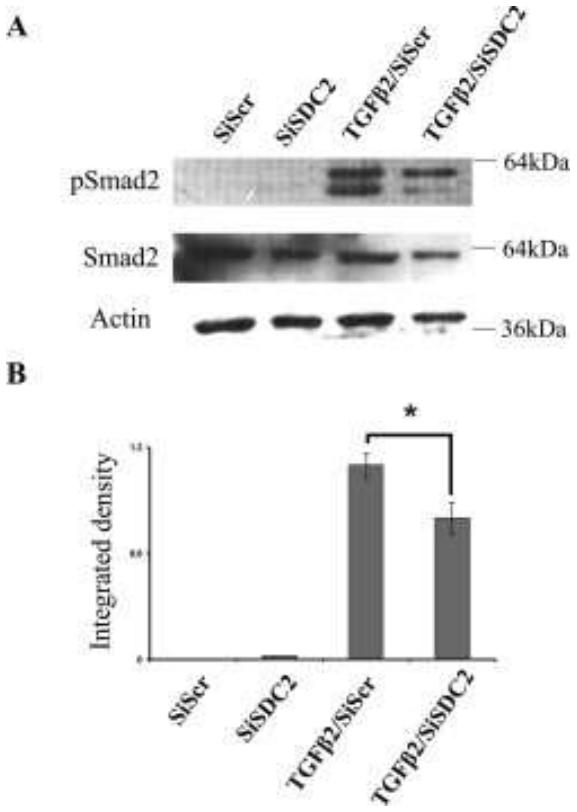
Εικόνα 1. A) Η επίδραση της SDC2 στην επαγόμενη από τον TGFβ2 προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος. Στα επιμολυσμένα με SDC2 (siSDC2) και scramble (siScr) HT1080 κύτταρα προστέθηκε TGFβ2 (10 ng/ml) για 48 h πριν συλλεχθούν και στρωθούν ξανά για 30 min σε 96-well plates επιστρωμένα με FN. Ο αριθμός των προσκολληθέντων κυττάρων καθορίστηκε με τη χρήση fluorometric CyQUANT Assay Kit (Molecular Probes). (B) Η επιμόλυνση με siRNA. Η αναστολή παραγωγής mRNA της SDC2 από τα HT1080 cells επιβεβαιώθηκε με real-time PCR, σε σύγκριση με τα αρνητικά control siScr and 0%. (C) Η εκτέλεση western blotting για την απεικόνιση της αναστολής έκφρασης της πρωτεΐνης SDC2 σε σχέση με τα control, siScr and 0%. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες της διμερούς πρωτεΐνης SDC2 (~50 kDa) καθώς και του πρωτεϊνικού κορμού της SDC2 (~22 kDa). (D) Οι πρωτεϊνικές ζώνες της SDC2 αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν ενάντια στην ακτίνη. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών

ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζονται ο μέσος όρος και το σταθερό σφάλμα (Means ± SEM); Στατιστική σημαντικότητα: **P ≤ 0.01; ***P ≤ 0.001 μεταξύ των control και των αντίστοιχων προσθηκών.

3.2 Η μεσολάβηση της SDC2 στην επαγόμενη από τον TGFβ2 ενεργοποίηση του Smad

Το Smad2 είναι ένας πολύ σημαντικός μεσολαβητής του ενδοκυττάριου σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ (Massague et al 1998). Ως εκ τούτου θεωρήσαμε ενδιαφέρον να διερευνήσουμε το ρόλο της SDC2 στη βασική και στην TGFβ2-εξαρτώμενη φωσφωρυλίωση του Smad2. Στα επιμολυσμένα με siSDC2 κύτταρα HT1080 χορηγήσαμε TGFβ2 (10 ng/ml) για 24 h. Όπως φαίνεται στην Εικ. 2, η αναμενόμενη αύξηση της φωσφορυλίωσης του Smad2 από τον TGFβ2 ανεστάλει στα ανεπαρκή σε SDC2 κύτταρα ($P \leq 0.05$), υποδηλώνοντας ότι η SDC2 συμμετέχει με αυτόν τον τρόπο στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ2 στα κύτταρα του ινοσαρκώματος. Είναι σημαντικό να παρατηρήσουμε ότι η έκφραση του ολικού Smad2 δεν άλλαξε μετά τις συγκεκριμένες προσθήκες (Εικ. 2).

Εικόνα 2



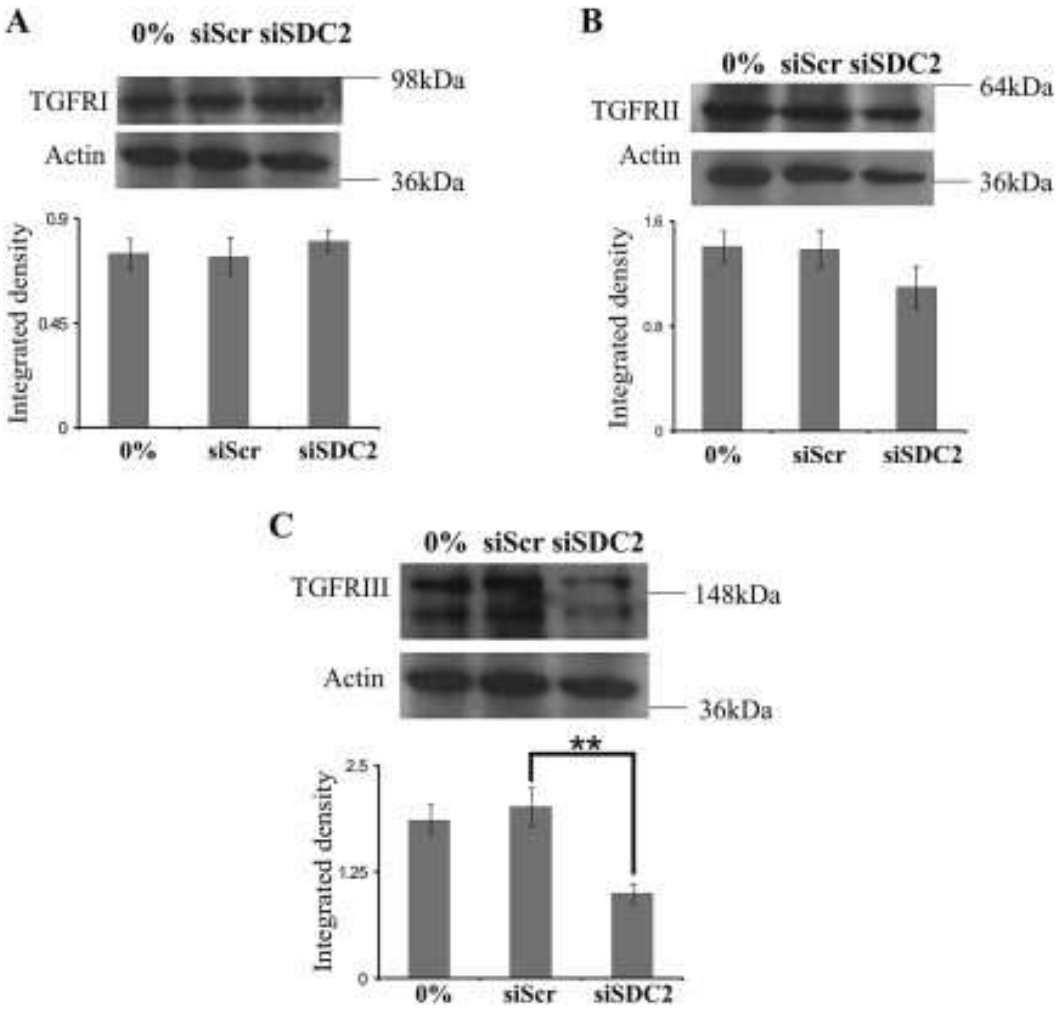
Εικόνα 2. Η επίδραση της SDC2 στην εξαρτώμενη από τον TGFβ2 ενεργοποίηση του Smad. (A) Τα επιμολυσμένα με siSDC2, siScr, siSDC2 μαζί με TGFβ2 (10 ng/ml), siScr μαζί με TGFβ2 (10 ng/ml, καθώς και με TGFβ2 (10 ng/ml) HT1080, συλλέχθησαν και σε ίσες ποσότητες πρωτεΐνης των κυτταρικών θραυσμάτων ανιχνεύθηκαν το φωσφορυλιωμένο Smad2 (pSmad2) και το ολικό Smad2 χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες. (B) Οι ειδικές πρωτεϊνικές ζώνες των pSmad2 and Smad2 αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν ανάλογα με την ακτίνη. Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων. Παρουσιάζονται οι Means ± SEM; Στατιστική σημαντικότητα: *P ≤ 0.05 μεταξύ των Control και των αντίστοιχων δειγμάτων.

3.3 Η επίδραση της SDC2 στην έκφραση/εντόπιση των υποδοχέων TGFRI, II και III

Οι παράγοντες TGFβ πραγματοποιούν τη σηματοδότησή τους στρατολογώντας τα συμπλέγματα των υποδοχέων τύπου I, II και σε κάποιες περιπτώσεις III (Massague et al, 1998). Εφόσον ο ρόλος της βηταγλυκάνης στο να παρουσιάσει τον TGFβ2 στους αντίστοιχους υποδοχείς, καθώς και στη σηματοδότησή του φαίνεται να είναι καίριος (Lopez-Casillas et al, 1993), θεωρήσαμε ενδιαφέρον να εξετάσουμε την επίδραση της αναστολής της SDC2 στην έκφραση/εντόπιση των TGFRI, II και III στα κύτταρα του ινοσαρκώματος. Χρησιμοποιώντας τη Real-time PCR δείξαμε ότι η αναστολή έκφρασης της SDC2 δεν επηρέασε σημαντικά την έκφραση των TGFRI, II και III (τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δεν συμπεριλαμβάνονται στη διατριβή). Η τεχνική Western blotting, όμως, έδειξε σημαντική μείωση στην πρωτεϊνική έκφραση του TGFRIII ($P \leq 0.01$) σε κύτταρα ελλιπή σε SDC2. Αντιθέτως, η πρωτεϊνική έκφραση των TGFRI και II δεν άλλαξε (Εικ. 3). Αυτά τα δεδομένα υποστηρίχθηκαν από μελέτες ανοσοφθορισμού, υποδεικνύοντας ότι η αναστολή της SDC2 μειώνει το ολικό σήμα του TGFRIII και ενεργοποιεί την κυτταροπλασματική κατανομή του (Εικ. 4). Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα σήματα των TGFRI και II (Εικ. 4). Στη συνέχεια μελετήσαμε την πιθανή δράση της SDC2 στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των κυττάρων του ινοσαρκώματος. Για την ανίχνευση της F-actin χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα Rhodamine-conjugated phaloidin. Η εστιακή μικροσκόπηση (Confocal miscroscopy) απέδειξε ότι τα ελλιπή σε SDC2 κύτταρα παρουσίαζαν αλλαγμένο κυτταροσκελετό,

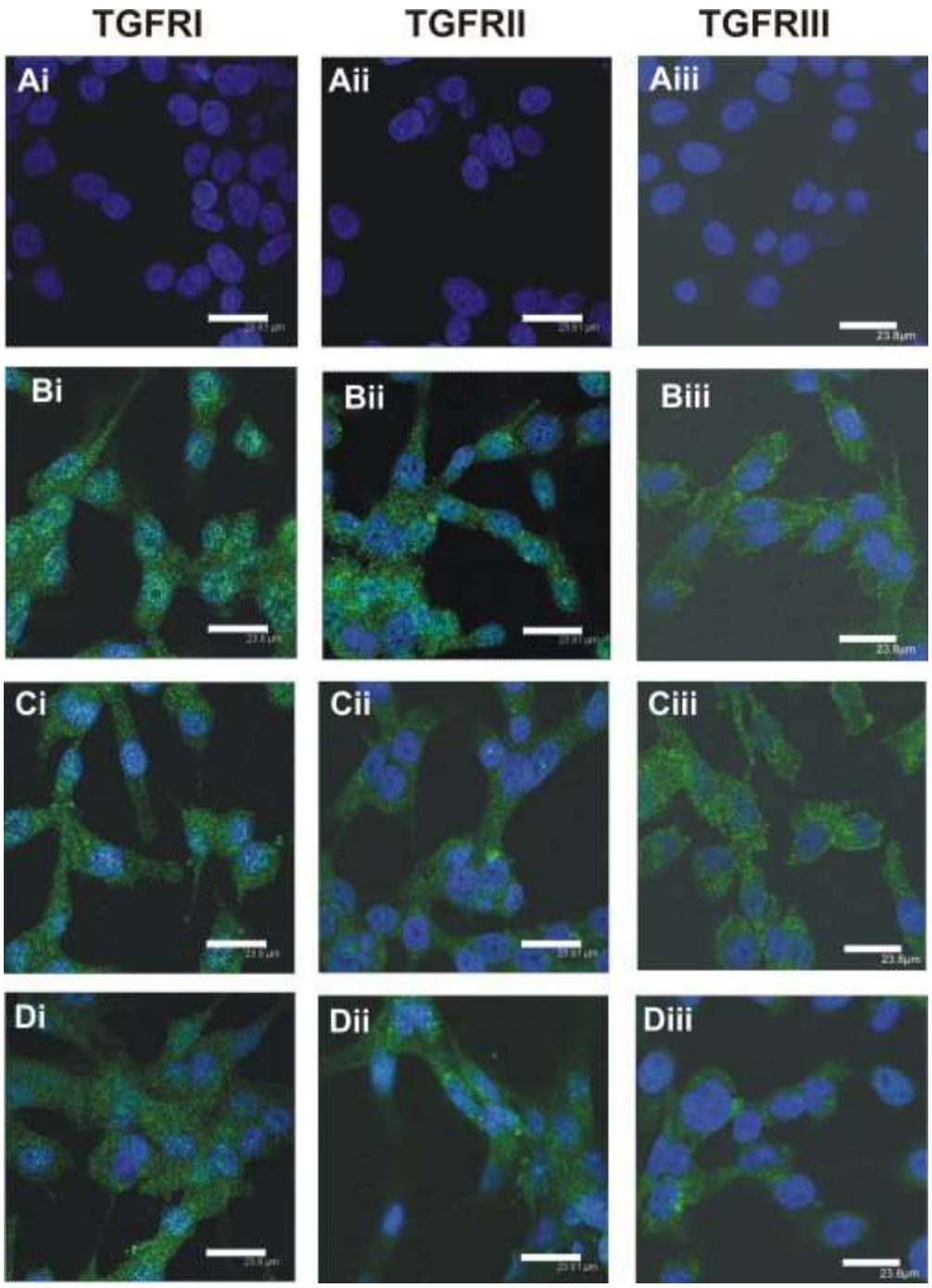
με πιο αποδιοργανωμένες ίνες ακτίνης (Εικ. 5). Οι συγκεκριμένες αλλαγές, όμως, δεν φάνηκε να σχετίζονται με διαφορές στη βασική προσκολλητική ικανότητα αυτών των κυττάρων, όπως παρουσιάστηκε πρωτύτερα, αλλά και σε παλαιότερη μελέτη (Park et al, 2005). Σε πειράματα control, στα κύτταρα που απουσίαζε η SDC2 φάνηκε να είναι αυξημένη η έκφραση της SDC4 ($P \leq 0.05$) (Supporting Information Εικ. 2), το οποίο σχετίζεται με την αμοιβαία αντισταθμιστική τους δράση (Oh et al, 2004). Λόγω του ότι η SDC4 λειτουργεί επίσης ως ένα μόριο προσκόλλησης, τα δεδομένα αυτά θα μπορούσαν να εξηγήσουν μερικώς την παρατηρηθείσα προσκολλητική ικανότητα των HT1080 κυττάρων όταν απουσιάζει η SDC2 (Oh et al, 2004). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η SDC2 ρυθμίζει τη βιοδιαθεσιμότητα του TGFRIII στα κύτταρα HT1080.

Εικόνα 3



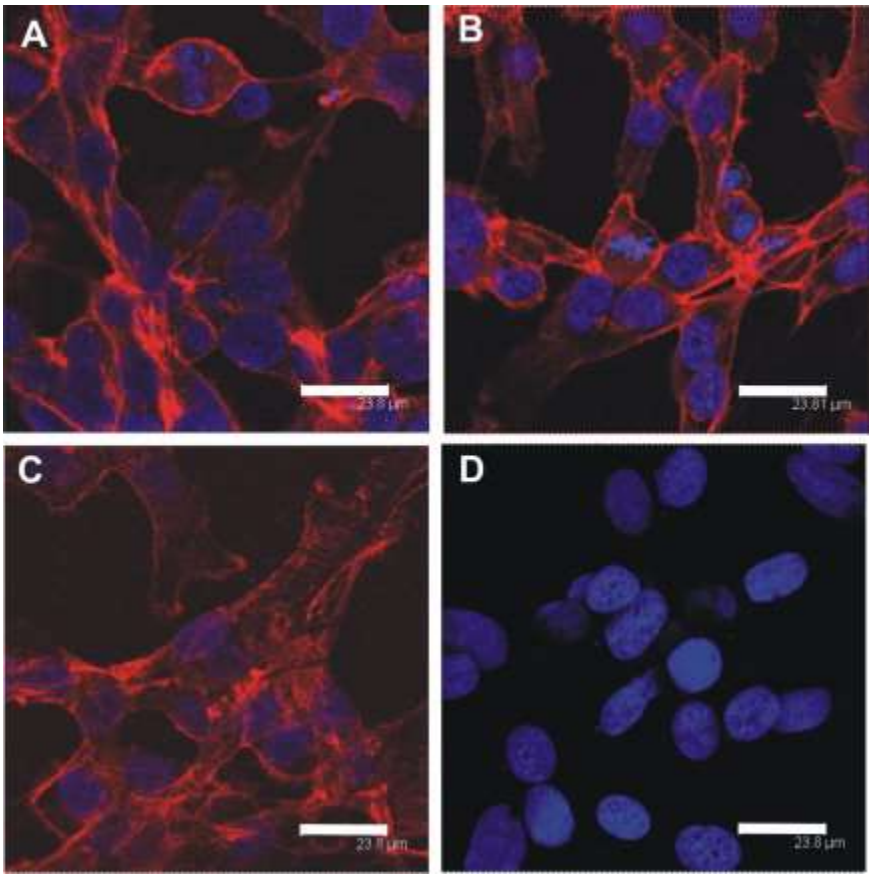
Εικόνα 3. Η επίδραση της SDC2 στην έκφραση των υποδοχέων TGFRI, II και III. Κύτταρα HT1080 με media control (0%), επιμολυσμένα με siSDC2 και με siScr συλλέχθησαν και σε ίσες ποσότητες πρωτεϊνών κυτταρικών θραυσμάτων ανιχνεύθηκαν: (A) TGFRI, (B) TGFRII, και (C) TGFRIII χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες και όλες οι ειδικές πρωτεϊνικές ζώνες αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν βάσει της ακτίνης. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων. Απεικονίζεται το Means ± SEM; Στατιστική σημαντικότητα: **P ≤ 0.01 σε σχέση με τα control.

Εικόνα 4



Εικόνα 4: Η επίδραση της SDC2 στην κατανομή του TGFRI, II και III. Τα επιμολυσμένα με siSDC2, siScr, καθώς και καλλιεργημένα σε media HT1080, στρώθηκαν σε στρογγυλές καλυπτρίδες μονιμοποιήθηκαν και στη συνέχεια επωάστηκαν με ειδικά αντισώματα για τον TGFRI (Bi–Di), TGFRII (Bii–Dii) και τον TGFRIII (Biii–Diii). Για τη χρώση των πυρήνων χρησιμοποιήθηκε το TO-PRO3. Τα σήματα των TGFRI, II, III και TO-PRO-3 επιπροβλήθηκαν. (Ai, Aii, και Aiii); Αρνητικά control; (Bi, Bii, και Biii) κύτταρα στο media; (Ci, Cii, και Ciii); κύτταρα επιμολυσμένα με siScr; (Di, Dii, και Diii); κύτταρα επιμολυσμένα με siSDC2. Οι καλυπτρίδες στα πλακάκια αναλύθηκαν με confocal μικροσκόπιο και ελήφθησαν εικόνες με μεγένθυση ×63.

Εικόνα 5

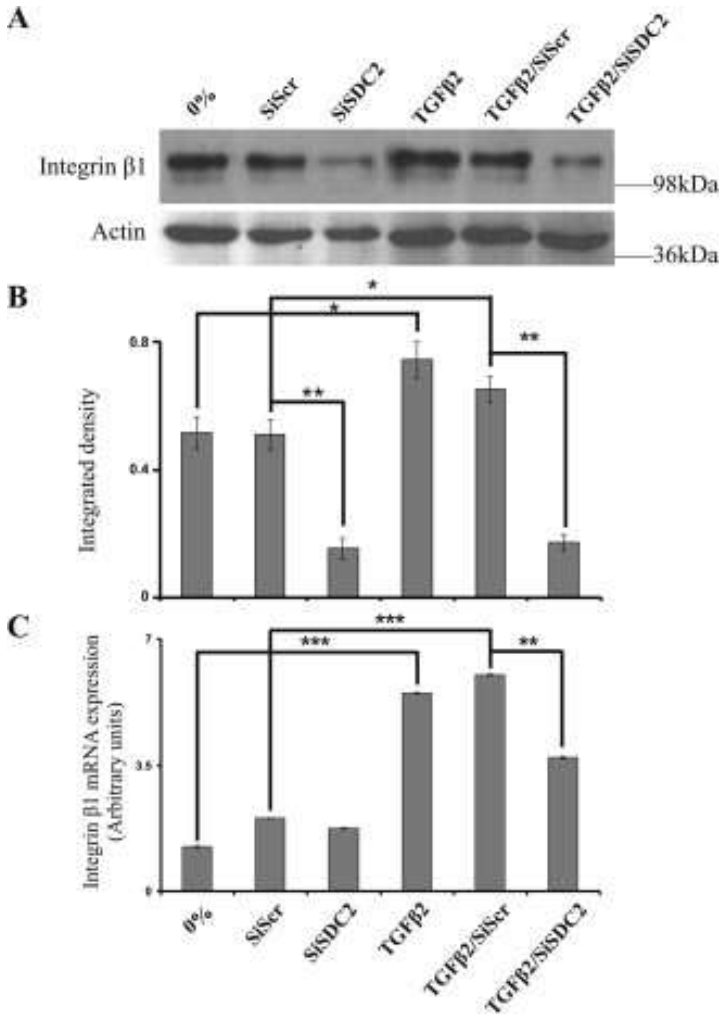


Εικόνα 5. Ο ρόλος της SDC2 στον πολυμερισμό της ακτίνης. Τα κύτταρα HT1080 (A) καλλιεργημένα σε media, (B) επιμολυσμένα με siScr και (C) με siSDC2 στρώθηκαν σε στρογγυλές καλυπτρίδες, μονιμοποιήθηκαν και επωάστηκαν σε αντίσωμα κατά της phalloidin ώστε να παρατηρηθούν τα ινίδια της ακτίνης. Για τη χρώση των πυρήνων χρησιμοποιήθηκε TO-PRO 3. Τα σήματα των ινιδίων της ακτίνης και του TO-PRO-3 επιπροβλήθηκαν. Τα πλακάκια αναλύθηκαν με το confocal μικροσκόπιο και ελήφθησαν εικόνες με μεγένθυση ×63.

3.4 Η SDC2 ρυθμίζει την επαγόμενη από τον TGFβ2 έκφραση της ιντεγκρίνης β1 και της FAK

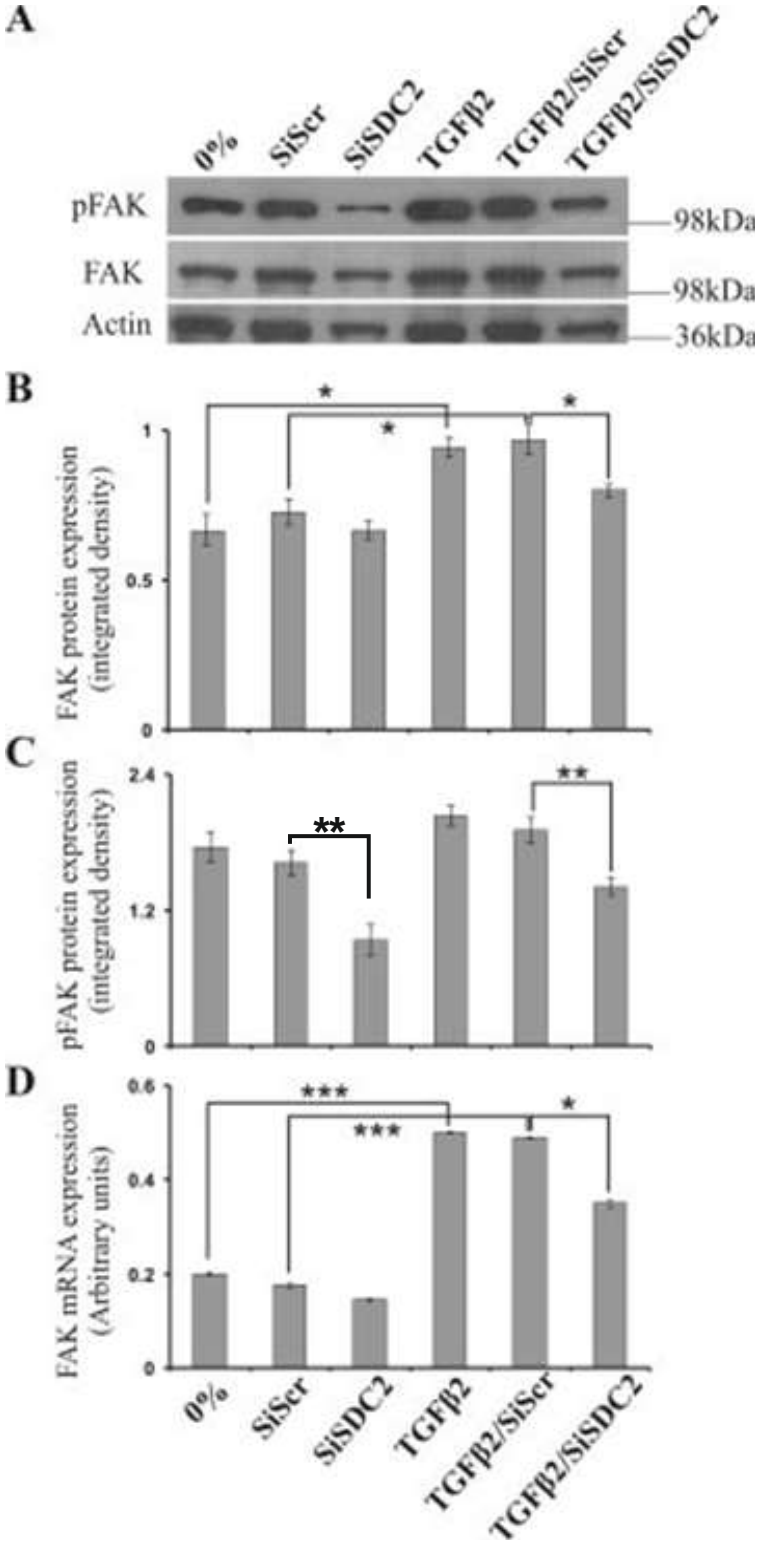
Οι ιντεγκρίνες και κυρίως η β1 φαίνεται να είναι οι υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων του ινοσαρκώματος, οι οποίοι συμμετέχουν στην προσκόλληση στη FN (Kähäri et al, 1991). Τα HT1080 κύτταρα στα οποία προστέθηκε TGFβ2 βρέθηκαν να έχουν αυξημένο πρωτεϊνικό κορμό της ιντεγκρίνης β1 (Εικ. 6A και 6B) ($P \leq 0.05$), καθώς και έκφραση του mRNA ($P \leq 0.001$) (Εικ. 6C). Αντιθέτως, τα ανεπαρκή σε SDC2 κύτταρα στα οποία προστέθηκε TGFβ2 είχαν χαμηλότερη έκφραση της ιντεγκρίνης β1 integrin τόσο σε πρωτεϊνικό ($P \leq 0.01$) όσο και σε επίπεδο mRNA ($P \leq 0.01$) σε σχέση με τα αρνητικά control siScr κύτταρα (Εικ. 6A–6C). Προσφάτως, αναφέρθηκε ότι ο TGFβ1 συμμετέχει στην έκφραση του γονιδίου της FAK μέσω ενισχυτικών και ανασταλτικών συνδετικών στοιχείων του Smad σε ένα μοντέλο επιθηλιακών κυττάρων (Walsh et al, 2009). Η FAK, ένα πολύ σημαντικό μόριο προσκόλλησης, σχετίζεται στενά με τη σηματοδότηση της ιντεγκρίνης (Hauck et al, 2002, Guan et al 2010). Στη συγκεκριμένη μελέτη, η προσθήκη TGFβ2 ενίσχυσε τη παραγωγή mRNA της FAK ($P \leq 0.001$; Εικ. 7D) καθώς και των πρωτεϊνικών επιπέδων της FAK ($P \leq 0.05$) στα κύτταρα ινοσαρκώματος (Εικ. 7A και 7B). Η καταστολή της SDC2 δεν επηρέασε τα βασικά μεταγραφικά επίπεδα της FAK αλλά ανέστειλε την εξαρτώμενη από τον TGFβ2 ρύθμιση της μεταγραφής της FAK ($P \leq 0.05$), αλλά και της μετάφρασής της ($P \leq 0.05$), καθώς και της φωσφωρυλίωση της FAK στο κατάλοιπο Tyr 397 ($P \leq 0.01$) (Εικ. 7). Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η SDC2 ρυθμίζει την επαγόμενη από τον TGFβ2 παραγωγή της ιντεγκρίνης β1 και την έκφραση της FAK μέσω του ελέγχου της εξαρτώμενης από τον TGFβ μεταγραφής του Smad στα HT1080 κύτταρα του ινοσαρκώματος.

Εικόνα 6



Εικόνα 6. Ο ρόλος της SDC2 στην ελεγχόμενη από τον TGFβ2 έκφραση της ιντεγκρίνης β1. HT1080 κύτταρα επιμολυσμένα με siSDC2 και scramble siScr έλαβαν TGFβ2 (10 ng/ml) για 24 h, συλλέχθησαν και ίσες ποσότητες πρωτεΐνης κυτταρικών θραυσμάτων επωάστηκαν με ειδικό αντίσωμα έναντι της ιντεγκρίνης β1. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες. (B) Οι ειδικές πρωτεϊνικές ζώνες της ιντεγκρίνης β1 αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν κατά τις ακτίνης. (C) Η έκφραση της ιντεγκρίνης β1 ποσοτικοποιήθηκε με τη real-time PCR. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζονται το Means ± SEM; Στατιστική σημαντικότητα *P ≤ 0.05; **P ≤ 0.01; ***P ≤ 0.001 μεταξύ των control και των αντίστοιχων προσθηκών.

Εικόνα 7



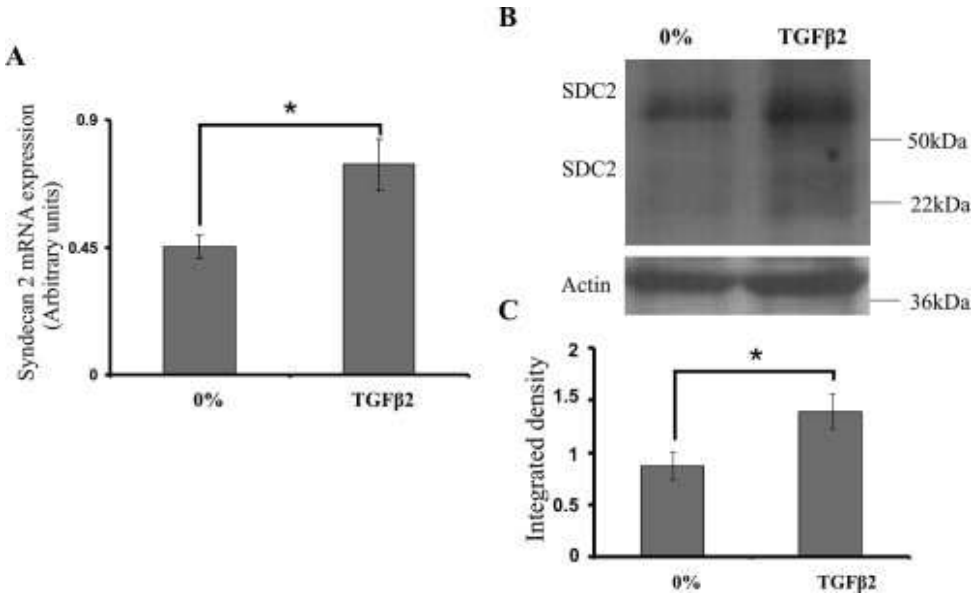
Εικόνα 7. Η επίδραση της SDC2 στη ρυθμιζόμενη από τον TGFβ2 έκφραση της FAK. (A) Σε επιμολυσμένα με siSDC2 και siScr HT1080 κύτταρα χορηγήθηκε TGFβ2 (10 ng/ml) για 24 h. Στη συνέχεια αυτά συλλέχθησαν και σε ίσες ποσότητες πρωτεϊνών κυτταρικών θραυσμάτων ανιχνεύθηκε η

φωσφωρυλιωμένη FAK (pFAK) και η ολική FAK μετά την επώαση με ειδικά αντισώματα. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες. (B) Ειδικές πρωτεϊνικές ζώνες της FAK αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν ανάλογα με την ακτίνη. (C) Επίσης, ειδικές πρωτεϊνικές ζώνες της pFAK αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν ανάλογα με την ακτίνη. (D) Η έκφραση της FAK ποσοτικοποιήθηκε με τη real-time PCR. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Απεικονίζονται ο Means ± SEM; Στατιστική σημαντικότητα *P ≤ 0.05; **P ≤ 0.01; ***P ≤ 0.001 μεταξύ των control και των αντίστοιχων δειγμάτων.

3.5 Ο ρόλος του TGFβ2 στην έκφραση της SDC2

Η Real-time PCR, καθώς και το Western blotting αποκάλυψαν ότι ο TGFβ2 αύξησε ($P \leq 0.05$) την έκφραση της SDC2 τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεϊνικό (Εικ. 8). Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν τον ενισχυτικό μηχανισμό που είναι αναπτυγμένος μεταξύ της σηματοδότησης του TGFβ2 και της έκφρασης της SDC2 στα HT1080 κύτταρα.

Εικόνα 8

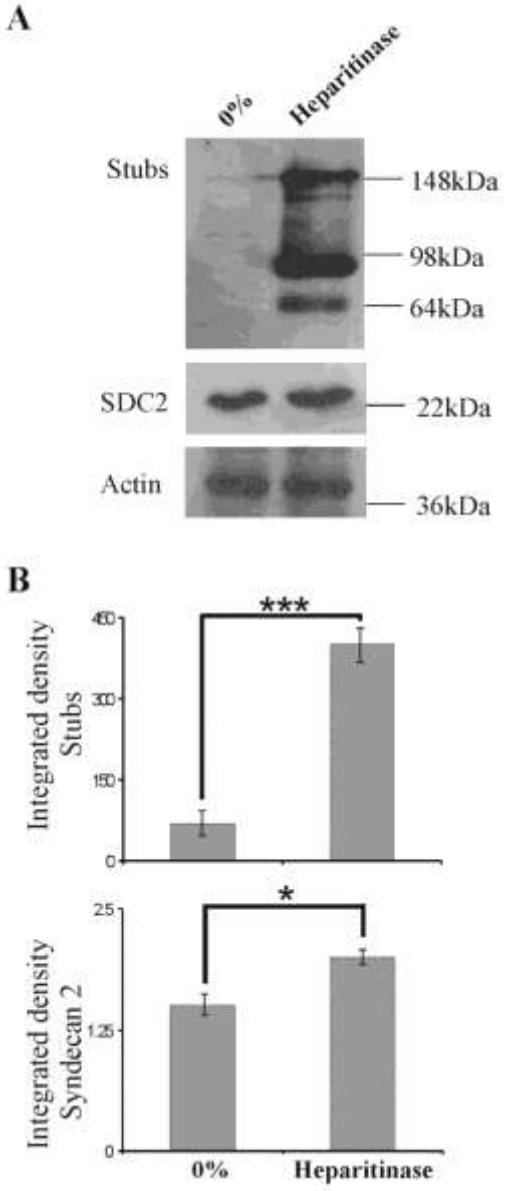


Εικόνα 8. Η δραση του TGFβ2 επί της έκφρασης της SDC2. (A) Κύτταρα HT1080 cells, στα οποία χορηγήθηκε TGFβ2 (10 ng/ml) για 24 h συλλέχθησαν και εξήχθη το mRNA τους. Η έκφραση της SDC2 ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση real-time PCR. (B) Τα κύτταρα HT1080 που έλαβαν TGFβ2 (10

ng/ml) για 48 h συλλέχθησαν και ίσες ποσότητες πρωτεΐνης κυτταρικών θραυσμάτων επωάστηκαν με ειδικό αντίσωμα έναντι της SDC2. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες της διμερούς πρωτεΐνης της SDC2 protein (~50 kDa) καθώς και του πρωτεϊνικού κορμού της (~22 kDa). (C) Οι πρωτεϊνικές ζώνες της SDC2 αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν χρησιμοποιώντας την ακτίνη. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζονται το Means ± SEM; Στατιστική σημαντικότητα *P ≤ 0.05 μεταξύ των control και των αντίστοιχων προσθηκών.

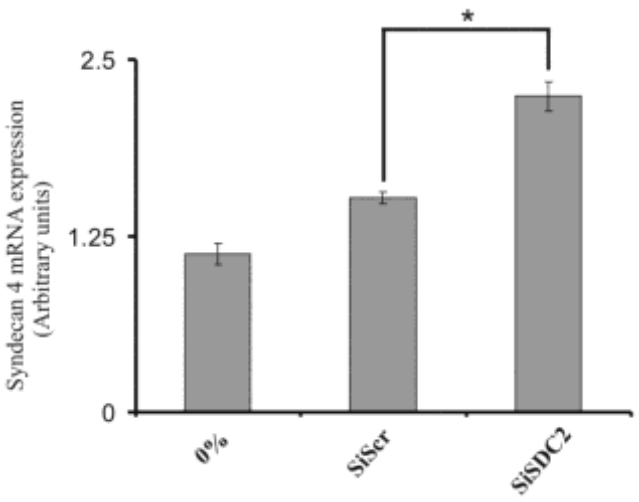
Συμπληρωματικά δεδομένα (Supporting information)

Εικόνα 1



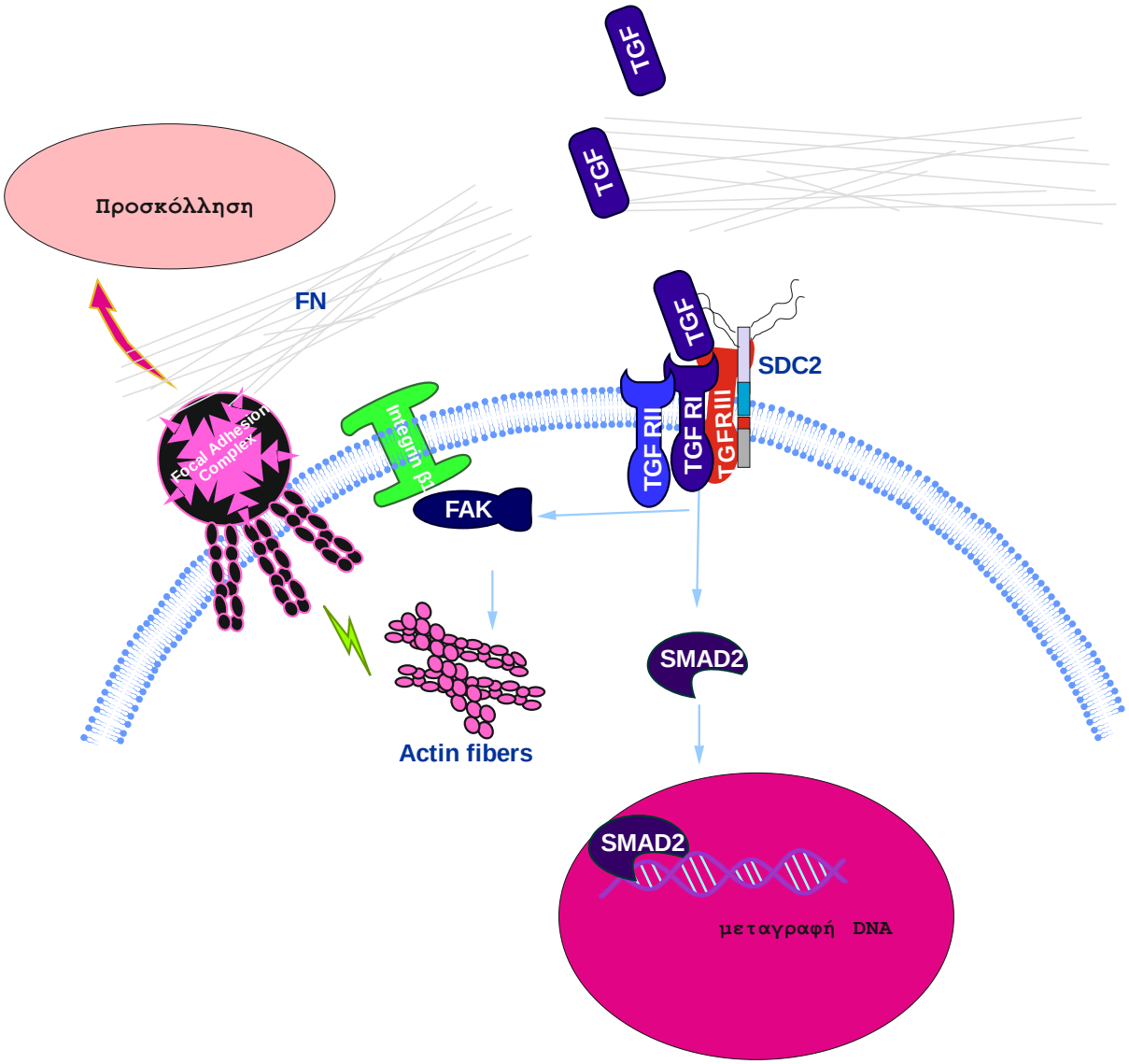
(A) Η ανίχνευση των στελεχών των HS αλυσίδων (HS stubs) μετά τη χορήγηση ηπαριτινάσης στα κύτταρα HT1080 με τη δοκιμασία western blotting. Οι αντίστοιχες ζώνες αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν ανάλογα με την ακτίνη. Απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζονται το Means ± SEM; Στατιστική σημαντικότητα *P ≤ 0.05; ***P ≤ 0.001 μεταξύ των control και των αντίστοιχων προσθηκών.

Εικόνα 2



Η έκφραση των επιπέδων mRNA της SDC4 μετά την καταστολή του γονιδίου της SDC2 στα κύτταρα HT1080 του ανθρώπινου ινοσαρκώματος. Πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση των κυττάρων HT1080 με siRNA (siSDC2), συλλογή των κυττάρων και ανάλυση των επιπέδων mRNA με τη χρήση Real-time PCR. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζονται το Means ± SEM; Στατιστική σημαντικότητα *P ≤ 0.05 μεταξύ των control και των αντίστοιχων προσθηκών.

Διαγραμματική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού (1): η συμμετοχή της SDC2 στη σηματοδότηση του TGFβ2 & στην προσκόλληση των HT1080



3.6 Συζήτηση

Είναι γνωστό ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια του TGFβ συμμετέχουν στην ογκογένεση του ινοσαρκώματος (Spearman et al, 1994, Suzuki et al, 2008, Berdiaki et al, 2008, Kwak et al, 2006, Sokol et al, 2004). Σε αυτή τη μελέτη, ο TGFβ2 παρουσιάζεται να ενισχύει σημαντικά την ικανότητα των κακοήθων HT1080 κυττάρων να προσκολλώνται στο υπόστρωμα της FN, μία λειτουργία άμεσα συνδεδεμένη με την κυτταρική διείσδυση του ινοσαρκώματος (Hu et al, 1997).

Η διαμεμβρανική πρωτεογλυκάνη θειϊκής ηπαράνης (HSPG), SDC2, έχει αναφερθεί πρωτύτερα ως συν-υποδοχέας για τον TGFβ1 στους νεφρικούς ινοβλάστες (Chen et al, 2004), ενισχύοντας την προ-σκληρυντική δράση του TGFβ1 μετά από αμφοτερόπλευρη νεφρεκτομή (Cevikbas et al, 2008). Σε αυτή τη μελέτη, η SDC2 φάνηκε να αποτελεί έναν άμεσο μεσάζοντα στην επαγόμενη από τον TGFβ2 προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος.

Ήταν πολύ ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε το ρόλο της SDC2 στην ενεργοποίηση του Smad 2, ενός κύριου διαμεσολαβητή της δράσης του TGFβ, καθώς η SDC2 φάνηκε να ενισχύει τη φωσφορυλίωσή του. Έχει αναφερθεί ότι η SDC2 λαμβάνει μέρος στο σύμπλεγμα των υποδοχέων του TGF, καθώς εντοπίζεται μαζί με τον TGFRIII και το GIPC (μια πρωτεΐνη που περιέχει την περιοχή PDZ) (Chen et al, 2004, Blobe et al, 2001). Επιπλέον, όταν υπερεκφράζεται στους ινοβλάστες, η συγκεκριμένη HSPG φαίνεται να ρυθμίζει την έκφραση των TGFRI, II, και III υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης. Συγκεκριμένα ενισχύει την παρουσίαση των TGFRI και II, και μειώνει τον TGFRIII στη μεμβράνη (Chen et al, 2004).

Εφόσον έχει παρατηρηθεί ότι τα HT1080 κύτταρα του ινοσαρκώματος εκφράζουν μεγάλες ποσότητες της SDC2 (Park et al, 2005), στοχεύσαμε σε μια στρατηγική καταστολής. Αποτελέσματα μετά τη χρήση του ανοσοφθορισμού αποκάλυψαν εντόνως μειωμένο σήμα πρωτεϊνικής έκφρασης του TGFRIII σε ελλιπή σε SDC2 κύτταρα, το οποίο επιβεβαιώθηκε με τη μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνικών επιπέδων. Οι αλλαγές αυτές δεν ακολουθήθηκαν από αλλαγές στα επίπεδα mRNA του TGFRIII. Ακόμη, τα ανεπαρκή σε SDC2 κύτταρα είχαν λιγότερο οργανωμένη ακτίνη, το οποίο έχει προηγουμένως συσχετιστεί με την παρουσίαση του TGFR στη μεμβράνη (Kusano et al, 2000).

Τα συνολικά επίπεδα των υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης ρυθμίζονται από πολλαπλές διαδικασίες, όπως τη σύνθεση, την αποκοπή, την ενδοκυττάρωση και την ανακύκλωσή τους. Πράγματι, παρατηρείται έντονη περιπλοκότητα στη ρύθμιση της έκφρασης του TGFRIII και καθώς ο TGFRIII μπορεί να προσδέσει διαφορετικά μόρια της υπερ-οικογένειας του TGFβ, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι το αντίκτυπο λειτουργίας του υποδοχέα εξαρτάται από το υπόστρωμα, αλλά και από τον κυτταρικό τύπο (Bilandzic et al, 2011; Chen et al, 2004).

Ως εκ τούτου, προτείνεται ότι η SDC2 ελέγχει την παρουσίαση του TGFRIII στη μεμβράνη στα κύτταρα του ανθρώπινου ινοσαρκώματος. Προηγουμένως, η παρουσία του TGFRIII στην κυτταρική μεμβράνη, μεταξύ άλλων φαινόταν να αυξάνει τη σύνδεση των TGFβs στους υποδοχείς τύπου II και να ενισχύει την αποτελεσματικότητα των προσδετών στις διάφορες βιολογικές διαδικασίες (López-Casillas et al, 1993, López-Casillas et al, 1994). Η συγκεκριμένη δράση ήταν πιο έντονη για τον TGFβ2, ο οποίος προσδένεται ασθενώς στον TGFRII απουσία του TGFRIII (López-Casillas et al, 1993, López-Casillas et al, 1994).

Συνεπώς, η SDC2 υποβοηθά το σχηματισμό συμπλέγματος μεταξύ του προσδέτη και του υποδοχέα, το οποίο τελικά οδηγεί σε πιο αποτελεσματική ενεργοποίηση του Smad2 και στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση στα κύτταρα του ινοσαρκώματος.

Παράλληλα, στη συγκεκριμένη μελέτη παρουσιάστηκε η SDC2 να ελέγχει την εξαρτώμενη από τον TGF μεταγραφή της FAK και της ιντεγκρίνης β1, δύο γονιδίων αμοιβαία συνδεδεμένων με την ικανότητα των κυττάρων του ινοσαρκώματος να προσκολλώνται στην FN (Walsh et al, 2009, Tsutsumi et al, 2008). Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης της FAK, η κυτταροπλασματική περιοχή της ιντεγκρίνης β1 μπορεί να αλληλεπιδράσει με την περιοχή FERM, που σχετίζεται με τη στερεοτακτική τροποποίηση της FAK, οδηγώντας στην ταχεία αυτοφωσφωρυλίωση του καταλοίπου Y397 και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, που συμμετέχουν, εκτός των άλλων και στην προσκόλληση (Guan et al, 2010).

Ο συγκεκριμένος ρυθμιστικός/μεταγραφικός ρόλος της SDC2 επιβεβαιώνει πρόσφατα δεδομένα που εμπλέκουν την SDC2 στην πρόοδο του ινοσαρκώματος. Έτσι, φάνηκε η SDC2 να ελέγχει ειδικές ογκογόνες δραστηριότητες των HT1080 κυττάρων συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής μετανάστευσης, της διείσδυσης και της απόπτωσης μέσω της διαμεσολάβησης της FAK (Park et al, 2005).

Επιπλέον, η SDC2 ήταν απαραίτητη για την εναπόθεση FN στον εξωκυττάριο χώρο στα συγκεκριμένα κύτταρα (Galante et al, 2007). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη μελέτη δείχνουμε την αύξηση της έκφρασης της SDC2 μέσω του TGFβ2, αναδεικνύοντας έναν θετικό μηχανισμό που ενεργοποιείται από τον TGFβ2.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω, παρουσιάζουμε έναν μεταγραφικό άξονα SDC2/TGFβ2/Smad2 και προτείνουμε ότι η SDC2 αποτελεί ένα μεσολαβητή κλειδί για τις λειτουργίες των κυττάρων που άγονται από τον TGFβ2, με πιθανές θεραπευτικές συνέπειες.

4. Αποτελέσματα (2):

Μηχανισμοί συμμετοχής των HS αλυσίδων στην προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος που επάγεται από τον TGFβ2

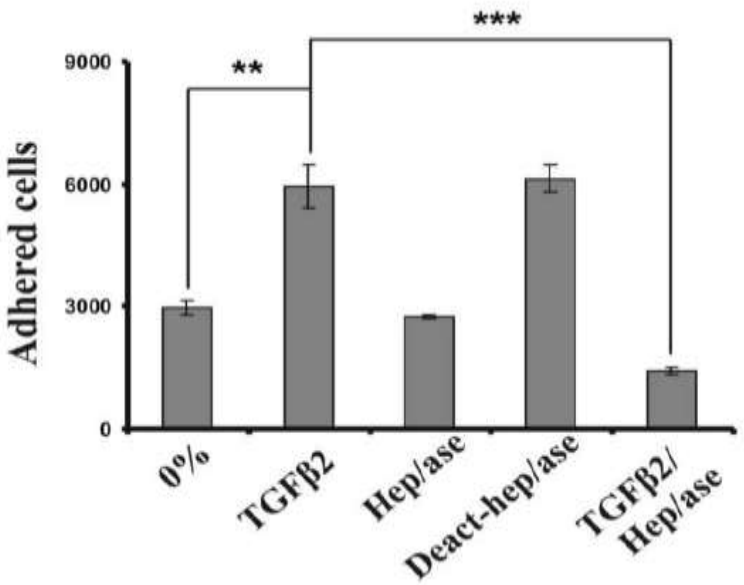
4.1 Οι HS είναι απαραίτητες για την επαγόμενη από τον TGFβ2 προσκόλληση στην FN

Για τη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε και πάλι η κυτταρική σειρά ανθρώπινου ινοσαρκώματος HT1080, προκειμένου να εξεταστεί η πιθανή επίδραση του TGFβ2 ως προς την ικανότητα προσκόλλησης των HT1080. Η συγκεκριμένη ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά, όπως αναφέρθηκε στη εισαγωγή της διατριβής, είναι άκρως μεταστατική και αποτελείται από στρογγύλα ή επιμήκη κύτταρα (Rasheed et al, 1974). Το εργαστήριό μας έχει δείξει σε προηγούμενη μελέτη (Kouvidi et al, 2011) ότι τα κύτταρα ινοσαρκώματος προσκολλώνται ειδικά στην FN. Επομένως, προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση του TGFβ2 επί της κυτταρικής προσκόλλησης των HT1080, τα κύτταρα στερήθηκαν ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε TGFβ2 για 48 ώρες. Όπως φαίνεται στην Εικ. 1 η ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων που έλαβαν TGFβ2 στην FN ήταν έντονα αυξημένη ($P \leq 0.01$) υποδεικνύοντας ότι ο TGFβ2 ενισχύει ειδικά την εξαρτώμενη από την FN προσκόλληση των κυττάρων ινοσαρκώματος.

Σε παλαιότερες μελέτες, έχει προταθεί ότι οι HS-αλυσίδες (Iwao et al, 2009) επηρεάζουν την κυτταρική κινητικότητα που σχετίζεται με τη σηματοδότηση του TGFβ. Ως εκ τούτου, θεωρήσαμε πολύ ενδιαφέρον να εκτιμήσουμε την επίδραση των αλυσίδων HS στην εξαρτώμενη από τον TGFβ2 προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος. Για την πραγματοποίηση αυτού του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε ηπαριτινάση (0.5μg/mL, Seikagaku, Japan) για την ειδική πέψη των HS, σύμφωνα

με το πρωτόκολλα του κατασκευαστή (Nikitovic et al, 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι η επίδραση του TGFβ2 επί της προσκόλλησης των κυττάρων ινοσαρκώματος αναιρέθηκε πλήρως μετά από πέψη με την ηπαριτινάση (P ≤ 0,001), επιδεικνύοντας μια άμεση συμμετοχή των HS στην προσκόλληση των HT1080 που μεσολαβείται από τον TGFβ2 (Εικ. 1). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η αποκοπή των αλυσίδων HS δεν επηρέασε τη βασική ικανότητα προσκόλλησης των HT1080 (P = NS). Προς επιβεβαίωση της ειδικότητας της ηπαριτινάσης σε πειράματα ελέγχου, προστέθηκε στα κύτταρα TGFβ2, ηπαριτινάση και απενεργοποιημένη ηπαριτινάση (με βρασμό 100°C για 15 λεπτά) για 48 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθησαν και στα κυτταρικά θραύσματα προστέθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα F69 3G10, το οποίο αναγνωρίζει ένα νεοεπίτοπο στον πρωτεϊνικό κορμό που παράγεται από την πέψη με ηπαριτινάση. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western επιβεβαίωσε ότι η προσθήκη ηπαριτινάσης δημιούργησε πρωτεϊνικούς κορμούς με στελέχη αποκομμένων HS (HS stubs), τα οποία δεν παρατηρήθηκαν όταν τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με θερμοαπενεργοποιημένη ηπαριτινάση ή μόνο τον TGFβ2 (Εικ. 2).

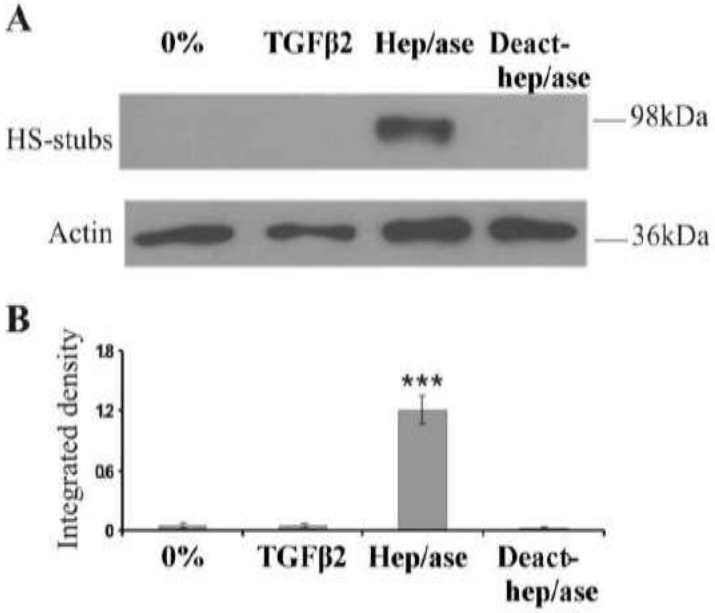
Εικόνα 1



Εικ.1. Η επίδραση της σηματοδότησης του TGFβ2 στην προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος. Στα κύτταρα HT1080 προστέθηκε TGFβ2 (10 ng/ml), ηπαριτινάση (Hep/ase) (0.5 μg/ml), θερμοαπενεργοποιημένη ηπαριτινάση (Deact-hep/ase) (0.5 μg/ml) και TGFβ2 (10 ng/ml)/heparitinase (0.5 μg/ml) (TGFβ2 / Hep/ase) για 48 h πριν τη συλλογή και το στρώσιμο ξανά (7 x 10^3 cells / well) για 30 min σε 96 well-plates με υπόστρωμα FN (5 μg/cm2). Ο αριθμός των

προσκολληθέντων κυττάρων καταγράφηκε χρησιμοποιώντας το fluorometric CyQUANT Assay Kit (Molecular Probes). Κύτταρα που επωάστηκαν σε 0% FBS χρησιμοποιήθηκαν ως control. Τα αποτελέσματα προκύπτουν από το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Απεικονίζονται επίσης, ο μέσος όρος και η σταθερή απόκλιση (Means ± SEM); Στατιστική σημαντικότητα: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ μεταξύ του control και του αντίστοιχου δείγματος.

Εικόνα 2



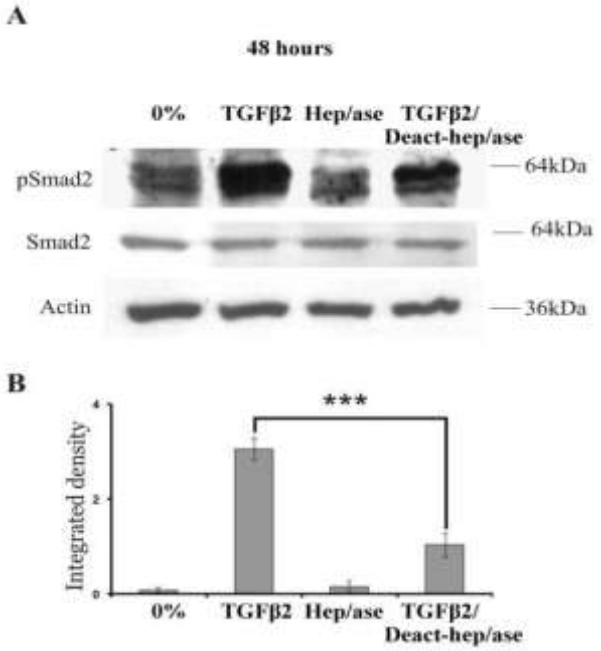
Εικ.2. Πέψη με ηπαριτινάση. (A) Τα κύτταρα HT1080 που έλαβαν TGFβ2 (10 ng/ml), ηπαριτινάση (Hep/ase) (0.5 μg/ml) και θερμοαπενεργοποιημένη ηπαριτινάση (Deact-hep/ase) (0.5 μg/ml) για 48 h συλλέχθησαν και σε ίσες ποσότητες πρωτεϊνών των κυτταρικών θραυσμάτων ανιχνεύθηκε η παρουσία ειδικών στελεχών HS στους πρωτεϊνικούς κορμούς, μετά την πέψη με ηπαριτινάση, χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα F69 3G10. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες. (B) Συγκεκριμένες πρωτεϊνικές ζώνες των στελεχών HS αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν με βάση την ακτίνη. Τα αποτελέματα αποτελούν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Απεικονίζονται ο μέσος όρος και η σταθερή απόκλιση (Means ± SEM); Στατιστική σημαντικότητα *** $p \leq 0.001$ μεταξύ των control και των αντίστοιχων δειγμάτων.

4.2 Ο ρόλος των κυτταρικών αλυσίδων HS στο μονοπάτι σηματοδότησης Smad του TGFβ2.

Οι πρωτεΐνες Smad που είναι γνωστό έως τώρα ότι ενεργοποιούνται από τον υποδοχέα του TGFβ στα κύτταρα HT1080 είναι οι Smad2/3 (Lu et al, 2010). Για αυτόν το λόγο, εξετάσαμε το ρόλο των αλυσίδων HS στα βασικά και στα εξαρτώμενα

από τον TGFβ2 επίπεδα φωσφορυλίωσης του Smad2 μετά την προσθήκη TGFβ2 (10 ng / ml), ηπαριτινάσης ή συνδυασμού των δύο στα HT1080 για 48 ώρες. Η έκφραση, καθώς και η φωσφορυλίωση του Smad2 καταγράφηκε μέσω της ανοσοαποτύπωσης κατά western, χρησιμοποιώντας ειδικά αντι-Smad2 και αντι-φωσφο-Smad2 (pSmad) πεπτίδια. Η ανάλυση κατά Western έδειξε ότι η αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης του Smad2 από τον TGFβ2 κατεστάλει σε κύτταρα τα οποία έλαβαν ηπαριτινάση ($P \leq 0.001$) (Εικ. 3A και B), αποδεικνύοντας τη συμμετοχή των αλυσίδων HS στη σηματοδότηση του TGFβ2. Η επεξεργασία με ηπαριτινάση δεν επηρέασε τα χαμηλά βασικά επίπεδα pSmad2 στα κύτταρα ινοσαρκώματος HT1080. Επιπλέον, η έκφραση της πρωτεΐνης Smad2 δεν επηρεάστηκε από οποιαδήποτε από τις προσθήκες. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν σαφώς ότι οι αλυσίδες HS συμμετέχουν και στην ενεργοποίηση και σηματοδότηση των Smad2 από τον TGFβ2.

Εικόνα 3

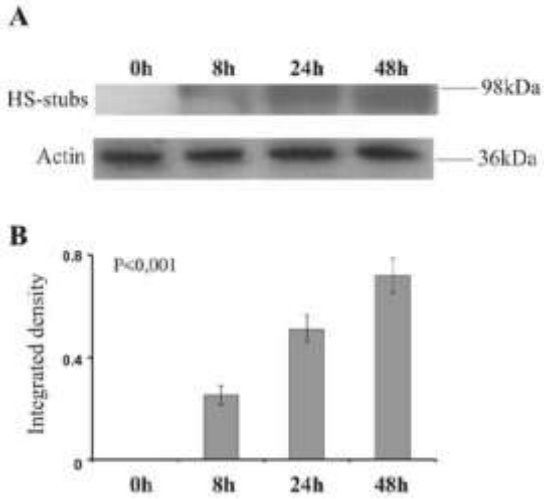


Εικ. 3. Η ηπαριτινάση καταστέλλει σημαντικά την εξαρτώμενη από τον TGFβ2 ενεργοποίηση του Smad2 στα κύτταρα του ινοσαρκώματος. (A) Τα κύτταρα HT1080 που έλαβαν TGFβ2 (10 ng/ml), ηπαριτινάση (Hep/ase) (0.5 μg/ml) και το συνδυασμό τους για 48 h συλλέχθησαν και σε ίσες ποσότητες πρωτεϊνών των κυτταρικών θραυσμάτων ανιχνεύθηκαν τα επίπεδα του φωσφωρυλιωμένου Smad2 (pSmad2) και του ολικού Smad2 (Smad2) χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες. Καταγράφονται ο μέσος όρος και η σταθερή απόκλιση (Means ± SEM); Στατιστική σημαντικότητα: ***$p \leq 0.001$ μεταξύ του control και των αντίστοιχων δειγμάτων.

4.3 Η έκφραση των κυτταρικών HS έχει αντίστροφη συσχέτιση με την ενεργοποίηση του Smad2.

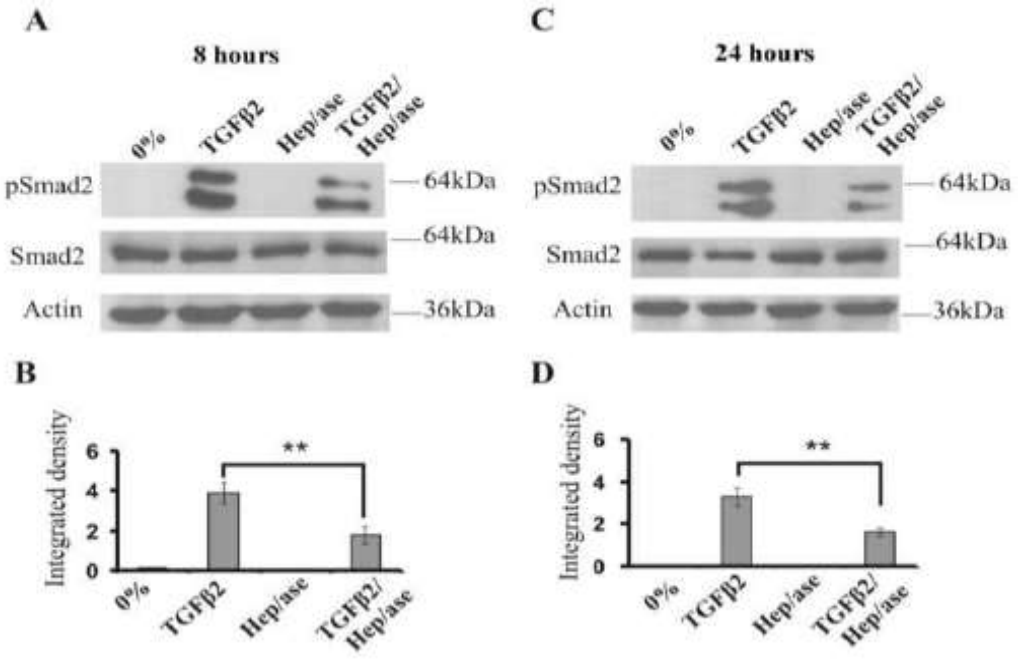
Προκειμένου να εξετάσουμε περαιτέρω τη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των HS και της TGFβ2/Smad σηματοδότησης, εκτελέσαμε αρχικά μια σειρά από πέψεις με ηπαριτινάση σε διαφορετικούς χρόνους (0, 8, 24 και 48 ώρες). Σε κάθε χρονικό σημείο, τα κύτταρα συλλέχθησαν και στη συνέχεια προστέθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα F69 3G10 έναντι συγκεκριμένων HS stubs τα οποία ήταν παρόντα στους πρωτεϊνικούς κορμούς μετά την πέψη με ηπαριτινάση. Ανοσοαποτύπωση κατά Western έδειξε μια χρονο-εξαρτώμενη αύξηση στην παραγωγή HS stubs με μέγιστη αύξηση να ανιχνεύεται 48 h μετά την πέψη με ηπαριτινάση (Εικ. 4A και B). Για να επιβεβαιώσουμε τη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των HS και της ενεργοποίησης του Smad2, τα κύτταρα ινοσαρκώματος υποβλήθηκαν σε αγωγή με TGFβ2, ηπαριτινάση ή συνδυασμό τους για 8 και 24 ώρες (Εικόνα 3 - αποτέλεσμα 48 ωρών). Σε αυτά τα χρονικά σημεία, τα κύτταρα συλλέχθησαν και στα κυτταρικά θραύσματα προστέθηκε ειδικό αντίσωμα έναντι του pSmad2. Η ανάλυση των συγκεκριμένων ζωνών πρωτεΐνης δείχνει ότι η εξαρτώμενη από τον TGFβ2 ενεργοποίηση του Smad2 αναστέλλεται κατά τρόπο ανάλογο προς τη μείωση των κυτταρικών αλυσίδων (Εικ. 5A, B, C, D). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι οι κυτταρικές HS αλυσίδες επηρεάζουν τη Smad σηματοδότηση που επάγεται από τον TGFβ2, με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση.

Εικόνα 4



Εικ. 4. Χρονοεξαρτώμενη επίδραση της πέψης με ηπαριτινάση στις HS. (A) Η χρονοεξαρτώμενη δράση της πέψης με ηπαριτινάση στην έκφραση των HS στα HT1080 κύτταρα εκτιμήθηκε προσθέτοντας στα κύτταρα ηπαριτινάση (0.5 μg/ml) στα χρονικά διαστήματα 0, 8, 24 and 48 h. Σε ίσες ποσότητες κυτταρικών θραυσμάτων προστέθηκε ειδικό αντίσωμα κατά των HS-stubs, χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα F69 3G10. (B) Οι πρωτεϊνικές ζώνες αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν με την ακτίνη. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Στατιστική σημαντικότητα: ***$p \leq 0.001$ εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας one-way ANOVA analysis για όλα τα χρονικά σημεία.

Εικόνα 5



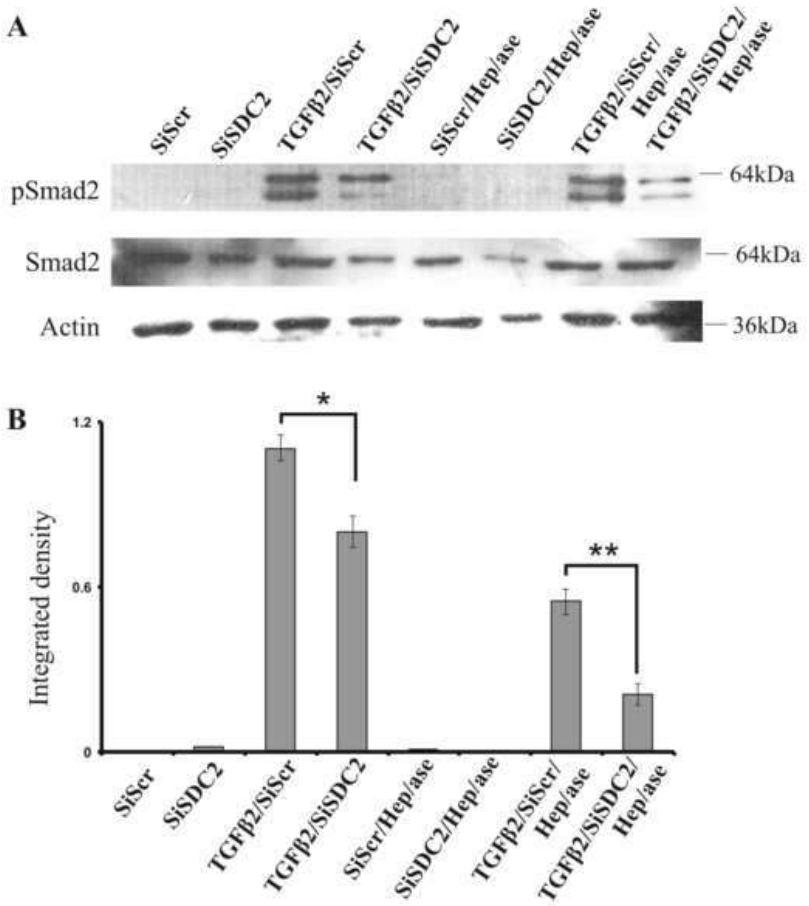
Εικ.5. Η επίδραση της ηπαριτινάσης στην εξαρτώμενη από τον TGFβ2 ενεργοποίηση του Smad2 σε διαφορετικά χρονικά σημεία. (A και C) Τα HT1080 κύτταρα έλαβαν ηπαριτινάση (Hep/ase) (0.5μg/ml), TGFβ2 (10 μg/ml) και TGFβ2 (10 μg/ml σε συνδυασμό με ηπαριτινάση (Hep/ase / TGFβ2) (0.5 μg/ml) για 8 και 24 h. Σε ίσες ποσότητες κυτταρικών θραυσμάτων προστέθηκαν ειδικά αντισώματα για τα pSmad2 και Smad2. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες. Οι πρωτεϊνικές ζώνες των pSmad2 / Smad2 αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν ανάλογα με την ακτίνη. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Απεικονίζεται ο μέσος όρος και η σταθερή απόκλιση (Means ± SEM); Στατιστική σημαντικότητα: **$p \leq 0.01$ μεταξύ του control και των αντίστοιχων δειγμάτων.

4.4 Η SDC2 και όχι η SDC4, ρυθμίζει τη σηματοδότηση του TGFβ2 μέσω Smad.

Οι αλυσίδες HS της κυτταρικής επιφάνειας είναι προσδεδεμένες στις πρωτεογλυκάνες της κυτταρικής μεμβράνης, όπως τις συνδεκάνες και τις γλυπικάνες. Σε προηγούμενες μελέτες, είχε προταθεί αρνητικός ρόλος για τις

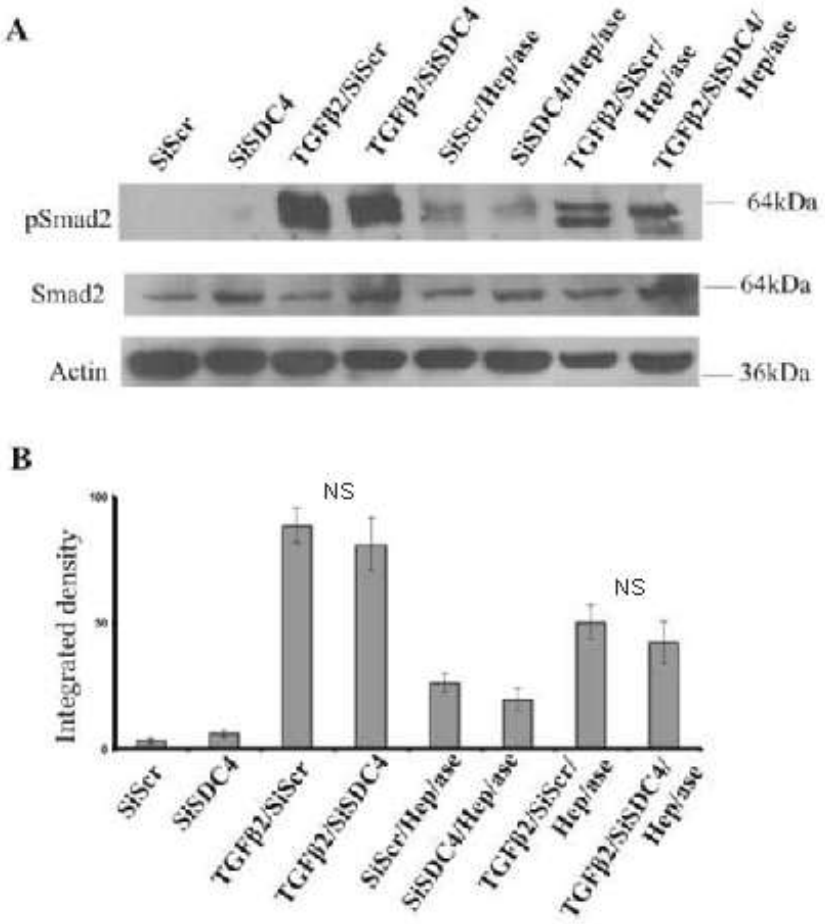
αλυσίδες HS της SDC4 (Cevikbas et al, 2008) και ενισχυτικός για τις HS και τον πρωτεϊνικό κορμό της SDC2 (Chen et al, 2004) όσον αφορά τη δράση του TGFβ. Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα δεδομένα, διερευνήσαμε την πιθανή συμμετοχή των HS στη σηματοδότηση του TGFβ στα κύτταρα HT1080. Τα κύτταρα του ινοσαρκώματος επιμολύνθηκαν με siRNA syndecan-2 (SDC2) (siSDC2), χρησιμοποιώντας την προηγουμένως δημοσιευμένη αλληλουχία siRNA (Orosco et al, 2007). Όπως φαίνεται στην Εικ. 6A, η επεξεργασία των HT1080 κυττάρων με siSDC2 ενώ είχε χορηγηθεί TGFβ2 για 48 ώρες, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης του Smad2 σε σχέση με κύτταρα που έλαβαν το αρνητικό control siScr. Παράλληλα, η προσθήκη ηπαριτινάσης στο χορηγηθέν μίγμα TGFβ2/SiScr προκάλεσε ακόμα μεγαλύτερη μείωση του Smad2, αποδεικνύοντας ότι ο TGFβ2 χρειάζεται τις αλυσίδες HS για να πραγματοποιήσει τη σηματοδότησή του με επιτυχία (Εικ. 6A). Είναι αξιοσημείωτο ότι τα ανεπαρκή σε SDC2 κύτταρα παρουσίασαν ακόμα πιο μειωμένη TGFβ2-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του Smad2 ταυτόχρονα με την πέψη τους με ηπαριτινάση, υποδηλώνοντας ότι η επίδραση της SDC2 στη σηματοδότηση του TGFβ2 δεν πραγματοποιείται μόνο μέσω των HS αλυσίδων της, αλλά και μέσω του πρωτεινικού της κορμού (Εικ. 6A). Επίσης, το γεγονός ότι η αποκοπή των HS αλυσίδων με ηπαριτινάση οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση του p-smad2 όταν χορηγείται TGFβ2 και καταστέλλεται το γονίδιο της SDC2 με siSDC2, μπορεί να υποδηλώνει ένα συνεργιστικό ρόλο μεταξύ άλλων HSPGs και της συνδεκάνης 2 για τη σηματοδότηση του TGFβ2. Γνωρίζοντας ότι η SDC4 εμπλέκεται στο σχηματισμό εστιών προσκόλλησης κυττάρου-ECM, δημιουργήσαμε κύτταρα HT1080 ελλιπή σε SDC4 (Εικ. 7A), όπως έχει προηγουμένως δημοσιευθεί (Chalkiadaki et al, 2009). Ωστόσο, η μείωση της SDC4 δεν επηρέασε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης Smad2, προτείνοντας έναν ιδαίτερο ρόλο ειδικά για τη SDC2 στην ρύθμιση της σηματοδότησης του TGFβ2 στα κύτταρα του ινοσαρκώματος (Εικ. 8). Η βασική έκφραση της πρωτεΐνης Smad2 δεν επηρεάστηκε σημαντικά από οποιαδήποτε από τις προσθήκες (Εικ. 6A και 7A).

Εικόνα 6



Εικ. 6. Η επίδραση της συνδεκάνης 2 στην TGFβ2-επαγόμενη ενεργοποίηση του Smad. (A) 48 h μετά την επιμόλυνση των HT1080 με siSDC2, siScr, siSDC2 και TGFβ2 (10ng/ml), siScr και TGFβ2 (10 ng/ml), siSDC2 και ηπαριτινάση (Hep/ase) (0,5 μg/ml), siScr και ηπαριτινάση (Hep/ase) (0,5 μg/ml), siSDC2 και ηπαριτινάση (Hep/ase) (0,5 μg/ml) και TGFβ2(10 ng/ml), siScr και ηπαριτινάση (Hep/ase) (0,5μg/ml) και TGFβ2 (10 ng/ml) τα HT1080 συλλέχθησαν και σε ίσες ποσότητες κυτταρικών θραυσμάτων ανιχνεύθηκαν η φωσφωρυλιωμένη Smad2 (pSmad2) και η ολική Smad2 χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες. (B) Ειδικές ζώνες της pSmad2 και Smad2 πρωτεΐνης αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν ενάντια στην ακτίνη. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων Απεικονίζονται και ο μέσος όρος (Means ± SEM); Στατιστική σημαντικότητα: *$p \leq 0.05$; **$p \leq 0.01$ μεταξύ του control και των αντίστοιχων δειγμάτων.

Εικόνα 7



Εικ. 7. Η επίδραση της συνδεκάνης 4 στην επαγόμενη από τον TGFβ2 ενεργοποίηση του Smad. (A) Δράσεις 48h μετά από επιμόλυνση των HT1080με : siSDC4, siScr, siSDC4 και TGFβ2 (10ng/ml), siScr και TGFβ2 (10ng/ml), siSDC4 και ηπαριτινάση (Hep/ase) (0,5 μg/ml), siScr και ηπαριτινάση (Hep/ase) (0,5 μg/ml), siSDC4 και ηπαριτινάση (Hep/ase) (0,5 μg/ml) και TGFβ2(10 ng/ml), siScr και ηπαριτινάση (Hep/ase) (0,5μg/ml) και TGFβ2 (10 ng/ml). Τα κύτταρα συλλέχθησαν και σε ίσες ποσότητες πρωτεϊνών από κυτταρικά θραύσματα ανιχνεύθησαν η φωσφωρυλιωμένη Smad2 (pSmad2) και η ολική Smad2 (Smad2), χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες. (B) Ειδικές πρωτεϊνικές ζώνες για το pSmad2 και το Smad2 αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν ως προς την ακτίνη. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Απεικονίζονται και Means ± SEM.

4.5 Συζήτηση

Σε παλαιότερη δημοσίευση της ομάδας μας, αποδείχτηκε ότι ο TGFβ2 είναι ένας από τους ενδογενείς αυξητικούς παράγοντες των HT1080 κυττάρων, ο οποίος έχει την ικανότητα μέσω μεταγραφικού ελέγχου να ελέγχει τη σύνθεση, την επέκκριση και την εναπόθεση στον περικυττάριο χώρο των σημαντικών ρυθμιστών

της προσκόλλησης/κινητικότητας, της βερσικάνης και του υαλουρονικού οξέος (HA) (Berdiaki et al, 2008).

Σε συνέχεια των προηγούμενων πειραμάτων μας που ανέδειξαν την ικανότητα του TGFβ2 να ενισχύει την έντονη προσκόλληση των HT1080 στο υπόστρωμα της FN μέσω της πρωτεογλυκάνης θειϊκής ηπαράνης, της SDC2, θεωρήσαμε ενδιαφέρον να διερευνήσουμε κατά πόσο οι δράσεις του TGFβ2 στην κυτταρική προσκόλληση σχετίζονται άμεσα με την έκφραση των αλυσίδων HS.

Η ενδεχόμενη σημασία του μεταβολισμού των HS στην πρόοδο του ινοσαρκώματος έχει προταθεί στο παρελθόν από μελέτες που συσχέτισαν τη δράση της ηπαρινάσης με την κακοήθη ανάπτυξη κυτταρικών σειρών του ινοσαρκώματος (Ricoveri et al, 1986, Snigireva et al, 2015, Snigireva et al, 2016), αλλά και από έρευνες που απέδωσαν αντι-μεταστατικό ρόλο στους αναστολείς της σύνθεσης των HS (Jeney et al, 1990). Επίσης, σε παλαιότερες μελέτες έχει παρατηρηθεί η ικανότητα των TGFβ1 (McCaffrey TA et al, 1994; Lyon et al, 1997) και TGFβ2, αλλά όχι του TGFβ3 (Iwao et al, 2009) να αλληλεπιδρούν ισχυρά με την ηπαρίνη και με τις έντονα θειωμένες αλυσίδες HS.

Οι αλληλεπιδράσεις αυτές έδειξαν ότι ο TGFβ1 μπορεί να προστατεύεται από την πρωτεολυτική αποδόμηση *in vitro* και να υποστηρίζει την ανεξάρτητη από εστίες προσκόλλησης ανάπτυξη των νεφρικών ινοβλαστών στα ποντίκια (McCaffrey et al, 1994, Lyon et al, 1997). Συν τοις άλλοις, η ικανότητα των ινοβλαστών του δέρματος να προσκολλώνται στην FN και να δημιουργούν συστολή του εξωκυττάριου χώρου, εξαρτώνταν από τον TGFβ, τον TGFRI, τη βιοσύνθεση πρωτεογλυκανών που περιλαμβάνουν HS, καθώς και τον άξονα Ras/mitogen-activated protein kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) (Chen et al, 2005).

Ο άξονας αυτός φάνηκε να ολοκληρώνεται μέσω της σηματοδότησης της συνδεκάνης 4 (Chen et al, 2005). Επιπλέον, όταν η έκφραση της 6-O-endosulfatase 1 (Sulf1) ανεστάλει στους καλλιεργημένους φυσιολογικούς ινοβλάστες του πνεύμονα, χρησιμοποιώντας ειδικό siRNA, η φωσφορυλίωση του Smad2/3 και η ολική έκφραση της Smad2 πρωτεΐνης ενισχύθηκε, με συνοδό αυξημένη έκφραση της ακτίνης της ομάδας α των λείων μυών, καθώς και της FN (Yue et al, 2008). Τα αποτελέσματα αυτά, προτείνουν ότι ειδικές αλληλουχίες των HS, επιρρεπείς στην

τροποποίηση από τη Sulf1, υποστηρίζουν τη σηματοδότηση του TGFβ στους ινοβλάστες.

Στο δικό μας πειραματικό μοντέλο κυττάρων του ινοσαρκώματος, η αποδόμηση των ενδογενών HS ανέστειλε ισχυρά την εξαρτώμενη από τον TGFβ2 φωσφορυλίωση του Smad2, επιδεικνύοντας έτσι τον αναγκαίο τους ρόλο. Είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται η άμεση συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των HS και της επαγόμενης από τον TGFβ2 ενεργοποίηση του Smad. Επομένως, φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα ότι οι HS υποστηρίζουν το ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ2, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την εξαρτώμενη από τον TGFβ2 προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος .

5. Αποτελέσματα (3):

Η διαμεσολάβηση της συνδεκάνης 2 στην επαγόμενη από τον IGF-I μετανάστευση των κυττάρων του ινοσαρκώματος HT1080, μέσω της σηματοδότησης των ERK/ezrin.

Όπως προαναφέρθηκε, το ινοσάρκωμα, ένας όγκος μεσεγχυματικής προέλευσης, ταξινομείται πλέον ως αρκετά σπάνιος, λαμβάνοντας υπόψιν τα τελευταία δεδομένα στην ιστοπαθολογική κατηγοριοποίηση (Bahrami et al, 2010, Franchi et al, 2013). Η σχετικά χαμηλή συχνότητα εμφάνισής του δυστυχώς περιορίζει το επιστημονικό ενδιαφέρον ως προς τη στοχευμένη θεραπεία του, κρίνοντας από τις δημοσιευμένες έως τώρα μελέτες. Παρά τη σπανιότητα του όμως, το ινοσάρκωμα ενηλίκων εμφανίζει πολύ πτωχή πρόγνωση (Papagelopoulos et al, 2002, Wadhwan et al, 2010), υποδεικνύοντας την ανάγκη δημιουργίας νέων θεραπειών.

Παράλληλα, η συμμετοχή αυξητικών παραγόντων στην εξέλιξη του ινοσαρκώματος είναι καλά καταγεγραμμένη (Fiorelli et al, 2011; Fthenou et al, 2006; Hwang et al, 2011; Nikitovic et al, 2013). Παρά ταύτα, μόνο λίγα από τα πολύπλοκα κυτταρικά μονοπάτια, μέσω των οποίων οι αυξητικοί παράγοντες επηρεάζουν το ινοσάρκωμα, έχουν καταγραφεί έως τώρα. Έτσι, στη συγκεκριμένη μελέτη

ερευνήθηκαν οι διαμεσολαβητές των ενδοκυττάριων σημάτων που εμπλέκονται στην κινητικότητα των κυττάρων και τελικά στη μεταστατική δράση του ινοσαρκώματος.

Ο IGF-I είναι ένας καλά μελετημένος αναβολικός αυξητικός παράγοντας (Nielsen et al, 2014). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι εκτός των γνωστών ρόλων που ορίζονται από την αυξητική ορμόνη (GH), μέσω της ηπατικής οδού ή διαφορετικής ιστικής παραγωγής, ο IGF-I εμφανίζει επίσης ανεξάρτητες της GH δράσεις σε συγκεκριμένους ιστούς στόχους (Hull et al, 2014). Παράλληλα, εκτός της μείζονος φυσιολογικής δράσης του στην ανάπτυξη, επιδεικνύει σημαντικό έργο και στην εξέλιξη του καρκίνου (Brahmkhatri et al, 2015). Έτσι, άτομα με υψηλά επίπεδα IGF-I, είτε άτομα με μεγαλακρία ή διαβητικοί ασθενείς τύπου 2, εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης συγκεκριμένων τύπων καρκίνου. Αντιθέτως, ασθενείς με έλλειψη IGF-I, όπως περιπτώσεις με σύνδρομο Laron (συγγενής έλλειψη IGF-I και αντίσταση στη δράση της GH) καθώς και ασθενείς με συγγενή, μεμονωμένη έλλειψη GH εμφανίζουν λιγότερες περιπτώσεις καρκίνου σε σχέση με τους υγιείς συγγενείς τους (Gallagher et al, 2011). Πλέον υπάρχουν αρκετές μελέτες για τις δράσεις του IGF-I στον καρκίνο (Gallagher et al, 2011, Maki et al, 2010).

Όντως, στο κυτταρικό επίπεδο φαίνεται ο IGF-I να ενισχύει την ογκογένεση, αναστέλλοντας την απόπτωση και προωθώντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, καθώς και την αγγειογένεση (Balamuth et al, 2002, Furstenberger et al, 2002, LeRoith et al, 2003, Samani et al, 2007). Ειδικότερα, αρκετές μελέτες αποδεικνύουν το ρόλο του IGF-I στη μετάσταση του καρκίνου (Peplow et al, 2013, Sekyi-Otu et al, 1994, Zhou et al, 2015, Zielinska et al, 2015). Οι δράσεις του IGF-I διαμεσολαβούνται κυρίως από τον IGF-IR και η βιοδιαθεσιμότητά του εξαρτάται από τις αντίστοιχες δεσμευτικές πρωτεΐνες IGFBPs. Έως τώρα, 6 τύποι IGFBPs έχουν αναγνωριστεί, με την IGFBP-3 να παρουσιάζεται με τη μεγαλύτερη συχνότητα (Bieghs et al, 2016, Brahmkhatri et al, 2015, Furstenberger et al, 2002).

Με την ενεργοποίηση του IGF-IR, πυροδοτούνται καίρια ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των MAPK και PI3K (Armakolas et al, 2016; Balamuth et al, 2002; LeRoith et al, 2003). Τα συγκεκριμένα μονοπάτια είναι γνωστά για τη συμμετοχή τους στην εξέλιξη του καρκίνου, όπως στην περίπτωση του ERK1/2 (Nam et al, 2013; Wang et al, 2012; Williams et al, 2011).

Έτσι, η καταστολή του IGF-IR καταστέλλει την EMT μετάβαση, μία διαδικασία απαραίτητη για τις διηθητικές ιδιότητες του όγκου, μέσω αναστολής των μονοπατιών PI3K/AKT, MEK/ERK και JAK/STAT (Subramani et al, 2014). Επιπλέον, φαίνεται ο IGF-IR να αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς EGFR και των οιστρογόνων (ERs) κατά την ογκογένεση (Skandalis et al, 2014; Voudouri et al, 2016).

Ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο IGF-I έχει σημαντική επίδραση σε επιθηλιακούς και μεσεγχυματικούς όγκους (Kolb et al, 2009; LeRoith et al; 2003, Maki et al, 2010; Samani et al, 2007). Συγκεκριμένα, η επίδραση του IGF-I σε όγκους μεσεγχυματικής προέλευσης έχει τονιστεί σε μία μελέτη με πειραματόζωα, όπου φάνηκε ότι η ενίσχυση του άξονα GH/IGF-I οδηγεί σε μετάσταση του ινοσαρκώματος σε αρουραίους (Sekyi-Otu et al, 1994). Οι μελέτες αυτές ανέδειξαν τους ανταγωνιστές των IGF/IGF-IR ως πιθανούς στόχους. Όντως, η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά του IGF-IR στις περιπτώσεις του οστεοσαρκώματος, ραβδομυοσαρκώματος και ειδικά στο σάρκωμα Ewing, έχει επιφέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα (Olmos et al, 2010; Scotlandi et al, 2005).

Οι συνδεκάνες αποτελούν μία οικογένεια τεσσάρων διαμεμβρανικών πρωτεογλυκανών θειϊκής ηπαράνης, η οποία επιδεικνύει πληθώρα ρόλων όσον αφορά τη σηματοδότηση εντός και εκτός του κυττάρου. Η συγκεκριμένη σηματοδότηση μπορεί να επηρεάσει βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως την προσκόλληση των κυττάρων στον ECM και την κινητικότητά τους (Afratis et al, 2017; Gopal et al, 2016; Vuoriluoto et al, 2008; Wang et al, 2011).

Η SDC2 βρίσκεται σε αφθονία στα μεσεγχυματικά κύτταρα, όπου φαίνεται να ρυθμίζει την κυτταρική κινητικότητα (Orosco et al, 2007; Park et al, 2005; Whiteford et al, 2007). Υπερέκφραση της SDC2 στα κύτταρα HT1080 του ανθρώπινου ινοσαρκώματος μπορεί να ρυθμίσει τη μετανάστευση των συγκεκριμένων κυττάρων μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού FAK/PI3K/rac (Park et al, 2005). Επιπλέον, η SDC1 φαίνεται να ενεργοποιεί τον IGF-IR μέσω της SDC2 στα κύτταρα του ινοσαρκώματος (Peterfia et al, 2012).

Με βάση τα παραπάνω, στη συγκεκριμένη μελέτη διερευνήθηκε η πιθανή σχέση μεταξύ της SDC2 και της σηματοδότησης του IGF-I στη ρύθμιση της κινητικότητας των HT1080. Τα πρωτότυπα αποτελέσματα της δημοσίευσης αυτής

δείχνουν ότι ο IGF-I/IGF-IR αναδιαμορφώνει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω του μονοπατιού SDC2/ezrin/ERK, με τελική επίδραση στην κυτταρική μετανάστευση των HT1080.

5.1 Ο IGF-I ρυθμίζει τη μεταναστευτική ικανότητα των HT1080 μέσω της SDC2.

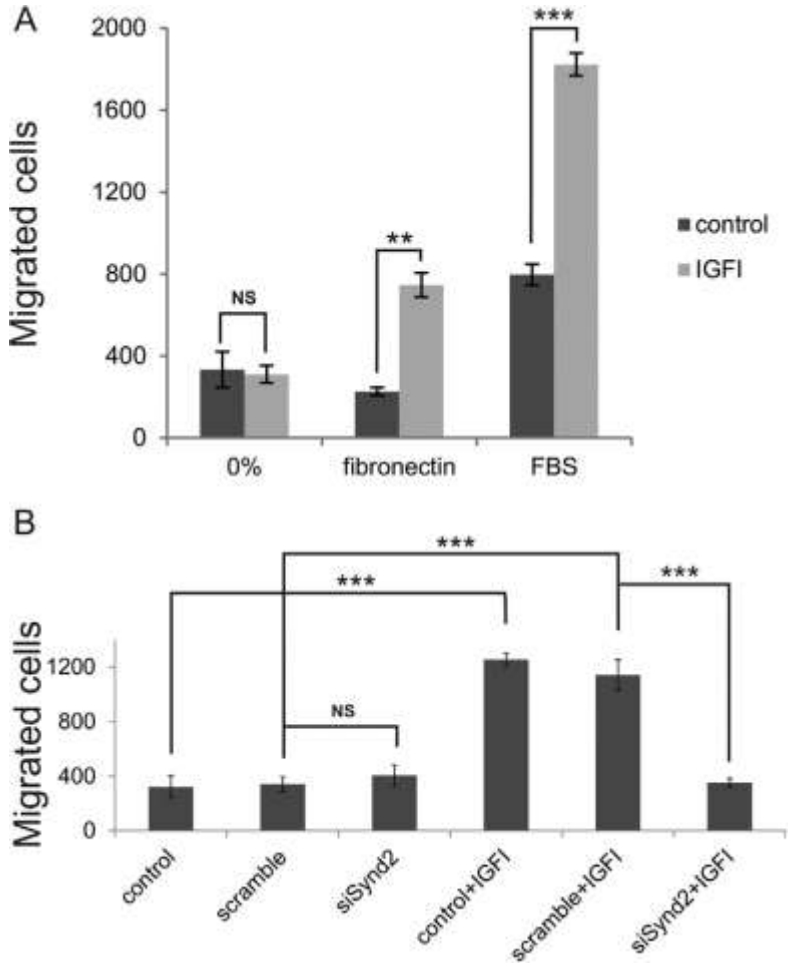
Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η χημειοτακτική μετανάστευση των κυττάρων HT1080, μία πτωχά διαφοροποιημένη και έντονα επιθετική σειρά ανθρώπινου ινοσαρκώματος (Rasheed et al, 1974) προς την ινονεκτίνη (FN), καθώς και εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS), χρησιμοποιώντας DMEM 0% ως control. Τα HT1080 κύτταρα έδειξαν ενισχυμένη μετανάστευση προς την FN και FBS (Εικ.1A). Η προσθήκη IGF-I (5ng/ml) για 24h στα κύτταρα αύξησε περαιτέρω τη χημειοτακτική τους μετανάστευση προς FN και FBS ($p<0.01$ και $p<0.001$), σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα έλεγχου (Εικ.1A). Λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης FN στον ECM του ινοσαρκώματος χρησιμοποιήσαμε FN ως χημειοτακτικό παράγοντα σε όλα τα επόμενα πειράματα. Η SDC2, που όπως προαναφέρθηκε, αφθονεί στα μεσεγχυματικά κύτταρα, έχει βρεθεί πρωτύτερα να επηρεάζει τη μετανάστευση των HT1080 (Park et al, 2005) σε συνεργασία με τη SDC1 (Peterfia et al, 2012). Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της SDC2 στην επαγόμενη από τον IGF-I μετανάστευση των HT1080, καταστείλαμε την έκφραση του γονιδίου της SDC2 χρησιμοποιώντας την τεχνολογία επιμόλυνσης με siRNA, επιτυγχάνοντας έτσι ικανοποιητικά αποτελέσματα, όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικ.1B, η SDC2 είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση μέσω του IGF-I, εφόσον κύτταρα ελλιπή σε SDC2 που υφίστανται την προσθήκη του IGF-I έδειξαν σημαντικά ελαττωμένη ικανότητα να μεταναστεύσουν σε σχέση με τα siScramble (siScr) κύτταρα έλεγχου ($p<0.001$). Παράλληλα, οι επιδράσεις της σηματοδότησης IGF-I/SDC2 εξετάστηκαν στα κύτταρα B6FS του ινοσαρκώματος. Η SDC2 φάνηκε να μην επηρεάζει την κινητικότητα των συγκεκριμένων κυττάρων, αφού η καταστολή έκφρασης της SDC2 ($p<0.001$) δεν άλλαξε τη μετανάστευση των κυττάρων σε σχέση με τα siScr κύτταρα έλεγχου (p=NS) (συμπληρωματικές Εικ.1A, B και C). Η προσθήκη IGF-I (5ng/ml) για 24h δεν

επηρέασε την ικανότητα χημειοτακτικής μετανάστευσης των B6FS προς την FN (p=NS) (Συμπληρωματική Εικ. 1C). Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά, στη συνέχεια εστιάσαμε στο μηχανισμό δράσης του IGF-I/SDC2 στα κύτταρα HT1080.

Σε μια προσπάθεια να ερευνήσουμε πιθανές σχέσεις και μονοπάτια στα κύτταρα που προστέθηκε IGF-I, και λαμβάνοντας υπόψιν τον προτεινόμενο ρόλο της SDC2 στην εξαρτώμενη από τη SDC1 μετανάστευση (Peterfia et al, 2012), εξετάσαμε την πιθανότητα της συνεντόπισης της SDC2 και του IGF-IR στα HT1080. Γι'αυτό το σκοπό χρησιμοποιήσαμε ειδικό αντίσωμα ανοσοκατακρήμνισης για τον IGF-IR, ενώ, επωάσαμε το σύμπλοκο με αντίσωμα anti-SDC2. Όπως φαίνεται στην Εικ.2A και B, η SDC2 βρέθηκε να συνεντοπίζεται μαζί με τον IGF-IR και αυτή η σχέση ενισχύθηκε από τη δράση του IGF-I ($p<0.05$). Η χορήγηση IGF-I μείωσε τα επίπεδα mRNA του IGF-IR, δεν επηρέασε τα επίπεδα σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ενώ ενισχύθηκε η φωσφωρυλίωση του IGF-IR (Συμπληρωματικές Εικ.2A, B και C).

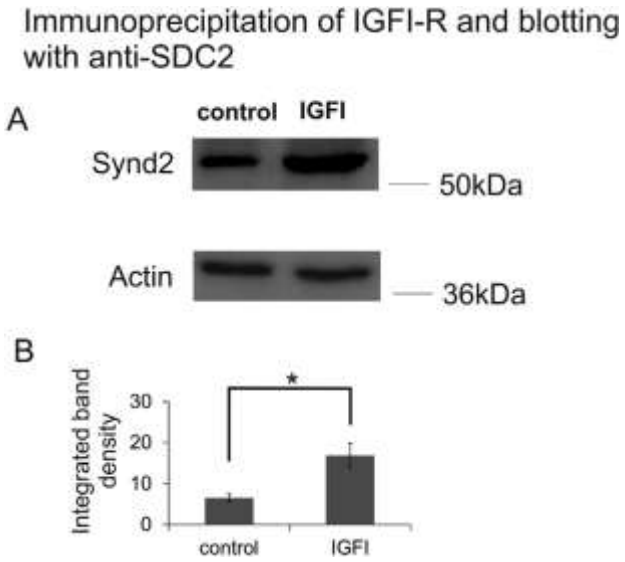
Εικόνα 1



Εικ. 1: Η επίδραση του IGF-I στη μετανάστευση των κυττάρων του ανθρώπινου ινοσαρκώματος HT1080 με τη διαμεσολάβηση της SDC2. (A): Στα κύτταρα HT1080 προστέθηκε είτε DMEM 0%, ή IGF-I (5 ng/ml) για 24h πριν τη συλλογή και το στρώσιμο ξανά $50x10^3$ κυττάρων στους ανώτερους θαλάμους 24-well plate inserts με 400 μlDMEM 0%. Ο κατώτερος θάλαμος υπέστη επίστρωση είτε με 500μl DMEM 0%, 500μl DMEM 0% και 5μl FN, ή με 500μl DMEM 0% και FBS. Τα κύτταρα στη συνέχεια επωάστηκαν στους 37°C για 4h και αφέθηκαν να διαπεράσουν τους πόρους των inserts, με κατεύθυνση προς τον αντίστοιχο χημειοτακτικό παράγοντα. Τα μεταναστεύοντα κύτταρα που πέρασαν στον κατώτερο θάλαμο, συλλέχθησαν μετά από 1 min θεραπεία με 100 μl trypsin και φυλάχθησαν στους -70°C για 24h. Ο αριθμός των κυττάρων που πέρασαν με επιτυχία, καταγράφηκε με τη χρήση fluorometric CyQUANT Assay Kit (MolecularProbes). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζονται η μέση τιμή και η σταθερή απόκλιση του μέσου (Means±S.E.M); Στατιστική σημαντικότητα: NS> 0.05, **$p \leq 0.01$, ***$p \leq 0.001$ μεταξύ των control και των αντίστοιχων προσθηκών.

(B): Η SDC2 είναι απαραίτητη για την ενίσχυση της μετανάστευσης των κυττάρων του ανθρώπινου ινοσαρκώματος μέσω του IGF-I. Τα κύτταρα HT1080 καλλιεργήθηκαν είτε σε media, είτε επιμολύνθηκαν με siRNA κατά της συνδεκάνης 2 (siSDC2), ή scramble RNA (siScr) ή παράλληλα με media και IGF-I (5 ng/ml), siSDC2 και IGF-I (5 ng/ml) ή siScr και IGF-I (5 ng/ml) για 24 h πριν συλλεχθούν και στρωθούν ξανά στους ανώτερους θαλάμους 24-well plate inserts. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 4h σε 37°C και αφέθηκαν να μεταναστεύσουν προς την κατεύθυνση της ινονεκτίνης στον κατώτερο θάλαμο των 24-well πιάτων, μέσω των πόρων των inserts. Η Fluorometric CyQUANT Assay Kit (MolecularProbes) χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί ο αριθμός των κυττάρων που μετανάστευσαν. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων εις τριπλούν. Απεικονίζεται ο Means±S.E.M.; Στατιστική σημαντικότητα: NS> 0.05, ***$p \leq 0.001$ μεταξύ των control και των αντίστοιχων δειγμάτων.

Εικόνα 2



Εικ.2: Η SDC2 συνεντοπίζεται στο κύτταρο μαζί με τον IGF-IR. Τα κύτταρα HT1080 καλλιεργήθηκαν σε DMEM 0%, ή σε DMEM 0% με την προσθήκη IGF-I (5 ng/ml) για 24 h. Στη συνέχεια συλλέχθησαν και ίσες ποσότητες πρωτεΐνης επωάστηκαν σε ειδικό αντίσωμα για τον IGF-IR ολονυχτίως στους 4°C, στη φυγόκεντρο. Τα ιζήματα στη συνέχεια, επωάστηκαν σε αντίσωμα για τη SDC2 και οι πρωτεϊνικές ζώνες αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν ανάλογα με την ακτίνη, καθώς και την ολική ποσότητα της πρωτεΐνης SDC2. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζεται ο Means±SEM; Στατιστική σημαντικότητα: *$p \leq 0.05$, μεταξύ των control και των αντίστοιχων προσθηκών.

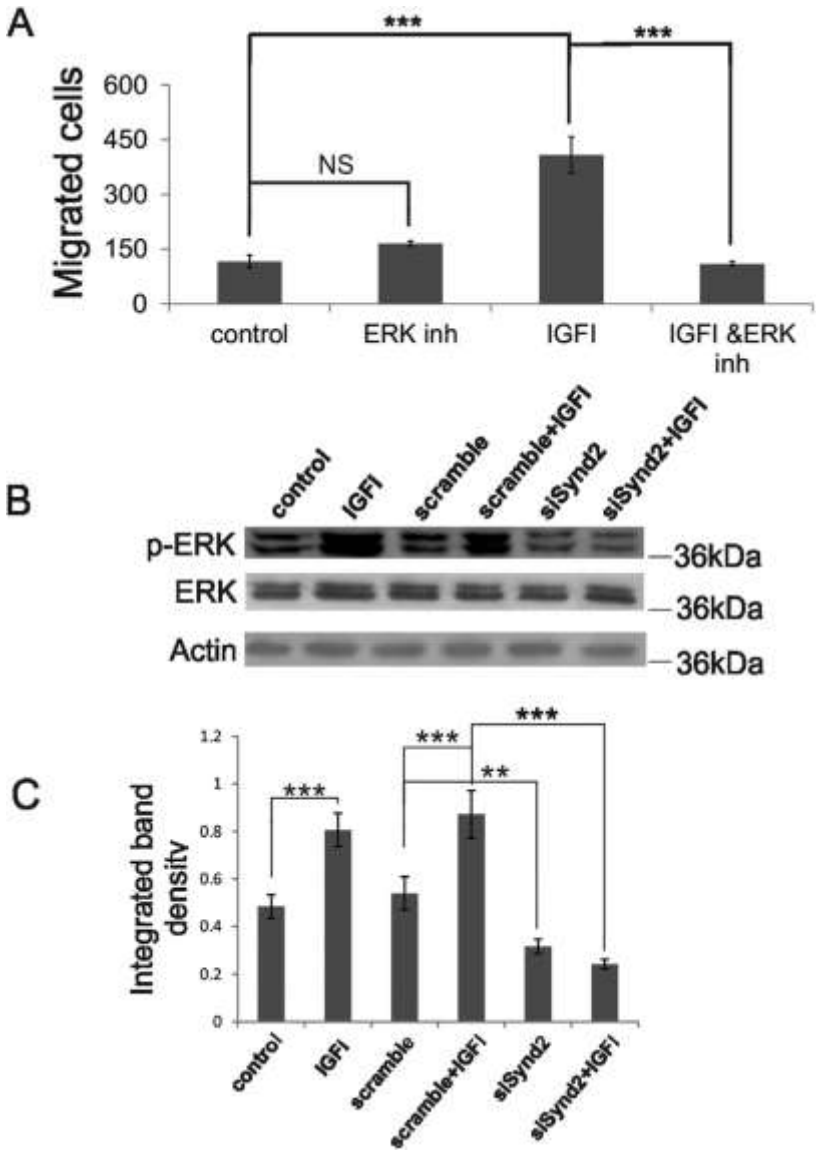
5.2 Η SDC2 καθορίζει την ενεργοποίηση του ERK1/2 από τον IGF-I.

Προκειμένου να διερευνήσουμε και άλλους μηχανισμούς σηματοδότησης του IGF-I για την κυτταρική μετανάστευση στα HT1080, θεωρήσαμε ενδιαφέρον να εξετάσουμε την κινάση ERK1/2 (Extracellular signal Regulated Kinases1/2). Η συγκεκριμένη κινάση έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητη για τον IGF-I, τόσο για την έκφραση πρωτεϊνών, τη διαφοροποίηση, τη μετατροπή σε μεσεγχυματικό φαινότυπο (EMT), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όσο και για τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (Chitnis et al, 2008; Jeong et al, 2014; Duan et al, 2003; Li et al, 2014; Armakolas et al, 2015). Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χημειοτακτικής μετανάστευσης, μελετήσαμε τη διαμεσολάβηση του ERK1/2 στην κυτταρική μετανάστευση των HT1080 που προκαλείται από τον IGF-I. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η αναστολή του ERK1/2 μέσω της προσθήκης ERK1/2 inhibitor στα HT1080, 1h πριν τη χορήγηση IGF-I, είχε ως αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική καταστολή της κατά τ'άλλα ισχυρής μετανάστευσης των κυττάρων μέσω του IGF-I ($p<0.001$) (Εικ. 3). Εντούτοις, η καταστολή του ERK χωρίς την προσθήκη του IGF-I, δεν επηρέασε τη βασική μεταναστευτική ικανότητα των HT1080 κυττάρων (Εικ.3A).

Στη συνέχεια, εξετάσαμε την πιθανή συμμετοχή της SDC2 στην ενεργοποίηση του ERK1/2 μέσω του IGF-I. Είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι η υπερέκφραση της SDC2 στα κύτταρα HT1080 ενισχύει τη φωσφωρυλίωση του ERK1/2 (Peterfia et al, 2012). Μετρήσαμε τη φωσφωρυλίωση του ERK1/2 στα κύτταρα control και στα ελλιπή σε SDC2 κύτταρα όπου προστέθηκε ο IGF-I. Όπως φαίνεται στην Εικ.3B και C, η παρουσία της SDC2 αποδείχτηκε καίρια για τη βασική, αλλά και για την επαγόμενη από τον IGF-I ενεργοποίηση του ERK1/2,

καθώς κύτταρα ελλιπή σε SDC2 εμφάνισαν μειωμένη σημαντικά ενεργοποίηση και στις δύο περιπτώσεις ($p<0.001$).

Εικόνα 3



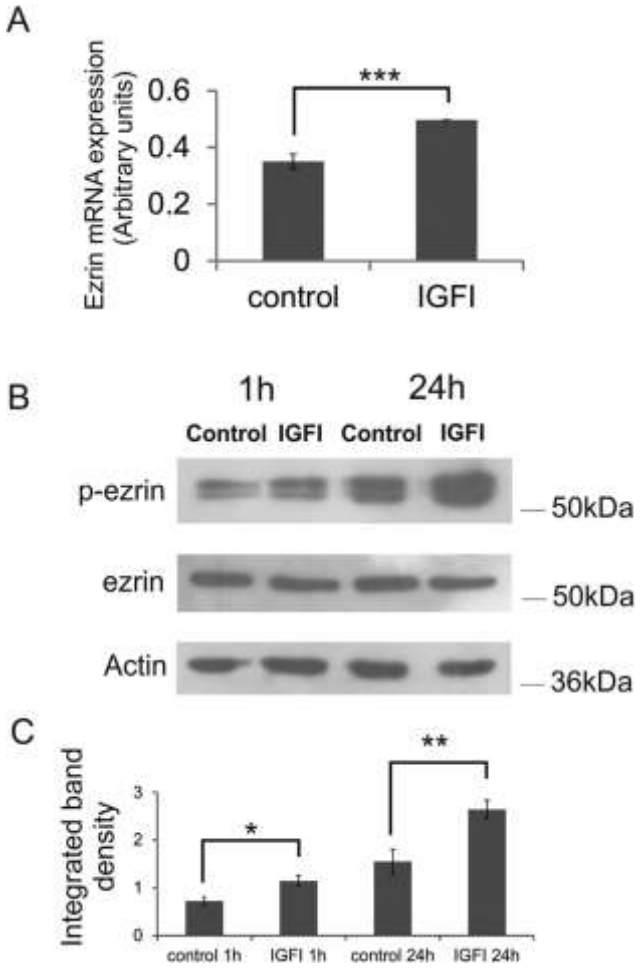
Εικ.3: Η SDC2 ρυθμίζει την κυτταρική μετανάστευση μέσω της επαγόμενης από τον IGF-I ενεργοποίησης του ERK1/2. Α) Τα κύτταρα HT1080 έλαβαν τον αναστολέα ERK inhibitor 1h πριν την προσθήκη του IGF-I. Μετά από 24h, τα κύτταρα συλλέχθησαν και στρώθηκαν ξανά σε 24-well plate inserts, επωάστηκαν για 4h στους 37°C, προκειμένου να μπορέσουν να μεταναστεύσουν μέσω των πόρων των inserts, προς τον επιστρωμένο με ινονεκτίνη κατώτερο θάλαμο των πηγαδιών του 24-well plate. Ο αριθμός των κυττάρων που μετανάστευσαν μετρήθηκε με το fluorometric CyQUANT Assay Kit (MolecularProbes). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών

πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζεται ο Means±S.E.M.; Στατιστική σημαντικότητα: NS> 0.05, ***p ≤ 0.001 μεταξύ των control και των δειγμάτων. B) Στα επιμολυσμένα με siSDC2 και scramble siScr κύτταρα HT1080, αλλά και στα κύτταρα control, χορηγήθηκε DMEM 0% ή IGF-I (5 ng/ml) για 24 h. Στη συνέχεια αυτά συλλέχθησαν και ίσες ποσότητες πρωτεΐνης κυτταρικών θραυσμάτων επωάστηκαν με ειδικό αντίσωμα για τον φωσφορυλιωμένο p-ERK1/2. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες. C) Οι ειδικές πρωτεϊνικές ζώνες του p-ERK1/2 αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν κατά της ακτίνης. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζεται ο Means±SEM; Στατιστική σημαντικότητα ***p≤0.001 μεταξύ των δειγμάτων.

5.3 Ο IGFI ελέγχει την ενεργοποίηση της ezrin.

Στα επόμενα πειράματα ο στόχος ήταν να διευκρινίσουμε τους μηχανισμούς με τους οποίους η σηματοδότηση των IGF-I/SDC2 επηρεάζει τη μετανάστευση των HT1080. Επικεντρωθήκαμε στην ezrin, ένα μόριο γνωστό για την αλληλεπίδρασή του με τη SDC2 και τη συνεπακόλουθη αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού (Granes et al, 2000, Granes et al, 2003). Η ezrin είναι γνωστή για τη μερική τουλάχιστον ενεργοποίησή της μέσω φωσφωρυλίωσης της Thr567, μία διαδικασία που προκαλεί σημαντικές αλλαγές στη στερεοταξία του μορίου και τελικά αποκαλύπτει περιοχές πρόσδεσης για την F-actin, τη SDC2, αλλά και άλλα μόρια (Fehon et al, 2010, Tang et al, 2009). Με ενδιαφέρον έχει παρατηρηθεί ότι η ezrin αποτελεί ενδοκυττάριο ρυθμιστή σηματοδότησης του IGF-I στα καρκινικά κύτταρα του κόλου (Leiphrakpam et al, 2014). Προκειμένου να εξερευνήσουμε την πιθανή συσχέτιση της σηματοδότησης του IGF-I και της ενεργοποίησης της ezrin, προσθέσαμε IGF-I στα κύτταρα HT1080 και μετρήσαμε την έκφραση της ezrin σε επίπεδο mRNA, πρωτεΐνης, αλλά και τα φωσφωρυλιωμένα επίπεδα (Thr567). Όπως φαίνεται στην Εικ.4A, ο IGF-I αύξησε το mRNA της ezrin στις 24h ($p<0.001$), ένα φαινόμενο που δεν παρατηρήθηκε στην πρωτεϊνική έκφραση (Εικ.4B). Εντούτοις, ο IGF-I αύξησε σημαντικά τη φωσφωρυλίωση της ezrin (Thr567) τόσο στη 1h, όσο και στις 24h [($p<0.05$; $p<0.01$ αντίστοιχα (Εικ.4B και C)].

Εικόνα 4

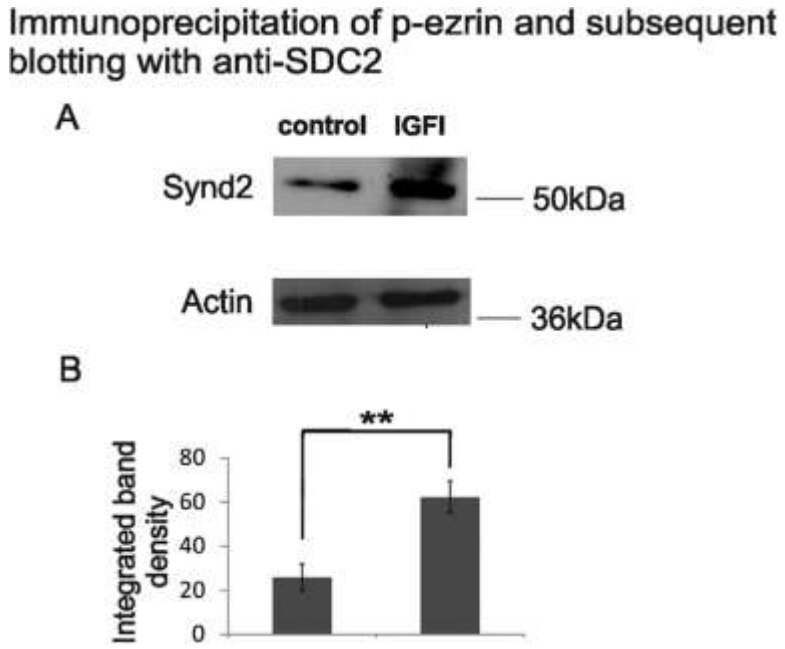


Εικ.4: Η επίδραση του IGF-I στην έκφραση και ενεργοποίηση της ezrin. Α) Η έκφραση της ezrin ποσοτικοποιήθηκε με τη Real-time PCR, μετά την καλλιέργεια σε DMEM 0% ή τη χορήγηση IGF-I (5 ng/ml) για 24 h. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζεται ο Means±SEM; Στατιστική σημαντικότητα***$p \leq 0.001$ μεταξύ των control και των αντίστοιχων δειγμάτων. Β) Τα κύτταρα HT1080 καλλιεργήθηκαν είτε ως control με DMEM 0%, ή με IGF-I (5 ng/ml) για 1h και 24 h. Στη συνέχεια, συλλέχθησαν και ίσες ποσότητες πρωτεΐνης κυτταρικών θραυσμάτων επωάστηκαν με ειδικό αντίσωμα για την p-ezrin και την ezrin. C) Οι ειδικές πρωτεϊνικές ζώνες αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν κατά της ακτίνης. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζεται ο Means±SEM; Στατιστική σημαντικότητα *$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$, μεταξύ των δειγμάτων.

5.4 Σχηματισμός συμπλεγμάτων ανοσοκατακρήμνισης SDC2/p-ezrin.

Έχει προηγουμένως αποδειχθεί ότι η SDC2 προσδένεται στην ezrin στα όμοια των ινοβλαστών κύτταρα, οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό κυτταρικών προεξοχών (Granes et al, 2000; Granes et al, 2003). Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή σχέση μεταξύ της SDC2 και της ezrin στα κύτταρα HT1080, διεξήχθη ένα πείραμα ανοσοκατακρήμνισης (IP) στα κύτταρα μετά την προσθήκη IGF-I (5ng/ml). Η ανοσοκατακρήμνιση πραγματώθηκε με την παρουσία ειδικού αντισώματος για την p-ezrin και το σύμπλεγμα επωάστηκε με αντίσωμα κατά της SDC2. Η διαδικασία αυτή επιτυχημένα οδήγησε στο σχηματισμό συμπλεγμάτων ανοσοκατακρήμνισης μεταξύ των δύο μορίων, το οποίο φάνηκε ενισχυμένο από τη δράση του IGF-I ($p < 0.01$) (Εικ.5A και B).

Εικόνα 5



Εικ. 5: Η εντόπιση της SDC2 μαζί με την p-ezrin. A) Τα κύτταρα HT1080 καλλιεργήθηκαν είτε σε DMEM 0%, ή σε DMEM 0% με την προσθήκη IGF-I (5 ng/ml) για 24 h. Μετά τη συλλογή τους, ίσες

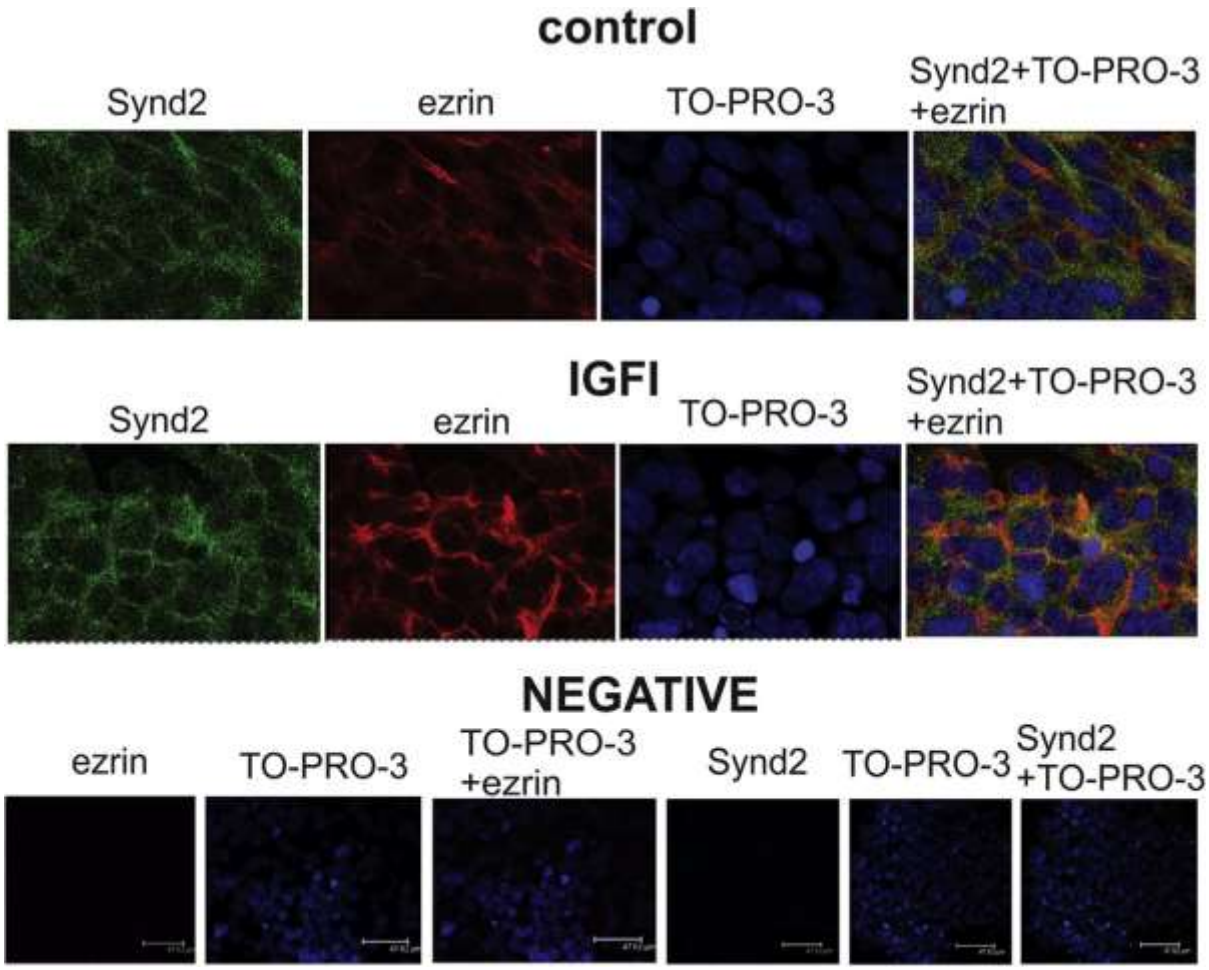
ποσότητες πρωτεΐνης κυτταρικών θραυσμάτων επωάστηκαν με ειδικό αντίσωμα για την p-ezrin ολονυχτίως στη φυγόκεντρο στους 4°C. Τα ιζήματα αργότερα επωάστηκαν με ειδικό αντίσωμα κατά της SDC2. Β) Οι πρωτεϊνικές ζώνες αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν κατά της ακτίνης. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζεται ο Means±SEM; Στατιστική σημαντικότητα**$p \leq 0.01$, μεταξύ των control και των αντίστοιχων δειγμάτων.

5.5 Ο IGFI ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις SDC2/ezrin και SDC2/IGF-IR

Προκειμένου να παρατηρήσουμε πιο ξεκάθαρα την αλληλεπίδραση SDC2/ezrin και να εξετάσουμε την πιθανή ρύθμιση του συμπλέγματος από τη σηματοδότηση του IGF-I, χρησιμοποιήσαμε τον ανοσοφθορισμό. Αφού προστέθηκε IGF-I στα κύτταρα HT1080 και πραγματοποιήθηκε ειδική διαδικασία που κατέστησε τα κύτταρα καταλλήλως διαπερατά, έγινε επώαση με ειδικά φθορίζοντα αντισώματα για τη SDC2 (πράσινο σήμα) και την ezrin (κόκκινο σήμα). Η συνεντόπιση επιβεβαιώθηκε από την επιπροβολή των σημάτων (πορτοκαλί σήμα), με την παρατήρηση σημαντικά αυξημένου σήματος στα κύτταρα που έλαβαν IGF-I (Εικ.6).

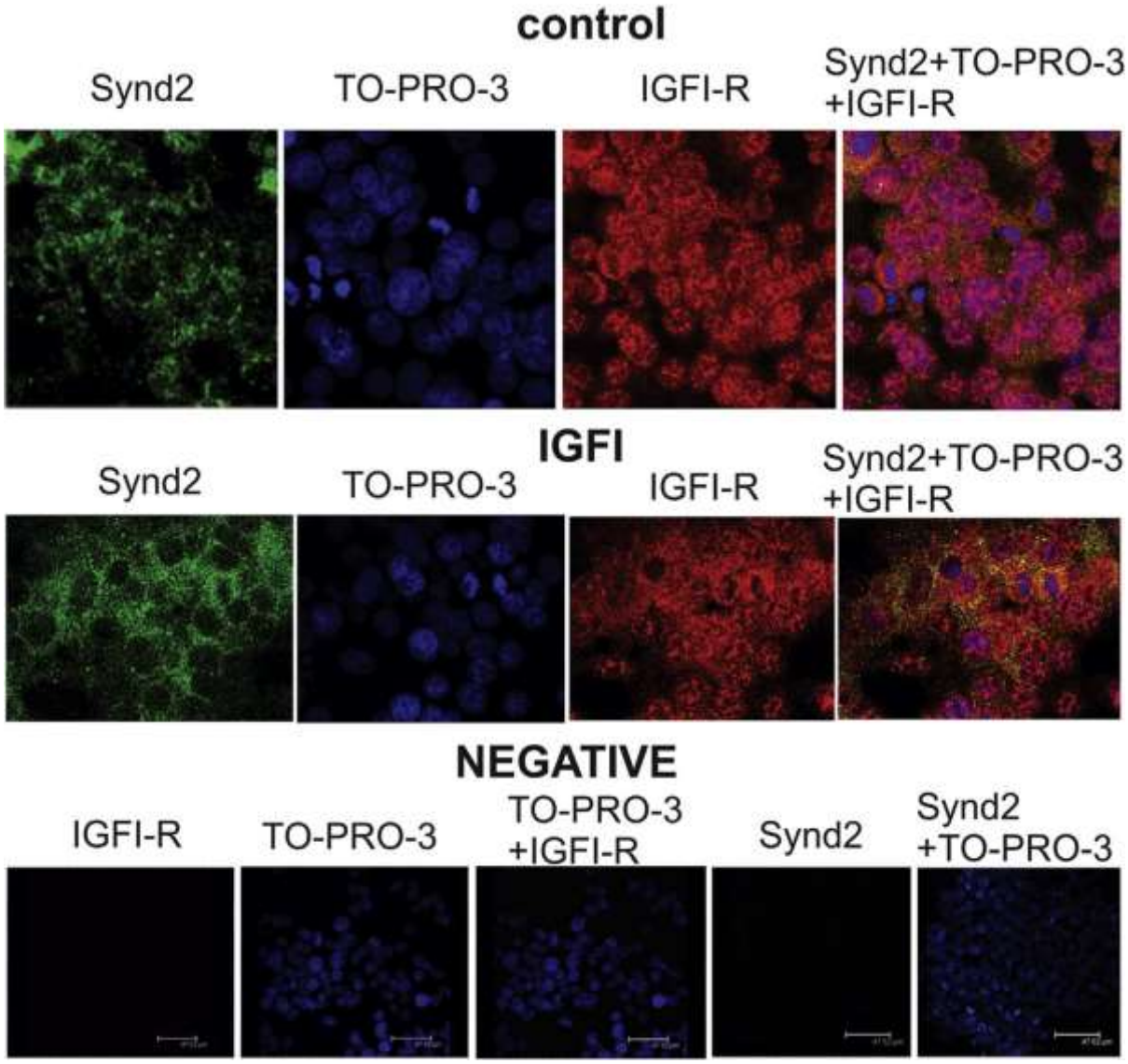
Στη συνέχεια, τα κύτταρα HT1080 έλαβαν χρώση για τη SDC2, τον IGF-IR και το TO-PRO-3 (πυρηνική χρώση). Η τελική κίτρινη/πορτοκαλί χρώση των σημάτων των αντισωμάτων επιβεβαίωσε την αλληλεπίδραση μεταξύ της SDC2 και του IGF-IR. Παρομοίως, το επιπροβάλλον σήμα ήταν εντονότερο στα κύτταρα που έλαβαν IGF-I σε σχέση με τα control (Εικ.7). Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν μία στενή σχέση μεταξύ του IGF-IR, της SDC2 και της ezrin, με τρόπο εξαρτώμενο από τον IGF-I.

Εικόνα 6



Εικ.6: Η απεικόνιση του συμπλέγματος της SDC2 και της ezrin στα κύτταρα HT1080 cells με τον ανοσοφθορισμό. Τα HT1080 κύτταρα του ινοσαρκώματος καλλιεργήθηκαν σε DMEM 0%, ή DMEM 0% και IGF-I (5 ng/ml), και μετά από επώαση 24 h, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, έγιναν διαπερατά στις καλυπτρίδες και πραγματοποιήθηκε η χρώση τους με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων για τη SDC2 και την ezrin, μαζί με τους αντίστοιχους πυρήνες με τη χρήση TO-PRO-3. Τα αρνητικά controls δεν επωάστηκαν σε αντισώματα για τη SDC2 και την ezrin. Τα σήματα για τη SDC2 (πράσινο) και την ezrin (κόκκινο) επιπροβλήθηκαν. Τα πλακάκια αναλύθηκαν με confocal μικροσκόπιο και ελήφθησαν εικόνες με μεγένθυση x 40 (με x 10 zoom).

Εικόνα 7

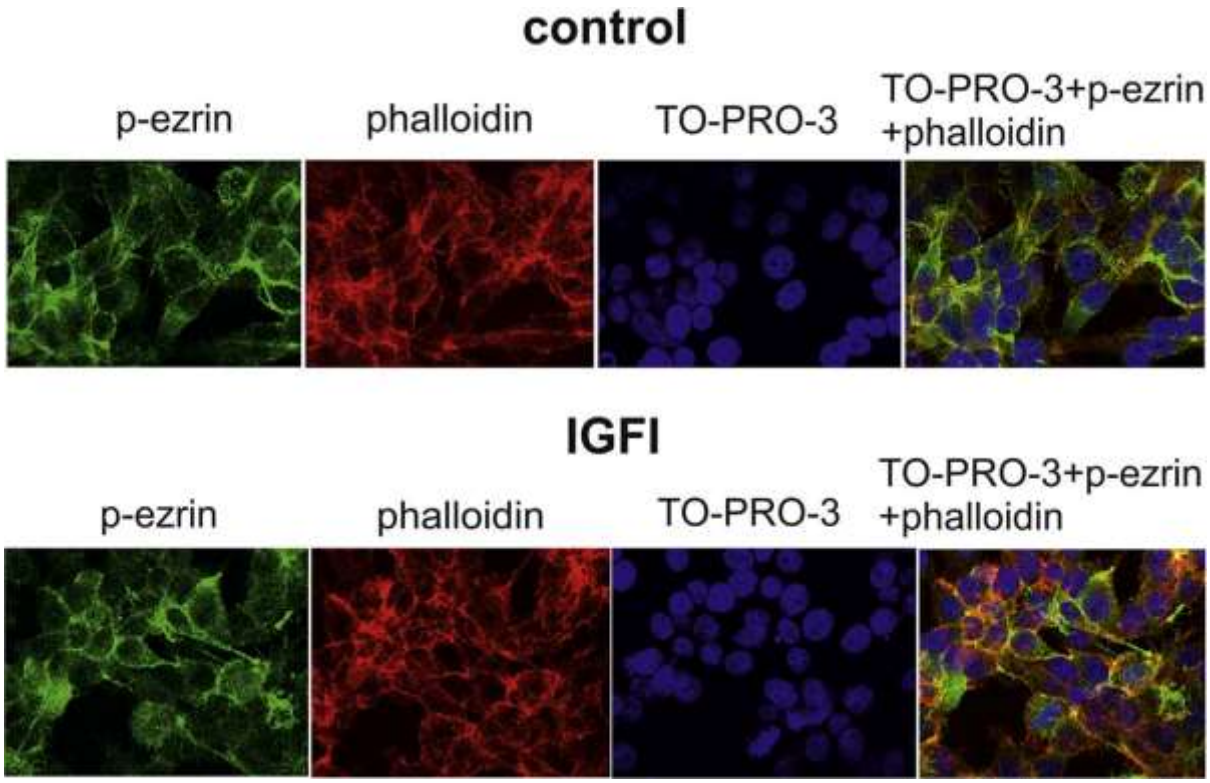


Εικ.7: Απεικόνιση του συμπλέγματος της SDC2 με τον IGF-IR στα κύτταρα HT1080 με τη χρήση του ανοσοφθορισμού. Τα κύτταρα HT1080 του ινοσαρκώματος καλλιεργήθηκαν σε DMEM 0%, ή DMEM 0% και IGF-I (5 ng/ml) και στη συνέχεια στρώθηκαν σε στρογγυλές καλυπτρίδες, μονιμοποιήθηκαν, έγιναν διαπερατά και πραγματοποιήθηκε χρώση με ειδικά αντισώματα για τη SDC2 (πράσινο σήμα) και τον IGF-IR (κόκκινο σήμα). Έγινε χρώση των πυρήνων με TO-PRO-3. Στα αρνητικά controls, τα πρώτα αντισώματα anti-SDC2 και anti-IGF-IR παραλείφθηκαν. Δείχνουμε αντιπροσωπευτικό αρνητικό control για το anti-IGF-IR. Τα πλακάκια αναλύθηκαν με confocal μικροσκόπιο και ελήφθησαν εικόνες με μεγένθυση x 40 (με x 10 zoom).

5.6 Η ezrin και η φαλλοϊδίνη συνεντοπίζονται στα HT1080 κύτταρα, κατά τρόπο εξαρτώμενο από τον IGF-I.

Είναι γνωστό ότι η ezrin είναι μία πρωτεΐνη συνδέτης για τη μεμβράνη και τον κυτταροσκελετό (Granes et al, 2000). Για να εξετάσουμε την πιθανή σχέση μεταξύ του IGF-I και της ezrin στο πειραματικό μας μοντέλο χρησιμοποιήσαμε ανοσοφθορισμό. Τα κύτταρα HT1080 έλαβαν IGF-I και επωάστηκαν με ειδικό αντίσωμα κατά της p-ezrin, της ακτίνης και το TO-PRO-3. Τα κύτταρα με IGF-I έδειξαν πιο ισχυρό σήμα για τη φαλλοϊδίνη (κόκκινο σήμα), όπως επίσης ενισχυμένη συνεντόπιση ezrin/ακτίνης (επιπροβάλλον κίτρινο/πορτοκαλί), που ανιχνεύθηκε περισσότερο στις κυτταρικές μεμβράνες (Εικ.8). Έτσι, τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι ο IGF-I ενισχύει την αναδιοργάνωση των ινιδίων της ακτίνης και την πρόσδεσή τους στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της ειδικής συνύπαρξης p-ezrin/ακτίνης στη μεμβράνη (Εικ.8).

Εικόνα 8

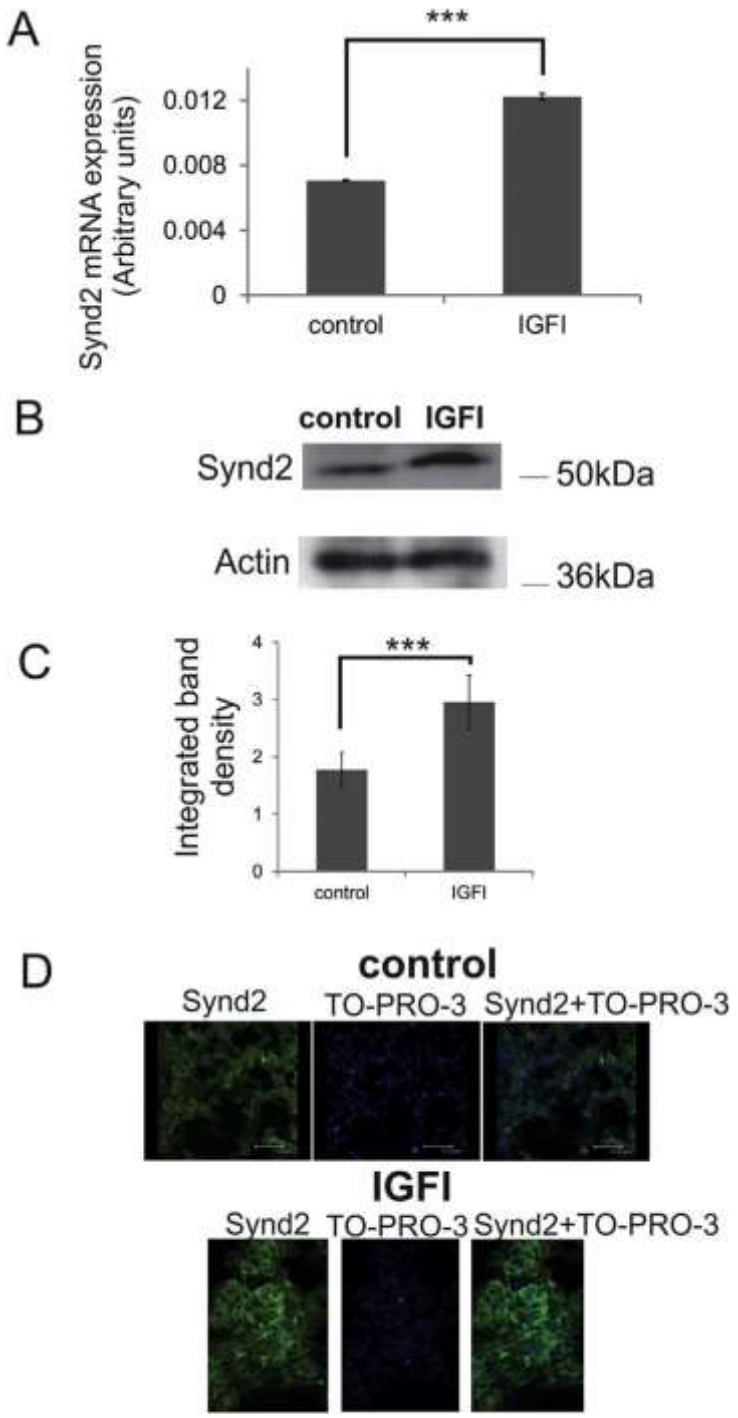


Εικ.8: Η σηματοδότηση του IGF-I ρυθμίζει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Τα κύτταρα HT1080 καλλιεργήθηκαν είτε σε DMEM 0%, ή σε DMEM 0% με την προσθήκη IGF-I (5 ng/ml) για 24h και πραγματοποιήθηκε χρώση με ειδικά αντισώματα για την p-ezrin (πράσινο σήμα) και τη phalloidin (κόκκινο σήμα) πάνω σε καλυπτρίδες σε πλακάκια, προκειμένου να παρατηρηθούν τα ινίδια ακτίνης. Έγινε χρώση των πυρήνων με TO-PRO 3. Τα σήματα των ινιδίων της ακτίνης και της p-ezrin επιπροβλήθηκαν (κίτρινο σήμα). Στα αρνητικά controls, τα αντισώματα anti-p-ezrin και anti-phalloidin δεν προστέθηκαν. Τα πλακάκια αναλύθηκαν στο confocal μικροσκόπιο και ελήφθησαν εικόνες με μεγένθυση x 40 (με x 10 zoom).

5.7 Ο IGF-I ρυθμίζει την έκφραση mRNA και πρωτεΐνης της SDC2.

Γνωρίζουμε έως τώρα ότι ο IGF-I επηρεάζει την έκφραση της SDC2 ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (Dobra et al, 2003). Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω τη συνεισφορά της SDC2 στην επαγόμενη από τον IGF-I κυτταρική μετανάστευση, εξετάσαμε τις επιδράσεις του IGF-I στην έκφραση της SDC2. Με τη μέθοδο της real-time PCR δείξαμε ότι τα HT1080 κύτταρα που έλαβαν IGF-I για 24h, εξέφρασαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα mRNA της SDC2 σε σχέση με τα control ($p<0.001$) (Εικ.9A), ενώ επίσης με την αποτύπωση κατά Western, η προσθήκη του IGF-I φάνηκε να οδηγεί σε ισχυρή αύξηση πρωτεϊνικής έκφρασης στα HT1080, σε σχέση με τα control ($p<0.001$) (Εικ.9B και C). Περαιτέρω επιβεβαίωση για τη ρύθμιση έκφρασης της SDC2 από τον IGF-I, δόθηκε με τη χρήση ανοσοφθορισμού, όπου η χορήγηση IGF-I αύξησε το τελικό σήμα της SDC2 (Εικ.9D).

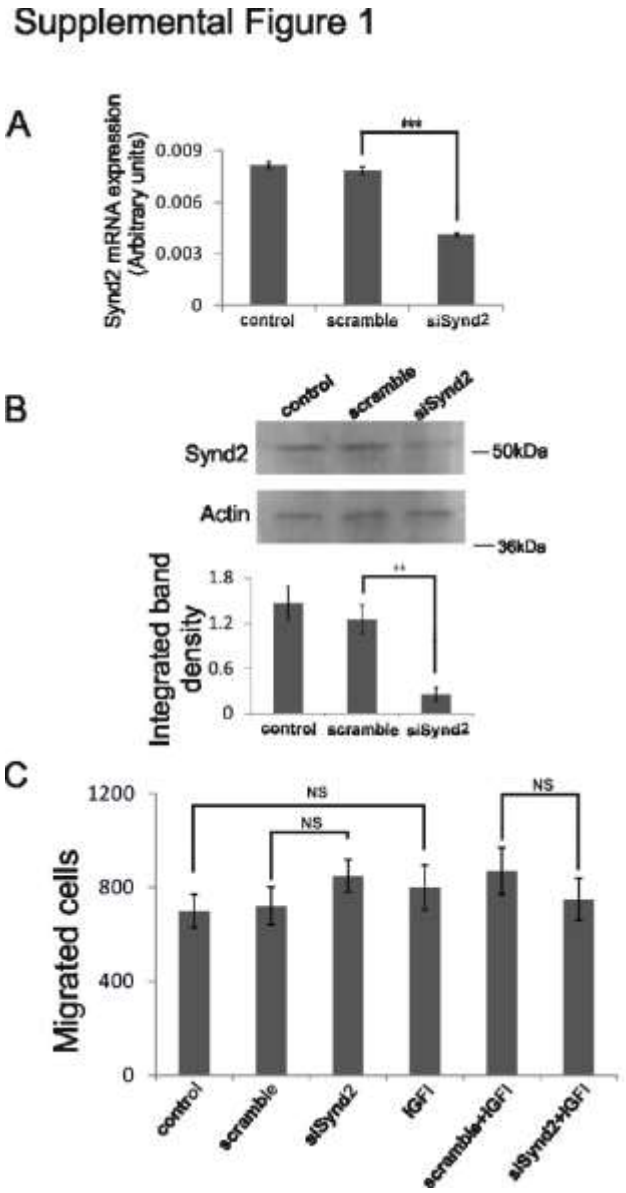
Εικόνα 9



Εικ.9: Η επίδραση του IGF-I στην έκφραση mRNA και πρωτεΐνης της SDC2. Α) Η μεταγραφή της SDC2 ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση Real-time PCR, μετά από χορήγηση στα κύτταρα είτε DMEM 0%, ή IGF-I (5ng/ml) για 24h. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων εις τριπλούν. Απεικονίζονται Means±S.E.M; Στατιστική σημαντικότητα ***$p \leq 0.001$ μεταξύ των control και των αντίστοιχων δειγμάτων. Β) Τα κύτταρα HT1080, είτε καλλιεργήθηκαν σε DMEM 0%, ή χορηγήθηκε IGF-I (5 ng/ml) για 24 h. Μετά τη συλλογή τους, ίσες ποσότητες πρωτεΐνης των κυτταρικών θραυσμάτων επωάστηκαν με ειδικό αντίσωμα έναντι της SDC2. Απεικονίζονται

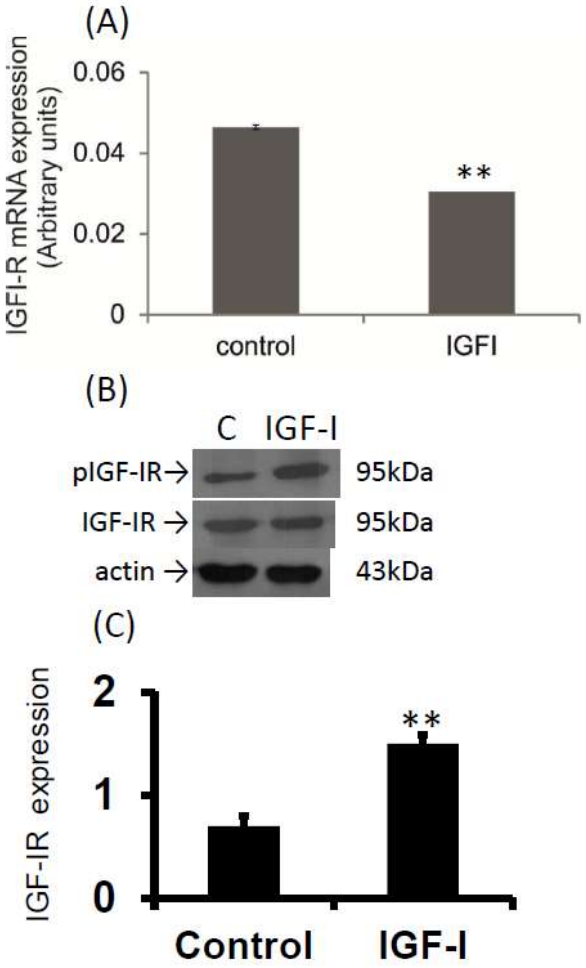
αντιπροσωπευτικές εικόνες. C) Ειδικές πρωτεϊνικές ζώνες της SDC2 αναλύθηκαν βάσει πυκνότητας και προσαρμόστηκαν ανάλογα με την ακτίνη. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζεται ο Means±S.E.M; Στατιστική σημαντικότητα***$p \leq 0.001$ μεταξύ των control και των αντίστοιχων προσθηκών. D) Απεικόνιση της SDC2 (πράσινο σήμα) στα HT1080 κύτταρα μέσω ανοσοφθορισμού. Η χρώση πρωτεΐνης της SDC2 καθώς και των πυρήνων στα κύτταρα του ινοσαρκώματος (με TO-PRO-3) (μπλε σήμα) εκτιμήθηκε στις καλλιέργειες μετά από επώαση για 24 h με DMEM 0% και IGF-I (5 ng/ml). Χρησιμοποιήθηκαν αρνητικά control, όπου το ειδικό αντίσωμα anti-SDC2 παραλείφθηκε. Τα πλακάκια με τις καλυπτρίδες των κυττάρων αναλύθηκαν με confocal μικροσκόπιο και ελήφθησαν εικόνες με μεγένθυση x 40 (με x 10 zoom).

Συμπληρωματική εικόνα 1



Συμπλ. Εικ.1: Ο άξονας IGF-I/SDC2 δεν επηρεάζει την κυτταρική μετανάστευση των B6FS. A) Η έκφραση της SDC2 εξετάστηκε και ποσοτικοποιήθηκε στα κύτταρα B6FS με τη χρήση Real-time PCR. Τα κύτταρα B6FS έλαβαν είτε DMEM 0%, ή επιμολύνθηκαν με ειδικό SDC2 siRNA (siSynd2) και scramble RNA (siScr). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων σε τριπλέτα. Παρουσιάζεται ο Means±SEM; Στατιστική σημαντικότητα ***$p \leq 0.001$, μεταξύ των control και των αντίστοιχων δειγμάτων. B) Η πρωτεϊνική έκφραση της SDC2 διερευνήθηκε στα B6FS κύτταρα μέσω ανάλυσης της αποτύπωσης κατά Western. Τα κύτταρα ήταν είτε control, ή επιμολυσμένα με siSynd2 και siScr. Ίσες ποσότητες κυτταρικών θραυσμάτων πρωτεΐνης επωάστηκαν με ειδικό αντίσωμα κατά της SDC2 αφού συλλέχθησαν τα κύτταρα. Αντιπροσωπευτικές εικόνες παρουσιάζονται, όπου ειδικές ζώνες της SDC2 αναλύθηκαν και προσαρμόστηκαν κατά της ακτίνης. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζονται ο Means ±SEM; Στατιστική σημαντικότητα **$p \leq 0.01$ μεταξύ δειγμάτων και control. C) Τα κύτταρα B6FS επιμολύνθηκαν με siSynd2, ή siScr και είτε έλαβαν IGF-I (5 ng/ml) για 24 h, ή όχι. Τα κύτταρα στη συνέχεια συλλέχθησαν και στρώθηκαν ξανά στους ανώτερους θαλάμους των 24-well plate inserts, όπου επωάστηκαν για 4h στους 37°C. Ο χημειοτακτικός παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε στον κατώτερο θάλαμο ήταν η ινονεκτίνη (FN) και τα κύτταρα μετανάστευσαν προς τον κατώτερο θάλαμο μέσω των πόρων των inserts. Τα κύτταρα που μετανάστευσαν, συλλέχθησαν μετά από 1 min με 100μl τρυψίνης. Κρατήθηκαν για 24 h στους -70°C. Χρησιμοποιήθηκε το Fluorometric CyQUANT Assay Kit (Molecular Probes) για να μετρηθούν τα κύτταρα που μετανάστευσαν. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζεται ο Means±SEM; Στατιστική σημαντικότητα P=NS μεταξύ control και δειγμάτων.

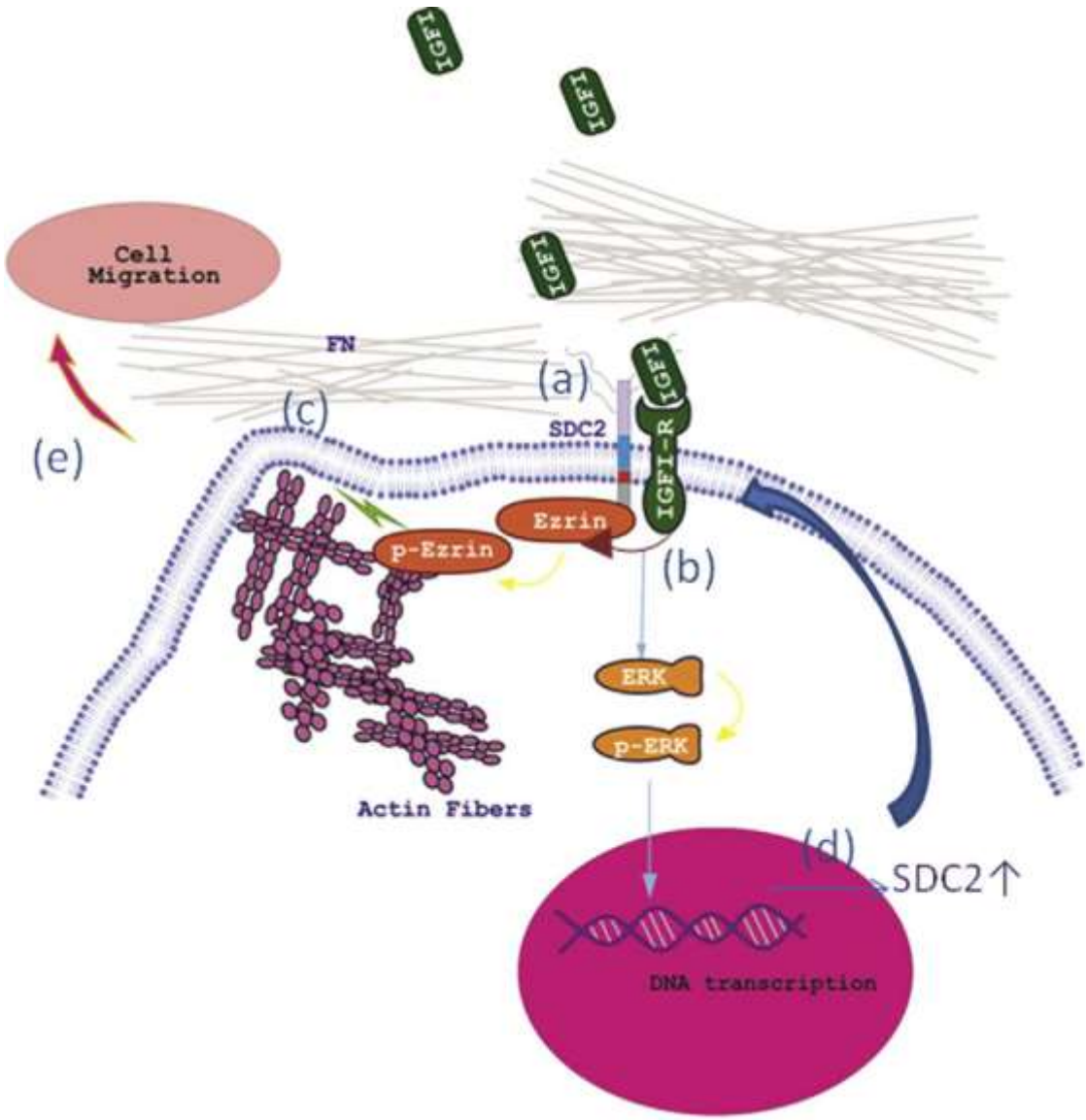
Συμπληρωματική εικόνα 2



Συμπλ. Εικ.2: Ο IGF-I ενισχύει την ενεργοποίηση του IGF-IR. A) Τα επίπεδα έκφρασης mRNA του IGF-IR μετρήθηκαν με Real-time PCR. Τα κύτταρα HT1080 έλαβαν είτε DMEM 0% ή IGF-I (5ng/ml) για 24 h. Τρία διαφορετικά πειράματα διεξήχθησαν σε τριπλέτες και ο μέσο όρος παρουσιάζεται εδώ. Παρουσιάζεται ο Means±SEM; Στατιστική σημαντικότητα **p≤0.01 μεταξύ δειγμάτων και control. B) Μετά από χορήγηση είτε DMEM 0% ή IGF-I (5 ng/ml) για 24 h στα HT1080, τα κύτταρα συλλέχθησαν και ίσες ποσότητες πρωτεΐνης κυτταρικών θραυσμάτων επωάστηκαν με ειδικά αντισώματα για IGF-IR και pIGF-IR. C) Οι πρωτεϊνικές ζώνες αναλύθηκαν και προσαρμόστηκαν κατά της ακτίνης. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων εις τριπλούν. Παρουσιάζεται ο Means±SEM; Στατιστική σημαντικότητα **p≤ 0.01 μεταξύ των δειγμάτων.

Διαγραμματική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού (3): η συμμετοχή της SDC2 στην εξαρτώμενη από τον IGF-I μετανάστευση των HT1080, δρώντας ως συν-υποδοχέας του IGF-IR, μέσω της ενεργοποίησης του ERK1/2 και της διαμόρφωσης του κυτταροσκελετού με το σύμπλοκο της p-ezrin

Εικόνα 10



5.8 Συζήτηση

Η ικανότητα της SDC2 να ελέγχει την κυτταρική σηματοδότηση είναι πλέον καλά συνδεδεμένη με τη ρύθμιση της κυτταρικής συμπεριφοράς και ιδίως με την

ογκογένεση (Tsonis et al, 2013). Η συγκεκριμένη διαμεμβρανική πρωτεογλυκάνη, που όπως προαναφέρθηκε εκφράζεται σε αφθονία στα μεσεγχυματικά κύτταρα, είχε φανεί σε προηγούμενες μελέτες να ενισχύει τη μετανάστευση των κυττάρων του ανθρώπινου ινοσαρκώματος μέσω του άξονα FAK/PI3K/Tiam1/Rac (Park et al, 2005). Είναι ενδιαφέρουσες οι μελέτες των Klass et al, οι οποίοι έδειξαν ότι κύτταρα ωοθηκών κινέζικων hamster που επιμολύνθηκαν με αποκομμένη SDC2, της οποίας έλειπαν συγκεκριμένα 14 αμινοξέα της καρβοξυτελικής περιοχής, έχασαν την ικανότητα να αναδιαμορφώνουν τη λαμινίνη ή την FN σε ινίδια και να προσδένουν την εξωγενή FN (Klass et al, 2000). Επιπλέον, οι Peterfia et al, αποκάλυψαν τη συσχέτισή της με τη SDC1 στην πρόοδο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τη χημειοταξία των HT1080 (Peterfia et al, 2012). Επίσης, στην ίδια μελέτη προτάθηκε ότι η σύνθεση της SDC2 ελέγχεται από τον IGF-IR στο ινοσάρκωμα (Peterfia et al, 2012), μία αλληλεπίδραση που αργότερα επιβεβαιώθηκε στον καρκίνο του μαστού (Tsonis et al, 2013).

Ο ισχυρός ογκογόνος χαρακτήρας του IGF-I είναι καλά σκιαγραφημένος στη μέχρι τώρα βιβλιογραφία (Brahmkhatri et al, 2015; Samani et al, 2007; Sekyi-Otu et al, 1994). Ο IGF-I εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυτταρικής απόπτωσης, στην αγγειογένεση και στη μετάσταση, ενώ εμφανίζει τη δυνατότητα να προωθεί την εξέλιξη του καρκίνου μέσω του υποδοχέα του IGF-IR (Brahmkhatri et al, 2015; Takahashi et al, 2015), που εκφράζεται σε αφθονία στην κυτταρική επιφάνεια των HT1080 (Huang et al, 2015). Ο ρόλος του IGF-I ως ικανός ενισχυτής της μετάστασης του ινοσαρκώματος έχει ήδη τονιστεί σε προηγούμενες μελέτες (Sekyi-Otu et al, 1994; Yoon et al, 2001).

Τα κύρια ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια του IGF-I περιλαμβάνουν τη φωσφορυλίωση του ERK1/2 και το AKT (Subramani et al, 2014; Tai et al, 2003). Φαίνεται ότι η SDC2 συμμετέχει στη ρύθμιση της ενδοκυττάριας σηματοδότησης του IGF-I, εφόσον μπορεί να ρυθμίσει τη φωσφωρυλίωση του ERK στα σαρκώματα (Peterfia et al, 2012; Modrowski et al, 2005). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το μονοπάτι του IGF-I αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ενδοκυττάριους διαμεσολαβητές πολλαπλασιασμού και κινητικότητας (Subramani et al, 2014). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η SDC2 και ο IGF-IR σχηματίζουν ένα βρόχο

ανατροφοδότησης μαζί, εφόσον ο IGF-IR μπορεί να ενισχύει την έκφραση της SDC2 (Tsonis et al, 2013), ενώ αντίθετα, η SDC2 μπορεί να καταστέλλει την έκφραση του IGF-IR (Peterfia et al, 2012). Λαμβάνοντας όλα τα δεδομένα υπόψιν, ήταν ενδιαφέρον να διαλευκανθεί η σχέση όλων αυτών των μονοπατιών κατά τη χημειοτακτική μετανάστευση των κυττάρων του ινοσαρκώματος και να εξεταστεί μία πιθανή στερεοτακτική σχέση μεταξύ της SDC2 και του IGF-IR.

Δείχνουμε για πρώτη φορά ότι ο IGF-I/IGF-IR ενισχύει τη χημειοτακτική κινητικότητα των HT1080 μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει τον ERK1/2. Σε προηγούμενη μελέτη κυττάρων ανθρώπινου πολλαπλού μυελώματος, φάνηκε ότι ο IGF-I ενεργοποιεί τον IGF-IR και στη συνέχεια πυροδοτεί τον πολυμερισμό της F-ακτίνης, φωσφωρυλιώνει τη FAK και την paxillin και ενισχύει τη σύνδεση αυτών των πρωτεϊνών εστιακής προσκόλλησης με την ιντεγκρίνη β1 ώστε να οδηγήσει σε προσκόλληση στην FN (Tai et al, 2003). Στην παρούσα μελέτη και βάσει προηγούμενων δημοσιεύσεων για τις ογκογόνους δράσεις του ERK1/2 (Chen et al, 2009 Matsunaga et al, 2017, Meister et al, 2013, Subramani et al, 2014), δείχνουμε ότι η ενεργοποίηση του ERK1/2 μέσω του IGF-IR παίζει καταλυτικό ρόλο στην επαγόμενη από τον IGF-I μετανάστευση των κυττάρων του ινοσαρκώματος. Επιπλέον, αποδεικνύουμε ότι η καταστολή έκφρασης της SDC2 εμποδίζει την επαγόμενη από τον IGF-I φωσφωρυλίωση του ERK1/2, έναν από τους πιο σημαντικούς ενδοκυττάριους διαμεσολαβητές σηματοδότησης του IGF-I και εξέλιξης του καρκίνου. Η κινητικότητα των κυττάρων B6FS δεν απάντησε στη δράση του IGF-I. Η κυτταρική σειρά B6FS προέρχεται από πτωχά διαφοροποιημένο ινοσάρκωμα (Thurzo et al, 1976), όπου τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από ήπια ομοιότητα με τα κύτταρα προέλευσης, ήπιο πλειομορφισμό, καθώς επίσης και έντονη μιτωτική δραστηριότητα (Noujaim et al, 2016, Thway et al, 2016). Επίσης, η SDC2 δεν επηρέασε τη μετανάστευση των κυττάρων B6FS. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη που έδειξε ότι η ικανότητα προσκόλλησής τους δεν εξαρτώταν από το προφίλ των HS αλυσίδων τους (Voudouri et al, 2016). Οι διαφορετικές αντιδράσεις των δύο κυτταρικών σειρών στη σηματοδότηση IGF-I/SDC2 μπορεί να αποδοθεί στην ετερογένεια του ινοσαρκώματος και συγκεκριμένα στη διαφορετική μορφολογία, διαφοροποίηση και συμπεριφορά (Blizniukov et al,

2012). Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι όλο και περισσότερες μελέτες αναδεικνύουν τον ογκογόνο χαρακτήρα της SDC2 στην πλειονότητα των επιθηλιακών καρκίνων, στους μεσεγχυματικούς όγκους η δράση της είναι ειδική για κάθε συγκεκριμένο τύπο όγκου (Dieudonne et al, 2010, Orosco et al, 2007, Peterfia et al, 2012).

Λαμβάνοντας υπόψιν τις μοναδικές ιδιότητες της SDC2, επιχειρήθηκε να διελευκανθεί ακόμα περισσότερο ο ρόλος της στην κινητικότητα των κυττάρων HT1080 του ανθρώπινου ινοσαρκώματος. Προκειμένου να έρθουν στο φως λεπτομέρειες για τη σχέση της SDC2 με τα σηματοδοτικά μονοπάτια του IGF-IR, εξετάστηκε η πιθανή συνεντόπιση τους στην κυτταρική μεμβράνη, χρησιμοποιώντας τεχνικές ανοσοκατακρήμνισης και ανοσοφθορισμού. Τα συγκεκριμένα πειράματα έδειξαν ότι η SDC2 συνυπάρχει με τον IGF-IR στο ινοσάρκωμα και αυτή η συνεντόπιση ενισχύεται από τη χορήγηση IGF-I. Βάσει των προηγούμενων δημοσιεύσεων, υποθέτουμε ότι η SDC2 δρα συνεργιστικά με τον IGF-IR στην κυτταρική μεμβράνη και στη συνέχεια ενεργοποιεί τη σηματοδότηση του IGF-IR. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η SDC2 επηρεάζει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Park et al, 2005), σχηματίζοντας κυτταρικές προεξοχές (φιλοπόδια) και τελικά ρυθμίζοντας την κυτταρική κινητικότητα (Contreras et al, 2001, Granes et al, 2000, Vicente et al, 2013). Μέσω αυτών των ιδιοτήτων, η SDC2 είναι ικανή να μεταδώσει εξωκυττάριες πληροφορίες επί τα εντός του κυττάρου και τελικά να επηρεάσει την κυτταρική συμπεριφορά (Essner et al, 2006; Granes et al, 2000). Παράλληλα, προηγουμένως έχει αναφερθεί η άμεση συσχέτιση μεταξύ της αμινοτελικής περιοχής της ezrin και της κυτταροπλασματικής περιοχής της SDC2 (Granes et al, 2000). Όντας η ezrin μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, είχε προταθεί ότι δρα ως σηματοδοτική γέφυρα μεταξύ της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Granes et al, 2000). Ακόμα και πολύ πρώιμες μελέτες δείχνουν ότι είτε ενεργοποιημένα μονομερή ή ολιγομερή κεφαλής/ουράς της ezrin, συσχετίζονται άμεσα με την F-ακτίνη μέσω μίας περιοχής στο καρβοξυτελικό της άκρο και με τη μεμβράνη μέσω του αμινοτελικού της άκρου (Bretscher et al, 1997). Επιπλέον, είναι ευρέως γνωστό ότι η ezrin, η radixin και η moesin (ERM) υπάρχουν γενικά σε μία λανθάνουσα, κλειστή διαμόρφωση, που υπάρχει στο

κυτταρόπλασμα και μόνο μετά από ενεργοποίηση μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης ή ινίδια της ακτίνης (Gary et al, 1995). Επομένως, η φωσφωρυλίωση στη Thr567 είναι το έναυσμα για τη διακοπή της λανθάνουσας κατάστασης και της μεταμόρφωσής της στην ενεργό μορφή, που μπορεί να προσδέσει την F-ακτίνη (Zhou et al, 2005). Πρωτύτερες μελέτες είχαν δείξει ότι η ezrin ενεργοποιείται από τον IGF-I στις κυτταρικές προεξοχές (λαμελιπόδια) καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών και του τραχήλου, όπου η επακόλουθη συνεντόπιση με το συμμεταφορέα χλωριούχου καλίου (KCL co-transporter-4) προωθεί τη διηθητικότητα των καρκινικών κυττάρων (Chen et al, 2009). Εκτός αυτού, έχει αποδοθεί ρόλος συντονιστή σύνδεσης της ακτίνης στην κυτταρική μεμβράνη για την ezrin στα αστροκύτταρα, μέσω της αυτο-φωσφωρυλίωσης του IGF-IR (Naftolin et al, 2007).

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας επιβεβαιώνουν αυτούς τους προτεινόμενους λειτουργικούς ρόλους της ezrin στο ινοσάρκωμα, αφού κύτταρα που έχουν λάβει IGF-I παρουσιάζουν ενισχυμένη ενεργοποίηση της ezrin και αυξημένη συνεντόπιση της SDC2/ezrin. Ο IGF-I/IGF-IR φαίνεται να είναι απαραίτητος γι'αυτή τη λειτουργία, αφού τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του IGF-IR επηρεάζει άμεσα τη φωσφωρυλίωση της ezrin και τη συνύπαρξη SDC2/ezrin. Η φωσφωρυλίωση της ezrin οδήγησε σε ενίσχυση των συμπλεγμάτων ezrin/ακτίνης. Η εντόπιση των συμπλεγμάτων ήταν περισσότερο εμφανής στις κυτταρικές μεμβράνες, προτείνοντας ότι η ezrin συνδέει ινίδια ακτίνης σε μεμβρανικές δομές, όπως παρατηρήθηκε προηγουμένως σε άλλα μοντέλα (Naftolin et al, 2007). Από την άλλη πλευρά, η ezrin είχε προηγουμένως φανεί ότι ρυθμίζει τη φωσφωρυλίωση του ERK1/2, μετά την ενεργοποίηση του EGFR σε κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Saygideger-Kont et al, 2016). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι τόσο η SDC2 όσο και η ezrin είναι πιθανοί ενεργοποιητές του ERK1/2. Έτσι, εκτός από τους άμεσους ρόλους της SDC2/ezrin στην οργάνωση των ινιδίων ακτίνης, οι συγκεκριμένοι διαμεσολαβητές μπορούν να ενισχύουν τη μετανάστευση των κυττάρων του ινοσαρκώματος έμμεσα, είτε μέσω της επαγόμενης από τον ERK1/2 έκφρασης ογκογόνων πρωτεϊνών, ή μέσω συσχετιζόμενων αλλαγών στη μορφολογία της ακτίνης, σύμφωνα με πρόσφατα ευρήματα σε κύτταρα

γλοιοβλαστώματος (Shannon et al, 2017). Η συγκεκριμένη μελέτη παρουσιάζει την ύπαρξη ενός ανατροφοδοτικού βρόχου, υποστηριζόμενο από την αύξηση έκφρασης της SDC2 στα κύτταρα του ινοσαρκώματος που λαμβάνουν IGF-I. Επομένως, η SDC2 φαίνεται να σταθεροποιεί τον υποδοχέα IGF-IR και να καθοδηγεί την ενδοκυττάρια σηματοδότησή του, ενισχύοντας τελικά την κινητικότητα των HT1080. Ο προτεινόμενος άξονας SDC2/IGF-IR, επακολουθούμενος από τους ERK/ezrin με τελικό αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση της ακτίνης, παρουσιάζεται λεπτομερώς στην Εικ.10.

Εν κατακλείδι, προτείνουμε μία πρωτότυπη στρατηγική, όπου η SDC2 συνεντοπίζεται με τον IGF-IR, σταθεροποιεί τον υποδοχέα και ενισχύει την ενδοκυττάρια σηματοδότηση του IGF-I. Η SDC2 μεσολαβεί στην επαγόμενη από τον IGF-IR ενεργοποίηση και επιστράτευση της ezrin και συνεισφέρει στην αναδιοργάνωση της ακτίνης, προωθώντας τελικά την πρόοδο της επαγόμενης από τον IGF-I μετανάστευσης των κυττάρων HT1080 του ινοσαρκώματος. Παράλληλα, η SDC2 ενισχύει την ενεργοποίηση του ERK1/2 από τον IGF-IR. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση της SDC2 στην μετανάστευση των κυττάρων B6FS. Το εύρημα αυτό όμως, είναι σε συμφωνία με τη διακριτική επίδραση της SDC2 στους όγκους μεσεγχυματικής προέλευσης. Περισσότερες μελέτες θα ήταν χρήσιμες για να διερευνηθεί περαιτέρω η σχέση της SDC2 με τον IGF-IR και το κύκλωμα που εμπλέκεται στη σηματοδότηση του IGF-I, προκειμένου ενδεχομένως να σχεδιαστεί μία πιο αποτελεσματική μοριακή θεραπεία για το ανθρώπινο ινοσάρκωμα.

6. Συμπεράσματα

Το ινοσάρκωμα αποτελεί έναν όγκο μεσεγχυματικής προέλευσης. Προερχόμενος από κακοήθεις ατρακτοειδείς ινοβλάστες, θεωρείται πλέον ως ένας σπάνιος όγκος. Μετά την ανάπτυξη ειδικών τεχνικών και τη δημιουργία λεπτομερούς κατάταξης των σαρκωμάτων μαλακών μορίων, αποτελεί μία διάγνωση εξ'αποκλεισμού. Πρόκειται όμως για έναν ιδιαίτερα επιθετικό όγκο με πτωχή πρόγνωση. Παράλληλα, δεν έχουν μελετηθεί ενδελεχώς οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανάπτυξή του. Το γεγονός αυτό, υπήρξε το κίνητρο για τη

συγκεκριμένη προσπάθεια αναγνώρισης σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών που επηρεάζουν την πρόοδο του όγκου.

Λαμβάνοντας υπόψιν τις δράσεις του TGFβ2 στον καρκίνο, ενός ενδογενούς αυξητικού παράγοντα των κυττάρων του ινοσαρκώματος, μελετήθηκε η συμμετοχή του στη προσκόλληση των κυττάρων, καθώς και πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτελεί αυτή τη διεργασία. Βρέθηκε ότι η SDC2 ρυθμίζει τη συγκεκριμένη κυτταρική λειτουργία ελέγχοντας την έκφραση, την παρουσίαση στη μεμβράνη και τη λειτουργικότητα του TGFRIII, ενός σημαντικού υποδοχέα του TGFβ2 καθώς και την ενεργοποίηση του Smad2, ενός κύριου μεσολαβητή της δράσης του TGFβ. Επιπλέον, η SDC2 φάνηκε να ελέγχει την κυτταρική προσκόλληση στο ινοσάρκωμα μέσω της ρύθμισης της έκφρασης της integrin β1, αλλά και της FAK, δύο μορίων απαραίτητων για την κυτταρική προσκόλληση.

Διαπιστώσαμε τη συμμετοχή των HS αλυσίδων των πρωτεογλυκανών στην προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος που προκαλείται από τον TGFβ2, καθώς και στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση του TGFβ2, μέσω ενεργοποίησης του Smad2.

Παράλληλα, γνωρίζοντας την καρκινογόνο δράση του IGF-I, μιας αναβολικής ορμόνης απαραίτητης για την ανάπτυξη, αναγνωρίσαμε τη SDC2 ως πιθανό συν-υποδοχέα του συγκεκριμένου αυξητικού παράγοντα. Επιπλέον, αναδείξαμε την αναγκαιότητά της για τη μετανάστευση των κυττάρων του ανθρώπινου ινοσαρκώματος που επάγεται από τον IGF-I. Παρατηρήσαμε ότι οι IGF-I/SDC2 ασκούν τέτοια επίδραση στο ινοσάρκωμα μέσω της ενεργοποίησης του ERK1/2, ενός κύριου διαμεσολαβητή της δράσης του IGF-I επί βασικών κυτταρικών λειτουργιών, καθώς και της ezrin, μίας ενδοκυττάριας πρωτεΐνης-γέφυρας, που αναδιαμορφώνει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης.

Συνοψίζοντας, με την παρούσα μελέτη διευκρινίστηκαν οι μηχανισμοί ρύθμισης δύο βασικών λειτουργιών του ινοσαρκώματος:

- **Μηχανισμός ρύθμισης κυτταρικής προσκόλλησης:** Οι αλυσίδες HS και ειδικότερα η συνδεκάνη 2 ρυθμίζουν την εξαρτώμενη από τον TGFβ2 προσκόλληση

των κυττάρων του ανθρώπινου ινοσαρκώματος HT1080 μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Smad2. Ειδικότερα, η SDC2 επηρεάζει την κυτταρική προσκόλληση και μέσω ρύθμισης της έκφρασης της integrin β1, αλλά και της FAK.

- **Μηχανισμός ρύθμισης κυτταρικής μετανάστευσης:** Η SDC2 αποτελεί έναν σημαντικό διαμεσολαβητή στην επαγόμενη από τον IGF-I μετανάστευση των HT1080 κυττάρων, λειτουργώντας ως συν-υποδοχέας για τον IGF-I και ενεργοποιώντας τον ERK1/2, καθώς και την ezrin, με τελικό αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Δημοσιεύσεις στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής

1. Datsis, G. A., Berdiaki, A., Nikitovic, D., Mytilineou, M., Katonis, P., Karamanos, N.K., Tzanakakis, G.N (2011). "Parathyroid hormone affects the fibroblast growth factor-proteoglycan signaling axis to regulate osteosarcoma cell migration." FEBS J**278**(19): 3782-3792.

2. Mytilinaiou, M., Bano, A., Nikitovic, D., Berdiaki, A., Voudouri, K., Kalogeraki, A., Karamanos, N.K., Tzanakakis, G.N (2013). "Syndecan-2 is a key regulator of transforming growth factor beta 2/Smad2-mediated adhesion in fibrosarcoma cells." IUBMB Life**65**(2): 134-143.

3. Nikitovic, D., Mytilinaiou, M., Berdiaki, A., Karamanos, N.K., Tzanakakis, G.N (2014). "Heparan sulfate proteoglycans and heparin regulate melanoma cell functions." Biochim Biophys Acta**1840**(8): 2471-2481.

4. Mytilinaiou, M., Nikitovic, D., Berdiaki, A., Kostouras, A., Papoutsidakis, A., Tsatsakis, A.M., Tzanakakis, G.N (2017). "Emerging roles of syndecan 2 in epithelial and mesenchymal cancer progression."IUBMB Life**69**(11): 824-833.

5. Mytilinaiou, M., Nikitovic, D., Berdiaki, A., Papoutsidakis, A., Papachristou, D.J., Tsatsakis, A.M., Tzanakakis, G.N (2017). "IGF-I regulates HT1080 fibrosarcoma cell migration through a syndecan-2/Erk/ezrin signaling axis." Exp Cell Res.**361**(1): 9-18.

Βιβλιογραφία

Afratis, N., et al. (2012). "Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment." FEBS J**279**(7): 1177-1197.

Afratis, N. A., et al. (2017). "IGF-IR cooperates with ERalpha to inhibit breast cancer cell aggressiveness by regulating the expression and localisation of ECM molecules." Sci Rep**7**: 40138.

Alexius-Lindgren, M., et al. (2014). "The RECK gene and biological malignancy--its significance in angiogenesis and inhibition of matrix metalloproteinases." Anticancer Res**34**(8): 3867-3873.

Anttonen, A., et al. (1999). "Syndecan-1 expression has prognostic significance in head and neck carcinoma." Br J Cancer**79**(3-4): 558-564.

Anttonen, A., et al. (2001). "High syndecan-1 expression is associated with favourable outcome in squamous cell lung carcinoma treated with radical surgery." Lung Cancer**32**(3): 297-305.

Armakolas, A., et al. (2015). "Oncogenic Role of the Ec Peptide of the IGF-1Ec Isoform in Prostate Cancer."Mol Med**21**: 167-179.

Armakolas, N., et al. (2016). "The role of the IGF-1 Ec in myoskeletal system and osteosarcoma pathophysiology."Crit Rev Oncol Hematol**108**: 137-145.

Augsburger, D., et al. (2017). "Current diagnostics and treatment of fibrosarcoma -perspectives for future therapeutic targets and strategies." Oncotarget**8**(61): 104638-104653.

Baba, F., et al. (2006). "Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype." Breast Cancer Res Treat**98**(1): 91-98.

Baghy, K., et al. (2016). "Proteoglycans in liver cancer."World J Gastroenterol**22**(1): 379-393.

Bahrami, A. and A. L. Folpe (2010). "Adult-type fibrosarcoma: A reevaluation of 163 putative cases diagnosed at a single institution over a 48-year period." Am J Surg Pathol**34**(10): 1504-1513.

Balamuth, N. J. and R. B. Womer (2010)."Ewing's sarcoma." Lancet Oncol**11**(2): 184-192.

Beauvais, D. M. and A. C. Rapraeger (2003). "Syndecan-1-mediated cell spreading requires signaling by alphavbeta3 integrins in human breast carcinoma cells." Exp Cell Res**286**(2): 219-232.

Beauvais, D. M. and A. C. Rapraeger (2010). "Syndecan-1 couples the insulin-like growth factor-1 receptor to inside-out integrin activation." J Cell Sci**123**(Pt 21): 3796-3807.

Benet, M., et al. (2012). "Wild type N-ras displays anti-malignant properties, in part by downregulating decorin." J Cell Physiol**227**(6): 2341-2351.

Berdiaki, A., et al. (2009). "bFGF induces changes in hyaluronan synthase and hyaluronidase isoform expression and modulates the migration capacity of fibrosarcoma cells." Biochim Biophys Acta**1790**(10): 1258-1265.

Berdiaki, A., et al. (2008). "Regulation of hyaluronan and versican deposition by growth factors in fibrosarcoma cell lines."Biochim Biophys Acta**1780**(2): 194-202.

Bieghs, L., et al. (2016). "The insulin-like growth factor system in multiple myeloma: diagnostic and therapeutic potential." Oncotarget**7**(30): 48732-48752.

Bilandzic, M. and K. L. Stenvers (2011). "Betaglycan: a multifunctional accessory." Mol Cell Endocrinol**339**(1-2): 180-189.

Blizniukov, O. P. and A. Zamogil'naia Ia (2012). "[Pleomorphic fibrosarcoma]." Vopr Onkol**58**(1): 54-60.

Blobe, G. C., et al. (2001). "A novel mechanism for regulating transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling.Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC."J Biol Chem**276**(43): 39608-39617.

Brahmkhatri, V. P., et al. (2015). "Insulin-like growth factor system in cancer: novel targeted therapies." Biomed Res Int**2015**: 538019.

Bretscher, A., et al. (1997). "Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures." J Cell Sci**110 (Pt 24)**: 3011-3018.

Buraschi, S., et al. (2017). "Decorin is a devouring proteoglycan: Remodeling of intracellular catabolism via autophagy and mitophagy." Matrix Biol.

Butler, A. A., et al. (1998). "Stimulation of tumor growth by recombinant human insulin-like growth factor-I (IGF-I) is dependent on the dose and the level of IGF-I receptor expression." Cancer Res**58**(14): 3021-3027.

Carey, D. J. (1997). "Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors." Biochem J**327 (Pt 1)**: 1-16.

Cevikbas, F., et al. (2008). "Unilateral nephrectomy leads to up-regulation of syndecan-2- and TGF-beta-mediated glomerulosclerosis in syndecan-4 deficient male mice." Matrix Biol**27**(1): 42-52.

Chalkiadaki, G., et al. (2009). "Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism." Int J Biochem Cell Biol**41**(6): 1323-1331.

Chan, G., et al. (2007). "Malignant transformation of a solitary fibrous tumor of the liver and intractable hypoglycemia."J Hepatobiliary Pancreat Surg**14**(6): 595-599.

Cheifetz, S. and J. Massague (1989)."Transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor proteoglycan.Cell surface expression and ligand binding in the absence of glycosaminoglycan chains."J Biol Chem**264**(20): 12025-12028.

Chen, C. L., et al. (2006). "Cellular heparan sulfate negatively modulates transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) responsiveness in epithelial cells." J Biol Chem**281**(17): 11506-11514.

Chen, L., et al. (2004). "Syndecan-2 regulates transforming growth factor-beta signaling." J Biol Chem**279**(16): 15715-15718.

Chen, Y., et al. (2005). "Matrix contraction by dermal fibroblasts requires transforming growth factor-beta/activin-linked kinase 5, heparan sulfate-containing proteoglycans, and MEK/ERK: insights into pathological scarring in chronic fibrotic disease." Am J Pathol**167**(6): 1699-1711.

Chen, H., et al. (2009). "Extracellular signal-regulated kinase signaling pathway regulates breast cancer cell migration by maintaining slug expression." Cancer Res**69**(24): 9228-9235.

Chen, Y. F., et al. (2009). "Motor protein-dependent membrane trafficking of KCl cotransporter-4 is important for cancer cell invasion." Cancer Res**69**(22): 8585-8593.

Chetram, M. A. and C. V. Hinton (2012). "PTEN regulation of ERK1/2 signaling in cancer." J Recept Signal Transduct Res**32**(4): 190-195.

Chitnis, M. M., et al. (2008). "The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway."Clin Cancer Res**14**(20): 6364-6370.

Choi, S., et al. (2009). "Syndecan-2 overexpression regulates adhesion and migration through cooperation with integrin alpha2." Biochem Biophys Res Commun**384**(2): 231-235.

Choi, Y., et al. (2010). "Syndecan-2 regulates cell migration in colon cancer cells through Tiam1-mediated Rac activation." Biochem Biophys Res Commun**391**(1): 921-925.

Choi, S., et al. (2015). "Shed syndecan-2 enhances tumorigenic activities of colon cancer cells." Oncotarget**6**(6): 3874-3886.

Choi, Y., et al. (2015). "Trans-regulation of Syndecan Functions by Hetero-oligomerization." J Biol Chem**290**(27): 16943-16953.

Choi, S., et al. (2017). "Inflammatory hypoxia induces syndecan-2 expression through IL-1beta-mediated FOXO3a activation in colonic epithelia." FASEB J**31**(4): 1516-1530.

Clarke, M. F., et al. (2006). "Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells." Cancer Res**66**(19): 9339-9344.

Clasper, S., et al. (2008). "A novel gene expression profile in lymphatics associated with tumor growth and nodal metastasis." Cancer Res**68**(18): 7293-7303.

Colladel, R., et al. (2016). "MULTIMERIN2 binds VEGF-A primarily via the carbohydrate chains exerting an angiostatic function and impairing tumor growth." Oncotarget**7**(2): 2022-2037.

Conejo, J. R., et al. (2000). "Syndecan-1 expression is up-regulated in pancreatic but not in other gastrointestinal cancers." Int J Cancer**88**(1): 12-20.

Contreras, H. R., et al. (2001). "Syndecan-2 expression in colorectal cancer-derived HT-29 M6 epithelial cells induces a migratory phenotype." Biochem Biophys Res Commun**286**(4): 742-751.

Cristea, S. and J. Sage (2016). "Is the Canonical RAF/MEK/ERK Signaling Pathway a Therapeutic Target in SCLC?" J Thorac Oncol**11**(8): 1233-1241.

Cukierman, E. and D. E. Bassi (2012). "The mesenchymal tumor microenvironment: a drug-resistant niche." Cell Adh Migr**6**(3): 285-296.

Dasgupta, R. and D. Rodeberg (2016). "Non-rhabdomyosarcoma." Semin Pediatr Surg**25**(5): 284-289.

Datsis, G. A., et al. (2011). "Parathyroid hormone affects the fibroblast growth factor-proteoglycan signaling axis to regulate osteosarcoma cell migration." FEBS J**278**(19): 3782-3792.

Dela Cruz, F. S. (2013). "Cancer stem cells in pediatric sarcomas." Front Oncol**3**: 168.

De Oliveira, T., et al. (2012). "Syndecan-2 promotes perineural invasion and cooperates with K-ras to induce an invasive pancreatic cancer cell phenotype." Mol Cancer**11**: 19.

del Re, E., et al. (2004). "In the absence of type III receptor, the transforming growth factor (TGF)-beta type II-B receptor requires the type I receptor to bind TGF-beta2." J Biol Chem**279**(21): 22765-22772.

De Rossi, G., et al. (2014). "Shed syndecan-2 inhibits angiogenesis." J Cell Sci**127**(Pt 21): 4788-4799.

Diamantopoulou, Z., et al. (2012). "Loss of receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta (RPTPbeta/zeta) promotes prostate cancer metastasis." J Biol Chem**287**(48): 40339-40349.

Dieudonne, F. X., et al. (2010). "High Wnt signaling represses the proapoptotic proteoglycan syndecan-2 in osteosarcoma cells." Cancer Res**70**(13): 5399-5408.

Dieudonne, F. X., et al. (2012). "Targeted inhibition of T-cell factor activity promotes syndecan-2 expression and sensitization to doxorubicin in osteosarcoma cells and bone tumors in mice." J Bone Miner Res**27**(10): 2118-2129.

Dobra, K., et al. (2003). "Growth factors regulate the expression profile of their syndecan co-receptors and the differentiation of mesothelioma cells." Anticancer Res**23**(3B): 2435-2444.

Duan, C. (2003). "The chemotactic and mitogenic responses of vascular smooth muscle cells to insulin-like growth factor-I require the activation of ERK1/2." Mol Cell Endocrinol**206**(1-2): 75-83.

Ducimetiere, F., et al. (2011)."Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing."PLoS One**6**(8): e20294.

Edwards, T. M., et al. (2017). "Congenital Infantile Fibrosarcoma in the Premature Infant." Adv Neonatal Care**17**(6): 440-450.

Ellina, M. I., et al. (2014). "EGFR and HER2 exert distinct roles on colon cancer cell functional properties and expression of matrix macromolecules." Biochim Biophys Acta**1840**(8): 2651-2661.

Endo, K., et al. (2003). "Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration." J Biol Chem**278**(42): 40764-40770.

Essner, J. J., et al. (2006). "Syndecan-2."Int J Biochem Cell Biol**38**(2): 152-156.

Fanhchaksai, K., et al. (2016). "Host stromal versican is essential for cancer-associated fibroblast function to inhibit cancer growth." Int J Cancer**138**(3): 630-641.

Farnedi, A., et al. (2015). "Proteoglycan-based diversification of disease outcome in head and neck cancer patients identifies NG2/CSPG4 and syndecan-2 as unique relapse and overall survival predicting factors." BMC Cancer**15**: 352.

Fears, C. Y., et al. (2006). "Syndecan-2 is expressed in the microvasculature of gliomas and regulates angiogenic processes in microvascular endothelial cells." J Biol Chem**281**(21): 14533-14536.

Fehon, R. G., et al. (2010). "Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins."Nat Rev Mol Cell Biol**11**(4): 276-287.

Feng, B. H., et al. (2013). "CD133+ subpopulation of the HT1080 human fibrosarcoma cell line exhibits cancer stem-like characteristics." Oncol Rep**30**(2): 815-823.

Ferrari, A., et al. (2005). "Adult-type soft tissue sarcomas in pediatric-age patients: experience at the Istituto Nazionale Tumori in Milan." J Clin Oncol**23**(18): 4021-4030.

Fidler, I. J., et al. (1994). "Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment." Cancer Metastasis Rev**13**(2): 209-222.

Fiorelli, A., et al. (2011). "Interplay between steroid receptors and neoplastic progression in sarcoma tumors." J Cell Physiol**226**(11): 2997-3003.

Fisher, C. (2010). "Soft tissue sarcomas with non-EWS translocations: molecular genetic features and pathologic and clinical correlations." Virchows Arch**456**(2): 153-166.

Folpe, A. L. (2014). "Fibrosarcoma: a review and update." Histopathology**64**(1): 12-25.

Fourre, N., et al. (2008). "Extracellular matrix proteins protect human HT1080 cells against the antimigratory effect of doxorubicin." Cancer Sci**99**(8): 1699-1705.

Fraley, S. I., et al. (2010). "A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility." Nat Cell Biol**12**(6): 598-604.

Franchi, A. and M. Santucci (2013). "The contribution of electron microscopy to the characterization of soft tissue fibrosarcomas." Ultrastruct Pathol**37**(1): 9-14.

Fthenou, E., et al. (2006). "Chondroitin sulfate A chains enhance platelet derived growth factor-mediated signalling in fibrosarcoma cells." Int J Biochem Cell Biol**38**(12): 2141-2150.

Fthenou, E., et al. (2009). "Chondroitin sulfate A regulates fibrosarcoma cell adhesion, motility and migration through JNK and tyrosine kinase signaling pathways." In Vivo**23**(1): 69-76.

Furstenberger, G. and H. J. Senn (2002)."Insulin-like growth factors and cancer."Lancet Oncol**3**(5): 298-302.

Galante, L. L. and J. E. Schwarzbauer (2007). "Requirements for sulfate transport and the diastrophic dysplasia sulfate transporter in fibronectin matrix assembly." J Cell Biol**179**(5): 999-1009.

Gallagher, E. J. and D. LeRoith (2011). "Minireview: IGF, Insulin, and Cancer." Endocrinology**152**(7): 2546-2551.

Garcia-Suarez, O., et al. (2014). "Neuroendocrine tumors show altered expression of chondroitin sulfate, glypican 1, glypican 5, and syndecan 2 depending on their differentiation grade." Front Oncol**4**: 15.

Gary, R. and A. Bretscher (1995). "Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site." Mol Biol Cell**6**(8): 1061-1075.

Gatza, C. E., et al. (2010). "Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer." Cell Signal**22**(8): 1163-1174.

Gialeli, C., et al. (2013). "Expression of matrix macromolecules and functional properties of EGF-responsive colon cancer cells are inhibited by panitumumab." Invest New Drugs**31**(3): 516-524.

Gokden, N., et al. (2006). "Expression of CD138 (Syndecan-1) in renal cell carcinoma is reduced with increasing nuclear grade." Appl Immunohistochem Mol Morphol**14**(2): 173-177.

Gomez-Herrera, Z., et al. (2018). "Proteoglycans as potential biomarkers in odontogenic tumors." J Oral Maxillofac Pathol**22**(1): 98-103.

Gopal, S., et al. (2015). "Transmembrane proteoglycans control stretch-activated channels to set cytosolic calcium levels." J Cell Biol**210**(7): 1199-1211.

Gopal, S., et al. (2016)."Redefining the role of syndecans in C. elegans biology."Worm**5**(1): e1142042.

Granes, F., et al. (2000). "Ezrin links syndecan-2 to the cytoskeleton." J Cell Sci**113 (Pt 7)**: 1267-1276.

Granes, F., et al. (2003). "Identification of a novel Ezrin-binding site in syndecan-2 cytoplasmic domain." FEBS Lett**547**(1-3): 212-216.

Grant, D. S., et al. (2002). "Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis." Oncogene**21**(31): 4765-4777.

Grootjans, J. J., et al. (1997). "Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains." Proc Natl Acad Sci U S A**94**(25): 13683-13688.

Guan, J. L. (2010). "Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer." IUBMB Life**62**(4): 268-276.

Habuchi, H., et al. (2004). "Sulfation pattern in glycosaminoglycan: does it have a code?" Glycoconj J**21**(1-2): 47-52.

Han, I., et al. (2004). "New insights into syndecan-2 expression and tumourigenic activity in colon carcinoma cells." J Mol Histol**35**(3): 319-326.

Han, S., et al. (2010). "Molecular mechanism of type I collagen homotrimer resistance to mammalian collagenases." J Biol Chem**285**(29): 22276-22281.

Haroon, Z. A., et al. (2004). "Loss of metal transcription factor-1 suppresses tumor growth through enhanced matrix deposition." FASEB J**18**(11): 1176-1184.

Hauck, C. R., et al. (2002). "The focal adhesion kinase--a regulator of cell migration and invasion."IUBMB Life**53**(2): 115-119.

Heidegger, I., et al. (2015). "The insulin-like growth factor (IGF) axis as an anticancer target in prostate cancer."Cancer Lett**367**(2): 113-121.

Herman, M. P., et al. (2001). "Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis." J Clin Invest**107**(9): 1117-1126.

Hiradfar, A., et al. (2015). "Primary Pulmonary Fibrosarcoma With Bone Metastasis: a Successful Treatment With Post-Operation Adjuvant Chemotherapy." Iran J Cancer Prev**8**(3): e2328.

Hrabar, D., et al. (2010). "Epithelial and stromal expression of syndecan-2 in pancreatic carcinoma." Anticancer Res**30**(7): 2749-2753.

Hu, M., et al. (1997). "Purification and characterization of human lung fibroblast motility-stimulating factor for human soft tissue sarcoma cells: identification as an NH2-terminal fragment of human fibronectin." Cancer Res**57**(16): 3577-3584.

Huang, H. Y., et al. (2010). "Prognostic implication of ezrin overexpression in myxofibrosarcomas."Ann Surg Oncol**17**(12): 3212-3219.

Huang, X., et al. (2015). "IGF1R- and ROR1-Specific CAR T Cells as a Potential Therapy for High Risk Sarcomas." PLoS One**10**(7): e0133152.

Hull, K. L. and S. Harvey (2014). "Growth hormone and reproduction: a review of endocrine and autocrine/paracrine interactions." Int J Endocrinol**2014**: 234014.

Hurskainen, M., et al. (2010). "Recombinant human collagen XV regulates cell adhesion and migration." J Biol Chem**285**(8): 5258-5265.

Hwang, Y. P., et al. (2011). "Suppression of EGF-induced tumor cell migration and matrix metalloproteinase-9 expression by capsaicin via the inhibition of EGFR-mediated FAK/Akt, PKC/Raf/ERK, p38 MAPK, and AP-1 signaling." Mol Nutr Food Res**55**(4): 594-605.

Hynes, R. O. (2009). "The extracellular matrix: not just pretty fibrils." Science**326**(5957): 1216-1219.

Inman, G. J. (2011). "Switching TGFbeta from a tumor suppressor to a tumor promoter."Curr Opin Genet Dev**21**(1): 93-99.

Iozzo, R. V. and L. Schaefer (2015). "Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans." Matrix Biol**42**: 11-55.

Iwao, K., et al. (2009). "Heparan sulfate deficiency leads to Peters anomaly in mice by disturbing neural crest TGF-beta2 signaling." J Clin Invest**119**(7): 1997-2008.

Jang, B., et al. (2017). "Syndecan-2 cytoplasmic domain up-regulates matrix metalloproteinase-7 expression via the protein kinase Cgamma-mediated FAK/ERK signaling pathway in colon cancer." J Biol Chem**292**(39): 16321-16332.

Jeney, A., et al. (1990). "Glycosaminoglycans as novel target in antitumor therapy." Tokai J Exp Clin Med**15**(2-3): 167-177.

Jeong, W., et al. (2014). "Insulin-like growth factor I induces proliferation and migration of porcine trophectoderm cells through multiple cell signaling pathways, including protooncogenic protein kinase 1 and mitogen-activated protein kinase." Mol Cell Endocrinol**384**(1-2): 175-184.

Johnson, G. A., et al. (2014). "Osteopontin: a leading candidate adhesion molecule for implantation in pigs and sheep." J Anim Sci Biotechnol**5**(1): 56.

Kahari, V. M., et al. (1991). "Differential modulation of basement membrane gene expression in human fibrosarcoma HT-1080 cells by transforming growth factor-beta 1. Enhanced type IV collagen and fibronectin gene expression correlates with altered culture phenotype of the cells." Lab Invest**64**(6): 807-818.

Kanteti, R., et al. (2016). "FAK and paxillin, two potential targets in pancreatic cancer." Oncotarget**7**(21): 31586-31601.

Karamanos, N. K. (2017). "Matrix pathobiology-central roles for proteoglycans and heparanase in health and disease." FEBS J**284**(1): 7-9.

Kashyap, M. K. (2015). "Role of insulin-like growth factor-binding proteins in the pathophysiology and tumorigenesis of gastroesophageal cancers."Tumour Biol**36**(11): 8247-8257.

Kim, S. H., et al. (2011). "Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor." J Endocrinol**209**(2): 139-151.

Kim, S. H., et al. (2011). "Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor." J Endocrinol**209**(2): 139-151.

Klass, C. M., et al. (2000). "Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan." J Cell Sci**113 (Pt 3)**: 493-506.

Klement, R. J. and M. K. Fink (2016). "Dietary and pharmacological modification of the insulin/IGF-1 system: exploiting the full repertoire against cancer." Oncogenesis**5**: e193.

Koistinaho, M. and J. Koistinaho (2002). "Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia." Glia**40**(2): 175-183.

Kolb, E. A. and R. Gorlick (2009)."Development of IGF-IR Inhibitors in Pediatric Sarcomas."Curr Oncol Rep**11**(4): 307-313.

Kousidou, O., et al. (2008). "Estradiol-estrogen receptor: a key interplay of the expression of syndecan-2 and metalloproteinase-9 in breast cancer cells." Mol Oncol**2**(3): 223-232.

Kouvidi, K., et al. (2011). "Role of receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM) in low molecular weight hyaluronan (LMWHA)-mediated fibrosarcoma cell adhesion."J Biol Chem**286**(44): 38509-38520.

Kouvidi, K., et al. (2014). "Hyaluronan/RHAMM interactions in mesenchymal tumor pathogenesis: role of growth factors." Adv Cancer Res**123**: 319-349.

Kouvidi, K., et al. (2016). "Receptor for hyaluronic acid- mediated motility (RHAMM) regulates HT1080 fibrosarcoma cell proliferation via a beta-catenin/c-myc signaling axis." Biochim Biophys Acta**1860**(4): 814-824.

Kurtmen, B. T., et al. (2017). "Primary Ovarian Fibrosarcoma-An Unusual Tumor in an Adolescent: Case Report and Review of the Pediatric Literature." J Pediatr Adolesc Gynecol**30**(6): 655-658.

Kusano, Y., et al. (2000). "Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin alpha5beta1: structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin." Exp Cell Res**256**(2): 434-444.

Kwak, H. J., et al. (2006). "Transforming growth factor-beta1 induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression via activation of extracellular signal-regulated kinase and Sp1 in human fibrosarcoma cells." Mol Cancer Res**4**(3): 209-220.

Kwon, M. J., et al. (2013). "The extracellular domain of syndecan-2 regulates the interaction of HCT116 human colon carcinoma cells with fibronectin." Biochem Biophys Res Commun**431**(3): 415-420.

Kwon, M. J., et al. (2014). "Interleukin-1alpha promotes extracellular shedding of syndecan-2 via induction of matrix metalloproteinase-7 expression." Biochem Biophys Res Commun**446**(2): 487-492.

Kwon, M. J., et al. (2015). "A unique phenylalanine in the transmembrane domain strengthens homodimerization of the syndecan-2 transmembrane domain and functionally regulates syndecan-2." J Biol Chem**290**(9): 5772-5782.

Kwon, M. J., et al. (2016). "The Conserved Phenylalanine in the Transmembrane Domain Enhances Heteromeric Interactions of Syndecans." J Biol Chem**291**(2): 872-881.

Labropoulou, V. T., et al. (2013). "Expression of syndecan-4 and correlation with metastatic potential in testicular germ cell tumours." Biomed Res Int**2013**: 214864.

Lai, J., et al. (2003). "Loss of HSulf-1 up-regulates heparin-binding growth factor signaling in cancer." J Biol Chem**278**(25): 23107-23117.

Lee, J. H., et al. (2009). "Syndecan-2 regulates the migratory potential of melanoma cells." J Biol Chem**284**(40): 27167-27175.

Lee, H., et al. (2011). "Syndecan-2 cytoplasmic domain regulates colon cancer cell migration via interaction with syntenin-1." Biochem Biophys Res Commun**409**(1):
148-153.

Leiphrakpam, P. D., et al. (2014). "Ezrin expression and cell survival regulation in colorectal cancer."Cell Signal**26**(5): 868-879.

Lendorf, M. E., et al. (2011). "Syndecan-1 and syndecan-4 are independent indicators in breast carcinoma." J Histochem Cytochem**59**(6): 615-629.

Leocata, P., et al. (2007). "Syndecan-1 and Wingless-type protein-1 in human ameloblastomas." J Oral Pathol Med**36**(7): 394-399.

LeRoith, D. and C. T. Roberts, Jr. (2003)."The insulin-like growth factor system and cancer."Cancer Lett**195**(2): 127-137.

Li, Y., et al. (2004). "Cleavage of lumican by membrane-type matrix metalloproteinase-1 abrogates this proteoglycan-mediated suppression of tumor cell colony formation in soft agar." Cancer Res**64**(19): 7058-7064.

Li, F., et al. (2012). "Superoxide plays critical roles in electrotaxis of fibrosarcoma cells via activation of ERK and reorganization of the cytoskeleton." Free Radic Biol Med**52**(9): 1888-1896.

Li, H., et al. (2014). "Ubiquitin ligase Cbl-b represses IGF-I-induced epithelial mesenchymal transition via ZEB2 and microRNA-200c regulation in gastric cancer cells." Mol Cancer**13**: 136.

Lim, H. C. and J. R. Couchman (2014). "Syndecan-2 regulation of morphology in breast carcinoma cells is dependent on RhoGTPases." Biochim Biophys Acta**1840**(8): 2482-2490.

Lim, H. C., et al. (2015). "Cell surface heparan sulfate proteoglycans control adhesion and invasion of breast carcinoma cells." Mol Cancer**14**: 15.

Lopez-Casillas, F., et al. (1994). "Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites." J Cell Biol**124**(4): 557-568.

Lopez-Casillas, F., et al. (1993). "Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor." Cell**73**(7): 1435-1444.

Lu, N., et al. (2010). "The human alpha11 integrin promoter drives fibroblast-restricted expression in vivo and is regulated by TGF-beta1 in a Smad- and Sp1-dependent manner." Matrix Biol**29**(3): 166-176.

Lu, P., et al. (2012). "The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression." J Cell Biol**196**(4): 395-406.

Lyon, M., et al. (1997). "The interaction of the transforming growth factor-betas with heparin/heparan sulfate is isoform-specific." J Biol Chem**272**(29): 18000-18006.

Makareeva, E., et al. (2010). "Carcinomas contain a matrix metalloproteinase-resistant isoform of type I collagen exerting selective support to invasion." Cancer Res**70**(11): 4366-4374.

Maki, R. G. (2010). "Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer." J Clin Oncol**28**(33): 4985-4995.

Malempati, S., et al. (2012). "Phase I/II trial and pharmacokinetic study of cixutumumab in pediatric patients with refractory solid tumors and Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group." J Clin Oncol**30**(3): 256-262.

Mansouri, R., et al. (2015). "Role of syndecan-2 in osteoblast biology and pathology."Bonekey Rep**4**: 666.

Marion, A., et al. (2012). "Calpain-6 is an endothelin-1 signaling dependent protective factor in chemoresistant osteosarcoma." Int J Cancer**130**(11): 2514-2525.

Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." Annu Rev Biochem**67**: 753-791.

Massague, J., et al. (2000). "TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders."Cell**103**(2): 295-309.

Mathiak, M., et al. (1997). "A role for perlecan in the suppression of growth and invasion in fibrosarcoma cells." Cancer Res**57**(11): 2130-2136.

Matsuda, K., et al. (2001). "Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells." Cancer Res**61**(14): 5562-5569.

Matsunaga, Y., et al. (2017). "The effect of forced expression of mutated K-RAS gene on gastrointestinal cancer cell lines and the IGF-1R targeting therapy." Mol Carcinog**56**(2): 515-526.

McCaffrey, T. A., et al. (1994). "Protection of transforming growth factor-beta 1 activity by heparin and fucoidan."J Cell Physiol**159**(1): 51-59.

Meister, M., et al. (2013). "Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Recount." Int J Mol Sci**14**(3): 4854-4884.

Meulmeester, E. and P. Ten Dijke (2011)."The dynamic roles of TGF-beta in cancer."J Pathol**223**(2): 205-218.

Modrowski, D., et al. (2000). "Syndecan-2 is involved in the mitogenic activity and signaling of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in osteoblasts." J Biol Chem**275**(13): 9178-9185.

Modrowski, D., et al. (2005). "Syndecan-2 overexpression induces osteosarcoma cell apoptosis: Implication of syndecan-2 cytoplasmic domain and JNK signaling." Bone**37**(2): 180-189.

Mody, R. J., et al. (2015)."Integrative Clinical Sequencing in the Management of Refractory or Relapsed Cancer in Youth."JAMA**314**(9): 913-925.

Mott, J. D., et al. (2000). "Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor." J Biol Chem**275**(2): 1384-1390.

Mundhenke, C., et al. (2002). "Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas." Am J Pathol**160**(1): 185-194.

Munesue, S., et al. (2002). "The role of syndecan-2 in regulation of actin-cytoskeletal organization of Lewis lung carcinoma-derived metastatic clones." Biochem J**363**(Pt 2): 201-209.

Munesue, S., et al. (2007). "A novel function of syndecan-2, suppression of matrix metalloproteinase-2 activation, which causes suppression of metastasis." J Biol Chem**282**(38): 28164-28174.

Myren, M., et al. (2016). "Biglycan potentially regulates angiogenesis during fracture repair by altering expression and function of endostatin." Matrix Biol**52-54**: 141-150.

Mytilinaiou, M., et al. (2013). "Syndecan-2 is a key regulator of transforming growth factor beta 2/Smad2-mediated adhesion in fibrosarcoma cells." IUBMB Life**65**(2): 134-143.

Na, K. Y., et al. (2012). "Syndecan-4 and fibronectin in osteosarcoma." Pathology**44**(4): 325-330.

Nagase, H., et al. (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovasc Res**69**(3): 562-573.

Nagini, S. (2012). "RECKing MMP: relevance of reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs as a prognostic marker and therapeutic target for cancer (a review)." Anticancer Agents Med Chem**12**(7): 718-725.

Nam, H. and M. M. Kim (2013). "Eugenol with antioxidant activity inhibits MMP-9 related to metastasis in human fibrosarcoma cells." Food Chem Toxicol**55**: 106-112.

Naftolin, F., et al. (2007). "Estrogen-induced hypothalamic synaptic plasticity and pituitary sensitization in the control of the estrogen-induced gonadotrophin surge." Reprod Sci**14**(2): 101-116.

Nielsen, R. H., et al. (2014). "Increase in tendon protein synthesis in response to insulin-like growth factor-I is preserved in elderly men." J Appl Physiol (1985)**116**(1): 42-46.

Nikitovic, D., et al. (2008). "Chondroitin sulfate and heparan sulfate-containing proteoglycans are both partners and targets of basic fibroblast growth factor-mediated proliferation in human metastatic melanoma cell lines." Int J Biochem Cell Biol**40**(1): 72-83.

Nikitovic, D., et al. (2013). "Could growth factor-mediated extracellular matrix deposition and degradation offer the ground for directed pharmacological targeting in fibrosarcoma?" Curr Med Chem**20**(23): 2868-2880.

Nikitovic, D., et al. (2013). "The roles of hyaluronan/RHAMM/CD44 and their respective interactions along the insidious pathways of fibrosarcoma progression."Biomed Res Int**2013**: 929531.

Nikitovic, D., et al. (2014). "Heparan sulfate proteoglycans and heparin regulate melanoma cell functions." Biochim Biophys Acta**1840**(8): 2471-2481.

Niu, F., et al. (2017). "Stool DNA Test of Methylated syndecan-2 for the Early Detection of Colorectal Neoplasia." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.

Noguer, O., et al. (2009). "Syndecan-2 downregulation impairs angiogenesis in human microvascular endothelial cells." Exp Cell Res**315**(5): 795-808.

Noriega-Guerra, H., et al. (2018). "ADAMTS-1 disrupts HGF/c-MET signaling and HGF-stimulated cellular processes in fibrosarcoma." Exp Cell Res**363**(2): 271-282.

Noujaim, J., et al. (2016). "Histology-Driven Therapy: The Importance of Diagnostic Accuracy in Guiding Systemic Therapy of Soft Tissue Tumors." Int J Surg Pathol**24**(1): 5-15.

O'Connell, M. P., et al. (2009). "Heparan sulfate proteoglycan modulation of Wnt5A signal transduction in metastatic melanoma cells." J Biol Chem**284**(42): 28704-28712.

Oh, E. S. and J. R. Couchman (2004). "Syndecans-2 and -4; close cousins, but not identical twins." Mol Cells**17**(2): 181-187.

Olmos, D., et al. (2010). "Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study." Lancet Oncol**11**(2): 129-135.

Orbach, D., et al. (2010). "Infantile fibrosarcoma: management based on the European experience." J Clin Oncol**28**(2): 318-323.

Orbach, D., et al. (2016). "Conservative strategy in infantile fibrosarcoma is possible: The European paediatric Soft tissue sarcoma Study Group experience." Eur J Cancer**57**: 1-9.

Orosco, A., et al. (2007). "Syndecan-2 affects the basal and chemotherapy-induced apoptosis in osteosarcoma." Cancer Res**67**(8): 3708-3715.

Owens, L. V., et al. (1995). "Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors." Cancer Res**55**(13): 2752-2755.

Ozdemir, O., et al. (2016). "Primary ovarian fibrosarcoma: a case report and review of the literature." J Exp Ther Oncol**11**(3): 225-235.

Pap, Z., et al. (2009). "An immunohistochemical study of colon adenomas and carcinomas: E-cadherin, Syndecan-1, Ets-1." Pathol Oncol Res**15**(4): 579-587.

Papagelopoulos, P. J., et al. (2002). "Clinicopathologic features, diagnosis, and treatment of fibrosarcoma of bone." Am J Orthop (Belle Mead NJ)**31**(5): 253-257.

Park, H., et al. (2002). "Syndecan-2 mediates adhesion and proliferation of colon carcinoma cells." J Biol Chem**277**(33): 29730-29736.

Park, H., et al. (2005). "Focal adhesion kinase regulates syndecan-2-mediated tumorigenic activity of HT1080 fibrosarcoma cells." Cancer Res**65**(21): 9899-9905.

Parida, L., et al. (2013). "Clinical management of infantile fibrosarcoma: a retrospective single-institution review." Pediatr Surg Int**29**(7): 703-708.

PDQ® Pediatric Treatment Editorial Board.PDQ Childhood Soft Tissue Sarcoma Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. (2018).''Childhood Soft Tissue Sarcoma Treatment (PDQ®).Health professional version.''PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. PMID: 26389361

Peplow, P. V. and M. P. Chatterjee (2013)."A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration."Cytokine62(1): 1-21.

Peterfia, B., et al. (2012). "Syndecan-1 enhances proliferation, migration and metastasis of HT-1080 cells in cooperation with syndecan-2." PLoS One**7**(6): e39474.

Peterfia, B., et al. (2006). "[Role of syndecan-1 proteoglycan in the invasiveness of HT-1080 fibrosarcoma]."Magy Onkol**50**(2): 115-120.

Poland, J., et al. (2002). "Study of therapy resistance in cancer cells with functional proteome analysis." Clin Chem Lab Med**40**(3): 221-234.

Purushothaman, A., et al. (2011). "Heparanase-mediated loss of nuclear syndecan-1 enhances histone acetyltransferase (HAT) activity to promote expression of genes that drive an aggressive tumor phenotype." J Biol Chem**286**(35): 30377-30383.

Raman, K. and B. Kuberan (2010)."Chemical Tumor Biology of Heparan Sulfate Proteoglycans."Curr Chem Biol**4**(1): 20-31.

Rangel, M. P., et al. (2018). "Biomolecular analysis of matrix proteoglycans as biomarkers in non small cell lung cancer." Glycoconj J**35**(2): 233-242.

Rasheed, S., et al. (1974). "Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)." Cancer**33**(4): 1027-1033.

Reya, T., et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature**414**(6859): 105-111.

Ricoveri, W. and R. Cappelletti (1986). "Heparan sulfate endoglycosidase and metastatic potential in murine fibrosarcoma and melanoma." Cancer Res**46**(8): 3855-3861.

Ridley, R. C., et al. (1993). "Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen." Blood**81**(3): 767-774.

Riedemann, J. and V. M. Macaulay (2006)."IGF1R signalling and its inhibition."Endocr Relat Cancer**13 Suppl 1**: S33-43.

Ryu, H. Y., et al. (2009). "Syndecan-2 functions as a docking receptor for pro-matrix metalloproteinase-7 in human colon cancer cells." J Biol Chem**284**(51): 35692-35701.

Samani, A. A., et al. (2007). "The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights." Endocr Rev**28**(1): 20-47.

Sargar, K. M., et al. (2016). "Pediatric Fibroblastic and Myofibroblastic Tumors: A Pictorial Review." Radiographics**36**(4): 1195-1214.

Saygideger-Kont, Y., et al. (2016). "Ezrin Enhances EGFR Signaling and Modulates Erlotinib Sensitivity in Non-Small Cell Lung Cancer Cells." Neoplasia**18**(2): 111-120.

Schaefer, L., et al. (2017). "Proteoglycan neofunctions: regulation of inflammation and autophagy in cancer biology." FEBS J**284**(1): 10-26.

Schiemann, W. P., et al. (2002). "Context-specific effects of fibulin-5 (DANCE/EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion. Fibulin-5 is induced by transforming growth factor-beta and affects protein kinase cascades." J Biol Chem**277**(30): 27367-27377.

Schwartz, M. P., et al. (2013). "A quantitative comparison of human HT-1080 fibrosarcoma cells and primary human dermal fibroblasts identifies a 3D migration mechanism with properties unique to the transformed phenotype." PLoS One**8**(12): e81689.

Scotlandi, K., et al. (2005). "Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors."Cancer Res**65**(9): 3868-3876.

Sekyi-Otu, A., et al. (1994). "Metastatic behavior of the RIF-1 murine fibrosarcoma: inhibited by hypophysectomy and partially restored by growth hormone replacement." J Natl Cancer Inst**86**(8): 628-632.

Sekyi-Otu, A., et al. (1994). "Metastatic behavior of the RIF-1 murine fibrosarcoma: inhibited by hypophysectomy and partially restored by growth hormone replacement." J Natl Cancer Inst**86**(8): 628-632.

Shain, K. H. and W. S. Dalton (2001). "Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR." Mol Cancer Ther**1**(1): 69-78.

Shannon, S., et al. (2017). "Inhibition of glioblastoma dispersal by the MEK inhibitor PD0325901." BMC Cancer**17**(1): 121.

Sharma, B., et al. (2013). "Lumican exhibits anti-angiogenic activity in a context specific manner." Cancer Microenviron**6**(3): 263-271.

Siegel, R., et al. (2012). "Cancer statistics, 2012."CA Cancer J Clin**62**(1): 10-29.

Skandalis, S. S., et al. (2014). "Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: focus on the role and impact of proteoglycans." Matrix Biol**35**: 182-193.

Skidmore, M. A., et al. (2008). "The activities of heparan sulfate and its analogue heparin are dictated by biosynthesis, sequence, and conformation." Connect Tissue Res**49**(3): 140-144.

Smirnov, A. V. (1988). "[Fibrosarcoma: immunohistochemical study of the extracellular matrix]." Arkh Patol**50**(12): 17-24.

Smith, H. G., et al. (2017). "The management of soft tissue tumours of the abdominal wall." Eur J Surg Oncol**43**(9): 1647-1655.

Snigireva, A. V., et al. (2015). "Cell surface heparan sulfate proteoglycans are involved in the binding of Hsp90alpha and Hsp90beta to the cell plasma membrane." Cell Adh Migr**9**(6): 460-468.

Snigireva, A. V., et al. (2016). "[The Role of Membrane-Bound Heat Shock Proteins Hsp90 in Migration of Tumor Cells in vitro and Involvement of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans in Protein Binding to Plasma Membrane]." Biofizika**61**(2): 328-336.

Soares, M. A., et al. (2015). "Heparan Sulfate Proteoglycans May Promote or Inhibit Cancer Progression by Interacting with Integrins and Affecting Cell Migration." Biomed Res Int**2015**: 453801.

Sokol, J. P. and W. P. Schiemann (2004). "Cystatin C antagonizes transforming growth factor beta signaling in normal and cancer cells." Mol Cancer Res**2**(3): 183-195.

Solarek, W., et al. (2015)."Insulin and IGFs in renal cancer risk and progression."Endocr Relat Cancer**22**(5): R253-264.

Spearman, M., et al. (1994)."Antisense oligodeoxyribonucleotide inhibition of TGF-beta 1 gene expression and alterations in the growth and malignant properties of mouse fibrosarcoma cells."Gene**149**(1): 25-29.

Subramani, R., et al. (2014). "Targeting insulin-like growth factor 1 receptor inhibits pancreatic cancer growth and metastasis." PLoS One**9**(5): e97016.

Sultan, I., et al. (2010). "Soft tissue sarcomas in the first year of life." Eur J Cancer**46**(13): 2449-2456.

Sun, M., et al. (2014). "RKIP and HMGA2 regulate breast tumor survival and metastasis through lysyl oxidase and syndecan-2." Oncogene**33**(27): 3528-3537.

Suzuki, H., et al. (2008). "Induction of podoplanin by transforming growth factor-beta in human fibrosarcoma."FEBS Lett**582**(2): 341-345.

Szatmari, T., et al. (2012). "Novel genes and pathways modulated by syndecan-1: implications for the proliferation and cell-cycle regulation of malignant mesothelioma cells." PLoS One**7**(10): e48091.

Szatmari, T. and K. Dobra (2013). "The role of syndecan-1 in cellular signaling and its effects on heparan sulfate biosynthesis in mesenchymal tumors." Front Oncol**3**: 310.

Szatmari, T., et al. (2015). "Syndecan-1 in Cancer: Implications for Cell Signaling, Differentiation, and Prognostication." Dis Markers**2015**: 796052.

Tai, Y. T., et al. (2003). "Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of beta1-integrin and phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling." Cancer Res**63**(18): 5850-5858.

Takahashi, T., et al. (2015). "Inhibition of EP2/EP4 signaling abrogates IGF-1R-mediated cancer cell growth: involvement of protein kinase C-theta activation." Oncotarget**6**(7): 4829-4844.

Tang, F., et al. (2009). "Berberine inhibits metastasis of nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells by targeting Rho kinase-mediated Ezrin phosphorylation at threonine 567." J Biol Chem**284**(40): 27456-27466.

Tansi, F. L., et al. (2016). "Potential of activatable FAP-targeting immunoliposomes in intraoperative imaging of spontaneous metastases." Biomaterials**88**: 70-82.

Theocharis, A. D., et al. (2016). "Extracellular matrix structure." Adv Drug Deliv Rev**97**: 4-27.

Theocharis, A. D. and N. K. Karamanos (2017). "Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms." Matrix Biol.

Thurzo, V., et al. (1976). "Human neoplastic cells in tissue culture: two established cell lines derived from giant cell tumor and fibrosarcoma." Neoplasma**23**(6): 577-587.

Thway, K., et al. (2016). "Endosialin expression in soft tissue sarcoma as a potential marker of undifferentiated mesenchymal cells." Br J Cancer**115**(4): 473-479.

Tirino, V., et al. (2011). "Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo." FASEB J**25**(6): 2022-2030.

Tovari, J., et al. (2014). "Boyden chamber-based method for characterizing the distribution of adhesions and cytoskeletal structure in HT1080 fibrosarcoma cells." Cell Adh Migr**8**(5): 509-516.

Tracy, L. E., et al. (2016). "Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound."Adv Wound Care (New Rochelle)**5**(3): 119-136.

Tsonis, A. I., et al. (2013). "Evaluation of the coordinated actions of estrogen receptors with epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor in the expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and cell motility in breast cancer cells." FEBS J**280**(10): 2248-2259.

Tsutsumi, K., et al. (2008). "Tumor growth inhibition by synthetic and expressed siRNA targeting focal adhesion kinase."Int J Oncol**33**(1): 215-224.

van der Graaf, W. T., et al. (2012). "Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial." Lancet**379**(9829): 1879-1886.

van der Horst, G., et al. (2012). "Epithelial plasticity, cancer stem cells, and the tumor-supportive stroma in bladder carcinoma." Mol Cancer Res**10**(8): 995-1009.

Vicente, C. M., et al. (2013). "Syndecan-2 is upregulated in colorectal cancer cells through interactions with extracellular matrix produced by stromal fibroblasts." BMC Cell Biol**14**: 25.

Vigneri, P. G., et al. (2015). "The Insulin/IGF System in Colorectal Cancer Development and Resistance to Therapy."Front Oncol**5**: 230.

Voudouri, K., et al. (2016). "IGF-I/EGF and E2 signaling crosstalk through IGF-IR conduit point affects breast cancer cell adhesion." Matrix Biol**56**: 95-113.

Voudouri, K., et al. (2016). "Heparin regulates B6FS cell motility through a FAK/actin cytoskeleton axis." Oncol Rep**36**(5): 2471-2480.

Wadhwan, V., et al. (2010). "Fibrosarcoma of the oral cavity." Indian J Dent Res**21**(2): 295-298.

Walsh, M. F., et al. (2009). "TGF-beta1 modulates focal adhesion kinase expression in rat intestinal epithelial IEC-6 cells via stimulatory and inhibitory Smad binding elements." Biochim Biophys Acta**1789**(2): 88-98.

Wang, J., et al. (2017). "On-command on/off switching of progenitor cell and cancer cell polarized motility and aligned morphology via a cytocompatible shape memory polymer scaffold." Biomaterials**140**: 150-161.

Whiteford, J. R., et al. (2007). "Syndecans promote integrin-mediated adhesion of mesenchymal cells in two distinct pathways." Exp Cell Res**313**(18): 3902-3913.

Whiteford, J. R., et al. (2011). "Syndecan-2 is a novel ligand for the protein tyrosine phosphatase receptor CD148." Mol Biol Cell**22**(19): 3609-3624.

Whitman, M. (1998). "Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily." Genes Dev**12**(16): 2445-2462.

Whitworth, M. K., et al. (2005). "Regulation of fibroblast growth factor-2 activity by human ovarian cancer tumor endothelium." Clin Cancer Res**11**(12): 4282-4288.

Willems, S. M., et al. (2010). "Running GAGs: myxoid matrix in tumor pathology revisited: what's in it for the pathologist?" Virchows Arch**456**(2): 181-192.

Williams, K. E., et al. (2010). "Lumican reduces tumor growth via induction of fas-mediated endothelial cell apoptosis." Cancer Microenviron**4**(1): 115-126.

Williams, K. C. and M. G. Coppolino (2011). "Phosphorylation of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and its vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7)-dependent trafficking facilitate cell invasion and migration." J Biol Chem**286**(50): 43405-43416.

Wong, V., et al. (2016). "Evaluation of a Congenital Infantile Fibrosarcoma by Comprehensive Genomic Profiling Reveals an LMNA-NTRK1 Gene Fusion Responsive to Crizotinib." J Natl Cancer Inst**108**(1).

Yanagisawa, R., et al. (2016). "Preoperative Treatment With Pazopanib in a Case of Chemotherapy-Resistant Infantile Fibrosarcoma." Pediatr Blood Cancer**63**(2): 348-351.

Yoon, A. and R. A. Hurta (2001). "Insulin like growth factor-1 selectively regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 in malignant H-ras transformed cells." Mol Cell Biochem**223**(1-2): 1-6.

Yu, G., et al. (2015). "PKM2 regulates neural invasion of and predicts poor prognosis for human hilar cholangiocarcinoma." Mol Cancer**14**: 193.

Yue, X., et al. (2008). "Transforming growth factor-beta1 induces heparan sulfate 6-O-endosulfatase 1 expression in vitro and in vivo." J Biol Chem**283**(29): 20397-20407.

Zhao, L., et al. (2012). "Clinical implication of targeting of cancer stem cells." Eur Surg Res**49**(1): 8-15.

Zhou, R., et al. (2005). "Phosphorylation of ezrin on threonine 567 produces a change in secretory phenotype and repolarizes the gastric parietal cell." J Cell Sci**118**(Pt 19): 4381-4391.

Zhou, Q., et al. (2015). "GSK1904529A, an insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor, inhibits glioma tumor growth, induces apoptosis and inhibits migration." Mol Med Rep**12**(3): 3381-3385.

Zielinska, H. A., et al. (2015). "Epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer: a role for insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein 3?" Breast Cancer (Dove Med Press)**7**: 9-19.

Ιστολογία του ανθρώπου, Χρήστος Κίττας, μετάφρ. Alan Stevens, 2008

Βιογραφικό

ΜΑΡΙΑ ΜΥΤΙΛΗΝΑΙΟΥ
Σταυρωμένος
Ρέθυμνο,Κρήτη,Ελλάδα
2831300508 ή 6949065782
Email: maria_mytil@yahoo.gr
Ημ.γέννησης: 21/09/1984
Οικ. κατάσταση: Έγγαμος

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2002-2008	**Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής** **MD Πτυχίο 7.37 "Λίαν καλώς"**
2011-παρόν	**Υποψήφια διδάκτωρ Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήματος Ιατρικής** – Θέμα Διδακτορικής Διατριβής: ''Μελέτη του ρόλου των συνδεκανών στην παθογένεια του ινοσαρκώματος και διερεύνηση της επίδρασης των αυξητικών παραγόντων''.

ΑΔΕΙΑ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ

2008	Εγγραφή στον "Ιατρικό Σύλλογο Ρεθύμνου" και απόκτηση "Άδειας Άσκησης Ιατρικού Επαγγέλματος" (31/07/2008)
2012	Εγγραφή στον "Ιατρικό Σύλλογο Ην.Βασιλείου"και απόκτηση "Άδειας Άσκησης Ιατρικού Επαγγέλματος" (17/09/2012). Αρ.αδείας 7319825

ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μάιος 2016 – Απρ. 2018	**Κλινική και ερευνητική επιστημονική συνεργάτης (Clinical & Research Fellow) στην Ενδοκρινολογία, Διαβήτη και Μεταβολισμό**, τμήμα WISDEM (Warwick Institute for the Study of Diabetes, Endocrinology and Metabolism), Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Coventry & Warwickshire του Ην.Βασιλείου υπό τον Καθ. Harpal Randeva

ΠΡΟΗΓΗΘΕΙΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ

2005-2008	**Κλινική Άσκηση** Τμήματα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου: Γενική Χειρουργική (2 μήνες), Ορθοπαιδική Χειρουργική (1 μήνα), Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (1 μήνα), Παθολογία (1 μήνα), Καρδιολογία (1 μήνα), Πνευμονολογία (1 μήνα) Ενδοκρινολογία (1 μήνα), Δερματολογία (1 μήνα), Ω.Ρ.Λ. (2 εβδομάδες), Οφθαλμολογία (2 εβδομάδες), Νευρολογία (1 μήνα), Ψυχιατρική (1 μήνα),

	Άσκηση Α'Βάθμιας Περίθαλψης και Επείγουσας Ιατρικής, Κέντρο Υγείας Μοιρών, Ηράκλειο, Κρήτη (1 μήνα), Μαιευτική/Γυναικολογία (2 μήνες), Παιδιατρική (1 μήνα), Παιδιατρική-Αιματολογία/Ογκολογία/Μονάδα Εντατικής Θεραπείας Νεογνών (1 μήνα).
Αύγ.2008-Απρ.2009	**Παρακολούθηση-Περαιτέρω εκπαίδευση** Παθολογική Κλινική Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών Γενικό Νοσοκομείο Ρεθύμνου
Δεκ.2008- Ιούν.2009	**Διδασκαλία** Μαθήματα Ανατομίας του Ανθρώπου, Φυσιολογίας, Νευρολογίας, Ψυχιατρικής Β' & Γ' Τάξη του 1ου ΕΠΑ.Λ. Ρεθύμνου
Απρ.2009- Αύγ.2010	**Αγροτική Ιατρός** **Π.Ι. Μελάμπων**, Κέντρο Υγείας Σπηλίου, Γενικό Νοσοκομείο Ρεθύμνου
Μάρ.2011- Ιούλ.2011	**Μερική ιατρική απασχόληση** στον ιδιωτικό τομέα, Ιδιωτική Κλινική και Διαγνωστικό Κέντρο, Ασκληπιείο Ηρακλείου Κρήτης
Νοέμ.2011- Απρ.2013	**Ειδικευόμενη ιατρός στο τμήμα Παθολογίας** του Γενικού Νοσοκομείου Ρεθύμνου Κρήτης
Φεβ.2014- Αύγ.2014	**Ειδικευόμενη Ιατρός (LAS ST1) στην Ενδοκρινολογία/Διαβήτη** στο Βασιλικό Νοσοκομείο του Shrewsbury (NHS) του Ην.Βασιλείου
Νοέμ.2014- Φεβ.2015	**Ειδικευόμενη Ιατρός (LAS ST2) στην Ενδοκρινολογία/Διαβήτη** στο Πανεπιστημιακό Συγκρότημα Νοσοκομείων του Colchester (NHS) του Ην.Βασιλείου
Μάρ.2015- Ιούλ.2015	**Παρακολούθηση-Περαιτέρω εκπαίδευση στην Ενδοκρινολογία/Διαβήτη** στο Πανεπιστημιακό Συγκρότημα Νοσοκομείων του Colchester (NHS) του Ην.Βασιλείου
Μάϊος 2015- Απρ.2016	**Μερική ιατρική απασχόληση στον ιδιωτικό τομέα-Locum jobs** (Πανεπιστημιακό Συγκρότημα Νοσοκομείων του Colchester (NHS) του Ην.Βασιλείου, Νοσοκομείο Whiston (St Helen's and Knowsley Teaching Hospitals), Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο North Midlands (Royal StokeHospital)

ΒΡΑΒΕΙΑ

2011	"Βραβείο Νέου ερευνητή- Young InvestigatorAward" Κουβίδη Αικ., Μπερδιάκη Αικ., Nikitovic D., **Μυτιληναίου Μ.,**Βουδούρη Κ., Τζανακάκης Γ.Ν. "Η σηματοδότηση του υαλουρονικού οξέος μέσω του υποδοχέα του RHAMM στην προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος." Federation of European Biochemical Societies, Advanced Lecture Course, Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular targets, Σπέτσες, Ελλάδα, Σεπτ.2-7, 2011

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

Νοεμβ.2007	Παρουσίαση Ελεύθερης Ανακοίνωσης Βισκαδουράκη Ο, **Μυτιληναίου Μ**, Τσουκαλά Σ "Προγνωστικοί παράγοντες για την έκβαση ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου, μετά από μεταστασεκτομή" (2η Πανελλήνια Φοιτητική Συνάντηση για τις Σύγχρονες Εξελίξεις στην Κλινική Ογκολογία, Ηράκλειο Κρήτης, 8-10 Νοεμβρίου 2007)
Ιούν.-Σεπτ.2011	Δάτσης Γ., **Μυτιληναίου Μ.,** Μπερδιάκη Αικ., Nikitovic D., Κατώνης Π., Τζανακάκης Γ.Ν. "Η PTH ενισχύει τη μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος μέσω του σηματοδοτικού άξονα FGF-2/Biglycan" (α) 36th FEBS Congress, Τορίνο (Turin), Ιταλία, Ιούνιος 25-30, 2011 και β) FEBS Advanced Lecture Course, Σπέτσες, Ελλάδα, Σεπτ. 2-7, 2011),
	Κουβίδη Αικ., Μπερδιάκη Αικ., **Μυτιληναίου Μ.,** Βουδούρη Κ., Nikitovic D., Τζανακάκης Γ.Ν. "Ο ρόλος του υποδοχέα RHAMM στην προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος μέσω του υαλουρονικού οξέος χαμηλού μοριακού βάρους (LMWHA)." (α) 36th FEBS Congress, Torino (Turin), Ιταλία, 25-30 Ιουνίου, 2011 και β) FEBS Advanced Lecture Course, Σπέτσες, Ελλάδα, Σεπτ. 2-7, 2011)
	Αικ. Μπερδιάκη, D. Nikitovic, **Μ. Μυτιληναίου**, Α. Ζαφειρόπουλος, Ν.Κ. Καραμάνος and Γ.Ν. Τζανακάκης. "Η Λουμικάνη ρυθμίζει τη σηματοδότηση του TGF-β2 για την προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος."(FEBS Advanced Lecture Course, Σπέτσες, Ελλάδα, Σεπτ. 2-7, 2011)
	Αικ. Κουβίδη, Α. Μπάνο, D. Nikitovic, Ε. Φθενού, Γ. Χατζηνικολάου, **Μ. Μυτιληναίου**, Γ.Ν. Τζανακάκης.

	"Οι αλυσίδες HS ρυθμίζουν τη σηματοδότηση του TGFB2 για την εξαρτώμενη και ανεξάρτητη προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος μέσω Smad." (FEBS Advanced Lecture Course, Σπέτσες, Ελλάδα, Σεπτ. 2-7, 2011)
Ιαν.2012 (προφορ.παρουσίαση)	**Μαρία Μυτιληναίου**, Γεωργία Ποθουλάκη, Σπυρίδων Ζαφείρης, Κωνσταντίνος Μαλάς. Case report "Εγκεφαλική αιμορραγία λόγω μεταστατικού υπονύχιου μελανώματος". MKSAP των νοσοκομείων της Κρήτης, 2012-2013
Νοέμ.2012	**Μυτιληναίου Μ**., Bano A., Nikitovic D., Μπερδιάκη Αικ., Βουδούρη Κ., Καλογεράκη Αλ., Καραμάνος Ν.Κ., Τζανακάκης Γ.Ν. (2012). ''Η Syndecan-2 είναι κύριος ρυθμιστικός παράγοντας για την προσκόλληση των κυττάρων του ινοσαρκώματος μέσω TGFbeta/Smad 2''. 63ο Πανελλήνιο Συνέδριο- Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας. Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα: 9-11 Νοεμβρίου 2012
Απρ.2013	**Μαρία Μυτιληναίου**, Αικατερίνη Λαυρεντάκη, Ιωάννης Λιάπης, Βασιλική Πιτσούνη, Μαρία-Έλενα Ζενιώδη, Περικλής Κωτσόπουλος, Κωνσταντίνος Μαλάς. Case report "Περίπτωση λεπτοσπίρωσης με άσηπτη μηνιγγίτιδα", 22ος χρόνος "Ημέρες Παθολογίας", Αθήνα, Ελλάδα: 5-6 Απριλίου 2013
	Αικατερίνη Λαυρεντάκη, **Μαρία Μυτιληναίου**, Γεωργία Ποθουλάκη, Μαρία-Έλενα Ζενιώδη, Βασιλική Πιτσούνη, Κωνσταντίνος Μαλάς. Case report "68χρονη γυναίκα με σταφυλοκοκκική μηνιγγίτιδα και βακτηριαιμία, μετά από παρασπονδυλική ένεση στεροϊδών για θεραπεία οσφυαλγίας", 22ος χρόνος "Ημέρες Παθολογίας", Αθήνα, Ελλάδα: 5-6 Απριλίου 2013
Ιούν.2016	**Μυτιληναίου Μ,** NikitovicD, Βουδούρη Κ, Κεχαγιάς Κ, Μπερδιάκη Αικ, Τζανακάκης, Γ. Ο IGF-I ρυθμίζει τη μετανάστευση των κυττάρων HT1080 μέσω της σηματοδότησης της Syndecan 2 και του ERK1/2. Matrix Biology Europe, International Conference, 11-14 Ιούνιος 2016, Αθήνα, Ελλάδα
Νοέμ.2017	**Μαρία Μυτιληναίου**, Γεώργιος Κ. Δημητριάδης, Allan Davasgaium, Diane Sambrook, Claire Hewins, Nilisha Nalawade, Δημήτριος Κ. Γραμματόπουλος, Harpal S. Randeva, ''UHCW audit on SGLT2 inhibitor (SGLT2-i) use'', SFE BES Conference, 6-8 Νοεμβρίου 2017, Harrogate, UK

Γεώργιος Κ. Δημητριάδης, Jaspreet Kaur, **Μαρία Μυτιληναίου**, Allan Davasgaium, Diane Sambrook, Claire Hewins, Nilisha Nalawade, Alexander D. Miras, Harpal S. Randeva. ''Η ενεργοποίηση του Nuclear factor-kappa beta και η προσκόλληση μονοκυττάρων-ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγούν σε φλεγμονή ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της χημερίνης''. Society for Endocrinology (SfE BES), Harrogate, UK, 6-8 Νοεμβρίου 2017

Γεώργιος Κ. Δημητριάδης, **Μαρία Μυτιληναίου,** Allan Davasgaium, Diane Sambrook, Ευτυχία Ε. Δράκου, Claire Hewins, Nilisha Nalawade, Harpal S. Randeva.''Υπερτεστοστεροναιμία και πρωτοπαθής υπογονιμότητα από εξωγοναδικό όγκο βλαστικών κυττάρων''. Society for Endocrinology (SfE BES), Harrogate, UK, 6-8 Νοεμβρίου 2017

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ (PEER-REVIEWED JOURNALS)

Οκτ. 2011

Datsis G., Berdiaki A., Nikitovic D., **Mytilineou M.**, Katonis P., Karamanos N.K., Tzanakakis G.N., FEBSJ. 2011 Oct;278(19):3782-92. "Parathyroid Hormone affects the fibroblast growth factor-proteoglycan signaling axis to regulate osteosarcoma cell migration"

Φεβ.2013

Mytilinaiou M, Bano A, Nikitovic D, Berdiaki A, Voudouri K, Kalogeraki A, Karamanos NK, Tzanakakis GN**,** IUBMB Life. 2013 Feb;65(2):134-43. "Syndecan-2 is a key regulator of transforming growth factor beta 2/ Smad2-mediated adhesion in fibrosarcoma cells"

2014

Nikitovic D., **Mytilinaiou M**., Berdiaki A., Karamanos N., Tzanakakis G., Biochim Biophys Acta. 2014 Aug;1840(8):2471-81. "Heparan sulfate proteoglycans and heparin regulate melanoma cell functions". **Review**

2017

Mytilinaiou M, Nikitovic D, Berdiaki A, Papoutsidakis A, Papachristou DJ, Tsatsakis AM, Tzanakakis GN., Exp Cell Res. 2017 Dec 1;361(1):9-18. ''IGF-I regulates HT1080 fibrosarcoma cell migration through a syndecan-2/Erk/ezrin signaling axis.''

Mytilinaiou M, Nikitovic D, Berdiaki A, Kostouras A, Papoutsidakis A, Tsatsakis AM, Tzanakakis GN., IUBMB Life. 2017 Nov;69(11):824-833. ''Emerging roles of Syndecan 2 in epithelial and mesenchymal cancer progression ''

2018	Kyritsi EM, Dimitriadis GK, Angelousi A, Mehta H, Shad A, **Mytilinaiou M**, Kaltsas G, Randeva HS. Eur J Clin Invest. 2018 May 29:e12961. doi: 10.1111/eci.12961 ''The value of PRL in predicting prolactinoma in hyperprolactinemic PCOS. ''
	Maria Mytilinaiou, Ioannis Kyrou, Mike Khan, Dimitris K. Grammatopoulos, Harpal S. Randeva. Frontiers in Pharmacology 2018 - accepted for publication. '' Familial Hypercholesterolemia: New horizons for Diagnosis and Effective Management''. **Review**

ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ-ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ/ΣΥΝΕΔΡΙΑ

2002	Σεμινάριο "Αντισύλληψη, Νεώτερα Δεδομένα", Μαιευτική/Γυναικολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου (18 Δεκ. 2002)
2006	13ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο. 21 μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης (EAC-CME-UEMS) (9-12 Νοεμβ. 2006)
	2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδομητρίωσης Ηράκλειο Κρήτης, 10 μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης (CME-CPD) (24-26 Νοεμβ. 2006)
	8ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ομάδας Έρευνας Συνδετικού Ιστού και Εξωκυττάριου Χώρου της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Ηράκλειο Κρήτης (14-15 Απρ.2006)
2007	34ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας & Μεταβολισμού, Χερσόνησος Κρήτης 18 μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης (CME-CPD), (28-31 Μαρτίου 2007)
	10ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Πολυθεματικό Συνέδριο, σε συνεργασία με την British Trauma Society, Ηράκλειο Κρήτης (25-27 Μαΐου 2007)
	3ο Συνέδριο Παθολογίας "Σύγχρονες Τάσεις στην Παθολογία", Ηράκλειο Κρήτης. 14 μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης (CME) (1-3 Νοεμβ. 2007)
	2η Hellenic Πανελλήνια Ιατρική Συνάντηση "Σύγχρονες εξελίξεις στην Κλινική Ογκολογία"

	(8-10 Νοεμβ. 2007)
2008	1ο Παγκρήτιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής/Γυναικολογίας 9 μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης (CME-CPD) (12-13 Απρ. 2008)
2009	Συγκέντρωση, Ανάλυση και Αξιοποίηση Δεδομένων με τη χρήση Στατιστικού Λογισμικού, Εκπαιδευτικό Πρόγραμμα στα πλαίσια του ΛΑΕΚ (ΟΑΕΔ) (13 Απρ. 2009)
2013	22ο Συνέδριο ''Ημέρες Παθολογίας'', Αθήνα (5-6 Απρ. 2013)
	ALS Provider Course (Σεμινάριο Αναζωογόνησης), Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης, 2-3 Μαρ. 2013
2014	Αντιμετώπιση εμποδίων και πολιτιστικών διαφορών για την καλύτερη τήρηση της θεραπείας στον Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 (0,25 AMA PRA Category 1 Credit), Ηv. Βασίλειο, 22 Ιουν.2014
	Επιλογή, Έναρξη και Εντατικοποίηση θεραπείας με ινσουλίνη και προϊόντα που βασίζονται στο φαινόμενο της ινκρετίνης (0,25 AMA PRACategory 1 Credit), Ηv. Βασίλειο, 22 Ιουν.2014
	Σύγκριση από του στόματος θεραπείας, ινσουλίνης και προϊόντων που βασίζονται στο φαινόμενο της ινκρετίνης: Ασφάλεια, Αποτελεσματικότητα και Ανοχή εξατομικευμένης θεραπείας Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου 2 (0,25 AMA PRACategory 1 Credit), Ηv. Βασίλειο 22 Ιουν.2014
	Σημασία εξατομίκευσης θεραπείας του Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου 2 (0,25 AMA PRACategory 1 Credit), Ηv. Βασίλειο, 22 Ιουν.2014
	Σεμινάρια στα πλαίσια εργασίας στα νοσοκομεία NHS του Ηv.Βασιλείου (Υγεία και Ευημερία, Προφύλαξη ευπαθών ομάδων (επίπεδο 3), Προφύλαξη Ιατρικού Απορρήτου, Προφύλαξη για τη στέρηση Προσωπικής Ελευθερίας, Προφύλαξη για τη Διαχείριση έλειψης Νοητικής Ικανότητας των ασθενών (Επίπεδο 3), Διαχείριση αυτισμού και μαθητικών δυσκολιών (επίπεδο 3), Ασφάλεια στο Νοσοκομείο, Πρόληψη Απάτης στο Νοσοκομείο, Ανθρώπινες Διαφορές, Πρόληψη πτώσης σε νοσηλευόμενους ασθενείς, Διαχείριση Άνοιας, Έλεγχος Λοιμώξεων στο νοσοκομείο, Υγεία και Ασφάλεια, Διαχείριση Ιατρικών

	Φακέλων και Πληροφοριών για το Ιατρικό Προσωπικό, Μετάγγιση αίματος κ.α. (ανανεώσιμες πιστοποιήσεις ετησίως)
2015	ALS Intructor Course (Σεμινάριο για τη Διδασκαλία στην Αναζωογόνηση), Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης, 6-7 Ιουν.2015
2016	2η Συνάντηση για τη συζήτηση ιατρικών περιστατικών στην Ενδοκρινολογία, Οξφόρδη, Ηv.Βασίλειο, 14 Μαρ. 2016 (6 category external 1 CPD πόντοι)
	Διαχείριση του Σακχαρώδους Διαβήτη στις κλινικές νοσηλείας και περιεγχειριτικά (Royal College of Physicians) 1 Μαρ. 2016 (2 CPD πόντοι)
	Ημέρα Υπόφυσης (East Midlands Pituitary Day), Nottingham 12 Μαΐου 2016 (5 CPD πόντοι)
	Βρετανικό Συνέδριο Ενδοκρινολογίας (SfE BES), Brighton, Ηv.Βασίλειο, 7-9 Νοέμ. 2016, 18 category 1 (external) CPD πόντοι
2017	Βρετανικό Συνέδριο Ενδοκρινολογίας (SfE Clinical Update Meeting 2017), Birmingham, Ηv.Βασίλειο, 20-22 Μαρ. 2017, 16 CPD πόντοι
	Βρετανικό Συνέδριο Ενδοκρινολογίας (SfE BES), Harrogate, Ηv.Βασίλειο, 6-8 Νοέμ.2017, 18 category 1 (external) πόντοι

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2010-παρόν	1) Μελέτη της επίδρασης της παραθορμόνης και του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα στη μετανάστευση κυττάρων του οστεοσαρκώματος. 2) Διερεύνηση του ρόλου των αλυσίδων θειϊκής ηπαράνης και του αυξητικού παράγοντα του μετασχηματισμού στην προσκόλληση κυττάρων του ινοσαρκώματος. Εργαστήριο Ανατομίας/Ιστολογίας/Εμβρυολογίας, Τομέας Μορφολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής, Ηράκλειο Κρήτης
Μάϊος 2016-παρόν	Κλινικές Μελέτες, WISDEM Centre, UHCW, UK: LIPOS study (double-blinded RCT) DUAL VIII study (open-label RCT) REAL 1 study (open-label RCT) THEMIS study (open-label RCT) REACH & REGAIN study (open-label RCT)

MBGS205 study (double-blinded RCT)
SUSTAIN-10 study (open-label RCT)

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕΛΟΥΣ

Φεβρ.2011	Εγγραφή στον Ελληνικό Σύλλογο Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ)
2016	Μέλος της Βρετανικής Εταιρείας Ενδοκρινολογίας
	Μέλος της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ενδοκρινολογίας

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ-ΕΛΕΓΧΟΙ (AUDITS)

Μάρ.2018	UHCW, UK audit: ''Η προλακτίνη ως προγνωστικός δείκτης για το μέγεθος του προλακτινώματος, παρουσιάστηκε στο QIPS, του τμήματος Ενδοκρινολογίας/Διαβήτη/Μεταβολισμού (WISDEM Centre, UHCW)
Σεπ.2017	Εθνική Μελέτη - Έλεγχος Διαβήτη Ην. Βασιλείου (National Diabetes Audit, UHCW, UK)
Μάρ.2017	UHCW, UK μελέτη – ''Έλεγχος (audit) στη χρήση των αναστολέων SGLT2 (SGLT2-i)'', παρουσιάστηκε στο QIPS του τμήματος Ενδοκρινολογίας/Διαβήτη/Μεταβολισμού (WISDEM Centre, UHCW)
Απρ. 2016	Κλινική μελέτη – ''Έλεγχος (audit) για τη σωστή μεταφορά ασθενών από το τμήμα Επειγόντων στις Παθολογικές κλινικές του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Royal Stoke, Ην.Βασίλειο''
Αύγ.2016	Εθνική Μελέτη – ''Έλεγχος Διαβήτη Ην. Βασιλείου (National Diabetes Audit, UHCW, UK)

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Ωρομίσθια Καθηγήτρια Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης στην Ανατομία του Ανθρώπου, Φυσιολογία, Νευρολογία και Ψυχιατρική, 1ο Επαγγελματικό Λύκειο Ρεθύμνου Κρήτης για μία σχολική χρονιά.

Συμμετοχή στην εκπαίδευση αγροτικών ιατρών και συνειδικευόμενων Παθολογίας με ρόλο στην παρουσίαση μαθημάτων αλλά και στην πρακτική

εξάσκηση στο Τμήμα Επειγόντων/Παθολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Ρεθύμνου Κρήτης

Συμμετοχή σε μαθήματα Ιστολογίας σε 4 ετείς φοιτητές Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης (ως μέρος της Διδακτορικής μου Διατριβής)

Συμμετοχή στην εκπαίδευση προπτυχιακών φοιτητών Βιολογίας σε τεχνικές του εργαστηρίου Ανατομίας/Ιστολογίας/Εμβρυολογίας, του Πανεπιστημίου Κρήτης (ως μέρος της Διδακτορικής μου Διατριβής).

Εκπαιδευτής Σεμιναρίων Αναζωογόνησης (ALS Instructor) (European Resuscitation Council) σε σεμινάρια της Ελλάδας και του Ην.Βασιλείου

Συμμετοχή στην εκπαίδευση φοιτητών Ιατρικής του Πανεπιστημίου του Warwick, στο Τμήμα Ενδοκρινολογίας/Διαβήτη/Μεταβολισμού στο Ην. Βασίλειο, WISDEM Centre, UHCW, UK

ΚΛΙΝΙΚΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ

Ενδοκρινολογία:
Διαταραχές μεταβολισμού / αναπαραγωγή (παχυσαρκία, σακχαρώδης διαβήτης, υπερλιπιδαιμίες, πολυκυστικές ωοθήκες, υπογονιμότητα κ.α)

ΠΤΥΧΙΑ

2000	"Certificate of Proficiency in English", University Of Cambridge
2000	"Zertifikat in Deutch"¨, Goethe Institut
2006	"BLS" provider, European Resuscitation Council
2008	"Advanced Medical English",University of Crete
2009	Σεμινάρια Software (MS Office, SPSS, Internet), Γενικό Νοσοκομείο Ρεθύμνου
2013	"ALS" provider, European Resuscitation Council, Ελλάδα
2013	"European Resuscitation Council Generic Instructor Course", ALS, Ελλάδα

2016	''Good Clinical Practice'' training, UHCW, Hν.Βασίλειο
2014-2018	Βασική εκπαίδευση με πιστοποιήσεις για τα νοσοκομεία NHS του Hν.Βασιλείου (μετάγγιση αίματος, προφύλαξη ευπαθών ομάδων, υγιεινή, χειρισμός/μετακίνηση ασθενών, κτλ)

ΓΝΩΣΕΙΣ ΞΕΝΩΝ ΓΛΩΣΣΩΝ

Άριστη γνώση Αγγλικών, γραπτώς και προφορικώς
Μέτρια γνώση Γερμανικών, γραπτώς και προφορικώς

ΓΝΩΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ Η/Υ

Άριστη γνώση MS Office & Internet

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ

Εθελοντική εργασία στις ομάδες: "Γιατροί του Κόσμου", "Ομάδα Φοιτητικής Εθελοντικής Αιμοδοσίας" του Πανεπιστημίου Κρήτης
Πιάνο, ζωγραφική, βόλλευ (μέλος της Εθνικής ομάδας Πετοσφαίρισης Κορασίδων 1998-2001 με αγωνιστική συμμετοχή σε Ευρωπαϊκούς Αγώνες και συμμετοχή σε αγώνες τοπικού επιπέδου - Α1 αγωνιστικής στην Ελλάδα και στο Hν.Βασίλειο 1995-2016), ταξίδια, λογοτεχνία