



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

HELLENIC REPUBLIC
UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF MEDICINE



Ιωάννης Αγγελιδάκης

Διδακτορική Διατριβή

Ο ρόλος των μικρών πλούσιων σε λευκίνη πρωτεογλυκανών
(SLRPs) στη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου
οστεοσαρκώματος.

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Ιατρική Σχολή
Εργαστήριο Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας
Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Τζανακάκης

2019

Τη διδακτορική διατριβή αυτή, αφιερώνω, στη σύζυγο μου Κάτια και να την ευχαριστήσω για την κατανόηση και υπομονή που έδειξε όλα αυτά τα χρόνια.

Επίσης στους γιούς μου, Μάνο, Αντώνη και Στράτο.

Με την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής, θέλω να ευχαριστήσω όλους τους συνεργάτες του εργαστηρίου Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας που συνέβαλαν στην υλοποίησή της.

Τον κο Τζανακάκη Γεώργιο, Καθηγητή Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας και επιβλέποντα Καθηγητή της Διδακτορικής Διατριβής, για την υπομονή και την καθοριστική συμβολή του σε όλη τη διάρκεια την έρευνας έως και την ολοκλήρωσή της.

Τον κο Κοντάκη Γεώργιο, Κοσμήτορα, Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής Ηρακλείου και Διευθυντή της Ορθοπαιδικής κλινικής ΠΑ.Γ.Ν.Η για τη συνεχή εκπαίδευσή μου και την τεκμηριωμένη γνώση που απέκτησα στο διάστημα της ειδικότητας μου και στην συνέχεια ως συνεπιβλέποντα της παρούσας διατριβής του οποίου οι κατευθυντήριες γραμμές και οι επισημάνσεις του μου ήταν χρήσιμες.

Τον κο Κρασαγάκη Κων/νο, συνεπιβλέποντα Καθηγητή Δερματολογίας της Ιατρικής Σχολής Ηρακλείου, για τις εύστοχες παρατηρήσεις και επισημάνσεις του.

Οφείλω τις θερμές μου ευχαριστίες στην κ. Νικίτοβιτς-Τζανακάκη Ντράγκανα για τις πολύτιμες συμβουλές της και τις εύστοχες και επιστημονικά τεκμηριωμένες παρατηρήσεις της καθόλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής, επίσης τις θερμές μου ευχαριστίες στην Δρ. Μπερδιάκη Κατερίνα για την συνεχή και στενή παρακολούθηση και την βοήθειά της σε κάθε στάδιο εξέλιξης της διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές μου και Διευθυντές Ορθοπαιδικής Κλινικής, κο Χατζηπαύλου Αλέξανδρο και κο Κατώνη Παύλο για τη προτροπή έναρξης της διδακτορικής διατριβής και τη στοχευμένη καθοδήγησή τους στην προσπάθεια αυτή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής που αποδέχθηκαν την πρόταση για την συμμετοχή τους στην παρουσίαση και την αξιολόγηση της διδακτορικής διατριβής. Την κα Τζαρδή Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια τμήματος Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Ηρακλείου. Τον κο Κουτσόπουλο Αναστάσιο, Αναπληρωτή καθηγητή Παθολογικής - Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής Ηρακλείου. Τον κο Χατζηδάκη Αδάμ, Καθηγητή Αγγειοακτινολογίας και Επεμβατικής Ακτινολογίας της Ιατρικής Σχολής Ηρακλείου. Τον κο Eelco De Bree, Αναπληρωτή Καθηγητή Γενικής Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής Ηρακλείου.

Επιπροσθέτως, θεωρώ σημαντική και πολύτιμη ήταν επίσης η βοήθεια στα πειράματα από τα μέλη του εργαστηρίου Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Χαλκιαδάκη Γεωργία, Δρ. Βουδούρη Καλλιρρόη, Γιαταγάνα Ειρήνη και Καβάση Ραφαέλα.

Περίληψη

Τα σαρκώματα συνιστούν το 1% περίπου του συνόλου των κακοήθων νεοπλασιών κάθε χρόνο, είναι μεσεγχυματικής προέλευσης και κατατάσσονται με βάση τον τύπο του ιστού προέλευσης τους. Το οστεοσάρκωμα είναι ένας όγκος υψηλής κακοήθειας, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων που παράγουν οστεοειδές. Αποτελεί τον δεύτερο σε συχνότητα πρωτοπαθή όγκο των οστών μετά το μυέλωμα και το 20% όλων των σαρκωμάτων των οστών. Το οστεοσάρκωμα εμφανίζεται πιο συχνά στην δεύτερη δεκαετία της ζωής και με μικρότερη συχνότητα στην έκτη δεκαετία. Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) του οστεοσαρκώματος είναι πλούσια σε κολλαγόνο, γλυκοπρωτεΐνες και πρωτεογλυκάνες (Benayahu et al., 2001; Piepkorn et al., 1988; Roughley, 2006).

Οι πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRPs) αποτελούν κύρια μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του συνδετικού ιστού και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη των όγκων μεσεγχυματικής προέλευσης (Nikitovic et al., 2012). Επίσης, οι SLRPs αποτελούν τις πιο άφθονες πρωτεογλυκάνες του οστεοειδούς (Waddington and Langley 1998; Young et al., 2005). Αλλαγές στην έκφραση των SLRPs έχουν παρατηρηθεί σε ποικιλία τύπων καρκινικών κυττάρων, όπως του οστεοσαρκώματος, του ινοσαρκώματος και του χονδροσαρκώματος. Τα μέλη της οικογένειας των SLRPs εμφανίζουν δομική ομολογία και κατατάσσονται σε πέντε κατηγορίες (Schaefer and Iozzo 2008). Η κατηγορία I περιλαμβάνει την διακοσμιτίνη (decorin) και την διγλυκάνη (biglycan), η κατηγορία II τις ινομοδουλίνη (fibromodulin), λουμικάνη (lumican), PRELP, κερατοκάνη (keratocan) και οστεοκατχερίνη (osteocadherin) και η κατηγορία III την επιφυκάνη (epiphycan) και οστεογλυκίνη/ μιμεκάνη (osteoglycin/mimican) (Hocking

et al., 1998; Fisher et al., 1989; Oldberg et al., 1989; Blochberger et al., 1992; Bengtsson et al., 1995; Sommarin et al., 1998; Friedman et al., 2000). Επίσης, τελευταίες έχουν ανακαλυφτεί η οπτική (opticin) και η ασπορίνη (asporin) (Reardon et al., 2000; Lorenzo et al., 2001). Οι κατηγορίες IV και V έχουν χαρακτηριστεί ως μη-κανονικές (Schaefer and Iozzo 2008). Ο πρωτεϊνικός κορμός των SLRPs έχει μέγεθος 40-50 kDa με μοτίβα πλούσια σε λευκίνη, τα οποία επαναλαμβάνονται 9-10 φορές στο C-τελικό άκρο τους. Στην N-τελική περιοχή τους οι SLRPs φέρουν γλυκοζαμινογλυκανικές αλυσίδες με διαφορετική χημική σύσταση (Nikitovic et al., 2008; McEwan et al., 2006). Ο βαθμός το είδος γλυκοζυλίωσης φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην οστεογένεση και τη χονδρογένεση (Rada et al., 2000). Το χαρακτηριστικό σε σχήμα πετάλου αλόγου του πρωτεϊνικού τους κορμού, τους επιτρέπει να αλληλεπιδρούν με συστατικά της ECM, όπως οι αυξητικοί παράγοντες, επηρεάζοντας ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες (Nikitovic et al., 2008; Nikitovic et al., 2012).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε ο ρυθμιστικός ρόλος δύο σημαντικών SLRP, της λουμικάνης και της διγλυκάνης, στις κυτταρικές λειτουργίες του οστεοσαρκώματος.

Οι κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος έχει δειχθεί ότι εκφράζουν και εκκρίνουν την μικρή πλούσια σε λευκίνη πρωτεογλυκάνη (SLRP), λουμικάνη (Nikitovic et al., 2008). Η λουμικάνη έχει προηγουμένως αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την ανάπτυξη και την κινητικότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος. Στην έρευνα της παρούσας διατριβής, κύτταρα οστεοσαρκώματος της κυτταρικής σειράς Saos 2 ελλειπή σε έκφραση λουμικάνης παρουσίασαν αυξημένη κυτταρική προσκόλληση σε υπόστρωμα ινονεκτίνης (FN) ($p \leq 0.01$). Μελετήθηκε επίσης η δράση του αυξητικού παράγοντα transforming growth factor β 2 (TGF- β 2). Η εξωγενής προσθήκη του TGF-

$\beta 2$ αύξησε στατιστικά σημαντικά την προσκόλληση των κυττάρων στην FN ($p \leq 0.01$). Αντιθέτως, η μείωση της δράσης του παράγοντα αυτού δεν άλλαξε την ικανότητα των Saos2 κυττάρων με (siRNA-transfected) ή δίχως λουμικάνη (scramble siRNA-transfected) να προσκολληθούν στην FN ($p = NS$). Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ της έκφρασης της λουμικάνης και της ικανότητας προσκόλλησης των κυττάρων Saos2 η οποία ρυθμίζεται από την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF- $\beta 2$. Στην συνέχεια, παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στην ενεργοποίηση του Smad 2 σηματοδοτικού μορίου στα κύτταρα με ελειπή έκφραση λουμικάνης ($p \leq 0.01$) η οποία αναστάλθηκε με την παρουσία αντισωμάτων έναντι του TGF- $\beta 2$. Το τελευταίο, αποδεικνύει ότι η λουμικάνη αποτελεί ρυθμιστή του σηματοδοτικού άξονα TGF- $\beta 2$ /Smad 2. Επιπρόσθετα, στην διατριβή παρουσιάζονται αποτελέσματα για την έκφραση της $\beta 1$ -ιντεγκρίνης και την ενεργοποίηση της pFAK (εστιακή κινάση προσκόλλησης), που είναι σημαντικά μόρια για την πρόσδεση των κυττάρων στην FN. Συμπερασματικά, η μελέτη περιγράφει ένα καινούριο μηχανισμό σηματοδότησης στα ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος: η έκκριση της λουμικάνης στον εξωκυττάριο χώρο αποτελεί έναν ενδογενή αναστολέα της δράσης του αυξητικού παράγοντα TGF- $\beta 2$ και έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή των μορίων pSmad 2, $\beta 1$ ιντεγκρίνης και pFAK και την ρύθμιση της προσκολλητικής ικανότητας των κυττάρων του οστεοσάρκωματος (Nikitovic et al., 2011).

Στην συνέχεια, μελετήθηκε η επίσης λειτουργικά σημαντική SLRP, διγλυκάνη στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος. Η διγλυκάνη συμμετέχει στην ομοιόσταση και στην ανάπτυξη των οστών καθώς και στην παθολογία τους. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή ήταν η MG63. Τα αποτελέσματα αρχικά έδειξαν ότι η διγλυκάνη αυξάνει τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων του

οστεοσαρκώματος ($p \leq 0.001$). Στην συνέχεια, ο IGF-I αποδείχτηκε ότι αυξάνει στατιστικά σημαντικά την έκφραση της διγλυκάνης ($p \leq 0.01$) και αντιθέτως η έλλειψη έκφρασης της διγλυκάνης από τα κύτταρα μείωσε στατιστικά σημαντικά το βασικό αλλά και τον επαγόμενο από τον IGF-I πολλαπλασιασμό των MG63 κυττάρων ($p \leq 0.001$; $p \leq 0.01$). Η παραπάνω ρύθμιση του πολλαπλασιασμού ήταν αποτέλεσμα της σηματοδότησης μέσω του υποδοχέα IGF-IR, του οποίου η ενεργοποίηση αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά ($p \leq 0.01$) στα MG63 κύτταρα με ελλιπή έκφραση διγλυκάνης. Η διγλυκάνη έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι μπορεί να ρυθμίσει το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης. Στην παρούσα μελέτη αποδείχτηκε ότι η διγλυκάνη αυξάνει στατιστικά σημαντικά την έκφραση της β -κατενίνης σε πρωτεϊνικό επίπεδο καθώς και τον εντοπισμό της στο κυτταρόπλασμα ($p \leq 0.01$), την μεμβράνη ($p \leq 0.01$) και τον πυρήνα των κυττάρων MG63 οστεοσαρκώματος ($p \leq 0.05$). Μελέτες ανοσοφθορισμού μας έδειξαν ότι η αύξηση της β -κατενίνης οφείλεται στον συν-εντοπισμό της διγλυκάνης και του Wnt συν-υποδοχέα LRP6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 6) που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της αποδόμησης της β -κατενίνης, καθώς και συν-εντοπισμό της β -κατενίνης και του ενεργοποιημένου υποδοχέα pIGF-IR στο κυτταρόπλασμα και στην μεμβράνη των MG-63 κυττάρων. Ο συν-εντοπισμός αυτός ήταν ακόμα πιο έντονος μετά την εξωγενή προσθήκη διγλυκάνης. Παράλληλα, η ελλιπή έκφραση της διγλυκάνης μείωσε στατιστικά σημαντικά την βασική αλλά και την επαγόμενη από τον IGF-I ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μορίου ERK1/2, ($p \leq 0.001$). Συμπερασματικά, η διατριβή αυτή παρουσιάζει ένα καινούριο μηχανισμό όπου η διγλυκάνη μέσω του LRP6/ β -κατενίνη/IGF-IR σηματοδοτικού άξονα ενισχύει την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων του οστεοσαρκώματος (Aggelidakis et al., 2018).

Συνολικά τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής περιγράφουν δύο νέους μηχανισμούς με τους οποίους ελέγχονται δύο σημαντικές λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων, η προσκόλληση και ο πολλαπλασιασμός, από την λουμικάνη και την διγλυκάνη, αντίστοιχα. Οι δύο αυτές SLRPs αποδεικνύεται ότι μπορούν να αποτελούν μόρια στόχους για την ρύθμιση της εξέλιξης των καρκινικών κυττάρων του οστεοσαρκώματος και δημιουργούν τις προϋποθέσεις για μια πιο αποτελεσματική θεραπευτική αντιμετώπιση των όγκων μεσεγχυματικής προέλευσης.

Abstract

Osteosarcomas comprise approximately 1% of total malignant tumors diagnosed every year and they have a mesenchymal origin. Osteosarcoma is the second most common primary bone tumor, after myeloma and 20% of all sarcomas of the bone are osteosarcomas. Its incidence is higher during the second decade and lower in the sixth decade of the human life. An important characteristic of osteosarcoma is its heterogeneity and ability to produce abundant non-mineralized ECM–osteoid, mainly consisting of collagen type I, glycoproteins, and proteoglycans (PGs)/GAGs (Benayahu et al., 2001; Nikitovic et al., 2013).

The small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) were originally defined as proteoglycans with a relatively small protein core (36–42 kDa) harboring tandem leucine-rich repeats and undergoing post-translational modifications, including substitution with glycosaminoglycan side chains of various types (Iozzo and Murdoch 1996; Iozzo 1997). Their ubiquitous tissue distribution and expression at strategic sites in embryogenesis and tissue repair, coupled with their protein conservation, suggests that SLRP functions are of no small consequence. Originally, the SLRPs were grouped into three distinct classes based on nucleotide and protein sequence conservation, the organization of disulfide bonds at their N and C termini, and their genomic organization (Iozzo 1997; Danielson et al., 1993). More recently, the SLRP gene family has expanded to encompass 18 genes classified into five distinct subfamilies (Schaefer and Iozzo 2008; Iozzo et al., 2011), additionally based on N-terminal Cys-rich clusters of the protein core and ear repeats (C-terminal repeats specific to SLRPs) (McEwan et al., 2006), chromosomal organization (Schaefer and Iozzo 2008; Iozzo et al., 2011), and, importantly, functional commonality in view of the fact that some SLRPs are not

classical proteoglycans (Schaefer and Iozzo 2008). Thus, the canonical class I members decorin and biglycan contain chondroitin or dermatan sulfate side chains, whereas the more recently described asporin does not (Henry et al., 2001; Kisawa et al., 2005). On the other hand, all class II members bear keratan sulfate chains or polyglucosamine in their leucine-rich repeats, whereas class III members carry keratan sulfate (osteoglycin), chondroitin/dermatan sulfate (epiphygan), or no glycosaminoglycan (optigin) chains (Schaefer and Iozzo 2008, Sanders et al., 2003). However, most non-canonical class IV and V members (Neame et al., 1994; Pusch et al., 2000; Ohta et al., 2006) unexpectedly lack any glycosaminoglycan chain, with the exception of chondroadherin, which is substituted with keratan sulfate (Neame et al., 1994). Therefore, the unique characteristics of their protein cores and the presence of glycosaminoglycans, together with specific post-translational modifications, notably changes in the degree of glycosaminoglycan epimerization or sulfation, characterize this class of proteoglycans with high structural complexity.

The present PhD thesis investigated the role of two important SLRPs, lumican and biglycan, in the regulation of osteosarcoma cell function.

Our research group has shown that human osteosarcoma cell lines express and secrete lumican partly substituted with keratan sulfate glycosaminoglycans Nikitovic et al., 2008. Lumican appears to have a role in osteosarcoma pathogenesis, as the growth of Saos 2 osteosarcoma cells was inhibited by lumican, whereas their migration and chemotactic response to fibronectin were found to be promoted (Nikitovic et al., 2008). These key tumor cell functions appear to be modulated through, crucial for bone tumor cells, Smad signaling pathway (Nikitovic et al., 2008). In this study, we examine the effect of lumican on osteosarcoma cell adhesion and investigate the hypothesis that lumican through the modulation of the pericellular availability of the transforming

growth factor-beta (TGF- β) isoform/s regulates its downstream intracellular signaling and thus affects cell functions. Human osteosarcoma cell lines were recently shown to express and secrete the small leucine rich proteoglycan (SLRP) lumican, with the ability to regulate the growth and motility of these cells. In this study, lumican-deficient Saos 2 cells were demonstrated to have increased adhesive capability onto fibronectin (FN) ($p \leq 0.01$). Upon neutralization of endogenous transforming growth factor $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) activity, no difference in the ability of lumican siRNA-transfected and scramble siRNA-transfected Saos 2 cells to adhere onto FN was detected ($p = \text{NS}$). Exogenous TGF- $\beta 2$ was shown to stimulate Saos 2 cell adhesion to FN ($p \leq 0.01$). These results therefore, suggest that the inverse correlation existing between lumican expression and Saos 2 cell adhesion is dependent on active TGF- β signaling. Furthermore, the significant increase in Smad 2 activation present in lumican-deficient cells ($p \leq 0.01$) was annulled in the presence of the anti-TGF- $\beta 2$ peptide, demonstrating that lumican is an upstream regulator of the TGF- $\beta 2$ /Smad 2 signaling cascade. Crucial to FN-dependent adhesion, $\beta 1$ integrin expression and pFAK activation were likewise identified as downstream TGF- $\beta 2$ effectors regulated by lumican expression. In conclusion, this study demonstrates a novel out-in signaling circuit in human osteosarcoma cells: secreted to extracellular matrix lumican is an endogenous inhibitor of TGF- $\beta 2$ activity, resulting in downstream effector modulation including pSmad 2, integrin $\beta 1$ and pFAK to regulate osteosarcoma adhesion.

Furthermore, this study investigated osteosarcoma cell function modulation of the equally important SLRP, biglycan.

Biglycan, a small leucine rich proteoglycan (SLRP), is an important participant in bone homeostasis and development as well as in bone pathology. In the present study biglycan was identified as a positive regulator of MG63 osteosarcoma cell growth ($p \leq$

0.001). IGF-I was shown to increase biglycan expression ($p \leq 0.01$), whereas biglycan-deficiency attenuated significantly both basal and IGF-I induced cell proliferation of MG63 cells ($p \leq 0.001$; $p \leq 0.01$, respectively). These effects were executed through the IGF-IR receptor whose activation was strongly attenuated ($p \leq 0.01$) in biglycan-deficient MG63 cells. Biglycan, previously shown to regulate Wnt/b-catenin pathway, was demonstrated to induce a significant increase in b-catenin protein expression evident at cytoplasmic ($p \leq 0.01$), membrane ($p \leq 0.01$), and nucleus fractions in MG63 cells ($p \leq 0.05$). As demonstrated by immunofluorescence, increase in b-catenin expression is attributed to co-localization of biglycan with the Wnt co-receptor low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) resulting in attenuated b-catenin degradation. Furthermore, applying anti-b-catenin and anti-pIGF-IR antibodies to MG-63 cells demonstrated a cytoplasmic and to the membrane interaction between these molecules that increased upon exogenous biglycan treatment. In parallel, the downregulation of biglycan significantly inhibited both basal and IGF-I-dependent ERK1/2 activation, ($p \leq 0.001$). In summary, we report a novel mechanism where biglycan through a LRP6/b-catenin/IGF-IR signaling axis enhances osteosarcoma cell growth (Aggelidakis et al., 2018).

In summary, the results of this PhD thesis described two novel mechanisms with which two important cancer cell functions were modulated, adhesion and proliferation by lumican and biglycan respectively. These SLRPs are suggested to be used as target molecules for the regulation of osteosarcoma progression and maybe part of therapy treatments for tumors of mesenchymal origin.

Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή

<u>1.1 Οστεοσάρκωμα</u>	1
1.1.1 Γενικά.....	1
1.1.2 Γενετικοί παράγοντες.....	2
1.1.3 Κλινική εικόνα.....	2
1.1.4 Απεικόνιση.....	3
1.1.5 Παθολογία.....	5
1.1.6 Κλινικοί και ιστολογικοί τύποι οστεοσαρκώματος.....	6
1.1.7 Ιστολογική Ταξινόμηση.....	8
1.1.8 Διάγνωση.....	9
1.1.9 Πρόγνωση-Θεραπεία.....	15
1.1.10 Επιβίωση.....	19
<u>2.1 Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) και μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRPs)</u>	19
2.1.1 Συνδετικός Ιστός – Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM).....	19
2.1.2 Πρωτεογλυκάνες.....	20
<u>2.2 Μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRPs)</u>	24
2.2.1 Εισαγωγή.....	24
2.2.2 Δομή και ταξινόμηση των SLRPs.....	24
2.2.3 Λειτουργικό δίκτυο των SLRPs.....	28
2.2.4 Βασικοί ρόλοι των SLRPs στη φυσιολογία των οστών.....	33
2.2.5 Ρόλοι στις εκφυλιστικές νόσους των οστών.....	38

2.2.6 Ρόλοι στην εξέλιξη των όγκων των οστών.....	40
2.2.7 Πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες για νόσους των οστών.....	43
<u>2.3 Αυξητικός παράγοντας του μετασχηματισμού TGF-β.....</u>	<u>44</u>
<u>2.4 Αυξητικός παράγοντας IGF-I και υποδοχέας IGF-IR.....</u>	<u>46</u>
<u>2.5 Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης.....</u>	<u>49</u>
<u>2.6 Στόχοι της διατριβής.....</u>	<u>53</u>
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	55
<u>2.1 Υλικά.....</u>	<u>55</u>
<u>2.2 Κυτταροκαλλιέργειες.....</u>	<u>56</u>
<u>2.3 Απομόνωση του RNA και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πραγματικού χρόνου (Real-timePCR).....</u>	<u>56</u>
<u>2.4 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western.....</u>	<u>59</u>
<u>2.5 Απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνικών δειγμάτων.....</u>	<u>60</u>
<u>2.6 Σίγανση με siRNA.....</u>	<u>61</u>
<u>2.7 Δοκιμασία κυτταρικής προσκόλλησης.....</u>	<u>62</u>

<u>2.8 Δοκιμασία κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....</u>	62
<u>2.9 Ανοσοφθορισμός κυττάρων.....</u>	63
<u>2.10 Στατιστική ανάλυση.....</u>	64
3. Αποτελέσματα.....	65
<u>3.1 Περίληψη.....</u>	65
<u>3.2 Ο ρόλος της λουμικάνης στην προσκόλληση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.....</u>	67
<u>3.3 Δράση της λουμικάνης στην TGF-β2 ρυθμιζόμενη κυτταρική προσκόλληση.....</u>	69
<u>3.4 Επίδραση του ενδογενούς TGF-β2 στην ενεργοποίηση της Smad2 των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.....</u>	72
<u>3.5 Η λουμικάνη επηρεάζει την εξαρτώμενη από τον ενδογενή TGF-β ενεργοποίηση της Smad 2.....</u>	74
<u>3.6 Η λουμικάνη μεταβάλλει την έκφραση της ιντεγκρίνης β1 ρυθμίζοντας τη σηματοδότηση του TGF-β.....</u>	76
<u>3.7 Δράση του TGF-β2 στη φωσφορυλίωση της FAK (397) κινάσης... </u>	78

<u>3.8 Η επίδραση της λουμικάνης στη φωσφορυλίωση της FAK κινάσης.</u>	79
<u>3.9 Ο ρόλος της FAK κινάσης στην κυτταρική προσκόλληση του οστεοσαρκώματος</u>	80
4. Αποτελέσματα	82
<u>4.1 Περίληψη</u>	82
<u>4.2 Ο ρόλος της διγλυκάνης στον επαγόμενο από τον IGF-I πολλαπλασιασμό των MG63 κυττάρων του οστεοσαρκώματος</u>	83
<u>4.3 Δράση του IGF-I στην ρύθμιση της έκφρασης της διγλυκάνης</u>	84
<u>4.4 Ο ρόλος της διγλυκάνης στην ρύθμιση του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού (β-κατενίνη)</u>	90
<u>4.5 Η δράση της β-κατενίνης στην σηματοδότηση του IGF-1R στο οστεοσάρκωμα</u>	94
<u>4.6 Συν-εντοπισμός της Διγλυκάνης με τον LRP6 υποδοχέα</u>	97
<u>4.7 Αλληλεπίδραση μεταξύ β-κατενίνης και IGFR σηματοδότησης</u>	99
<u>4.8 Αύξηση του κανονικού (canonical) σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης από την διγλυκάνη στα MG63 κύτταρα</u>	101

4.9 Ο ρόλος του ERK1/2 στην επαγόμενη από την διγλυκάνη
σηματοδότηση του IGF-I.....102

5. Συζήτηση.....104

5.1 Η λουμικάνη ρυθμίζει την ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων του
οστεοσαρκώματος μεταβάλλοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-
β2.....104

5.2 Η διγλυκάνη ρυθμίζει την ανάπτυξη των κυττάρων MG63
οστεοσαρκώματος μέσω της σηματοδότησης LPR6/β-catenin/IGFR-
IR.....108

5.3 Τελικά συμπεράσματα.....113

6. Βιβλιογραφικές Αναφορές.....116

Βιογραφικό

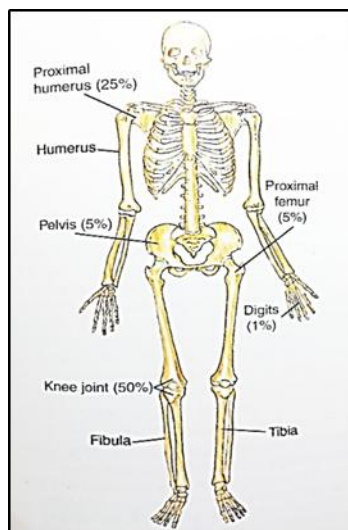
1.Εισαγωγή

1.1 Οστεοσάρκωμα

1.1.1 Γενικά

Το οστεοσάρκωμα είναι ένας όγκος υψηλής κακοήθειας, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία νεοπλασματικών ατρακτωειδών κυττάρων που παράγουν οστεοειδές (Miller 2008). Αποτελεί τον δεύτερο σε συχνότητα πρωτοπαθή όγκο των οστών μετά το μυέλωμα. Όσον αφορά την επιδημιολογία του οστεοσαρκώματος, εμφανίζεται συχνότερα στους άντρες σε αναλογία 1,5:1 (1000 έως 1500 νέα περιστατικά ανά έτος στην Αμερική) (Stoller 2007). Το οστεοσάρκωμα εμφανίζεται πιο συχνά στην δεύτερη δεκαετία της ζωής. Η συχνότητα εμφάνισής του μετά την έκτη δεκαετία είναι εξαιρετικά περιορισμένη. Επίσης, το οστεοσάρκωμα προσβάλλει συχνότερα τις μεταφύσεις των οστών και το 50% αυτών εμφανίζεται στο γόνατο (Εικόνα 1.1) (Λαμπίρης 2003; Greenspan et al., 2007).

Εικόνα 1.1



Εικόνα 1.1: Συχνότερα σημεία εμφάνισης του οστεοσαρκώματος στον ανθρώπινο σκελετό (Lieberman 2009).

1.1.2 Γενετικοί παράγοντες

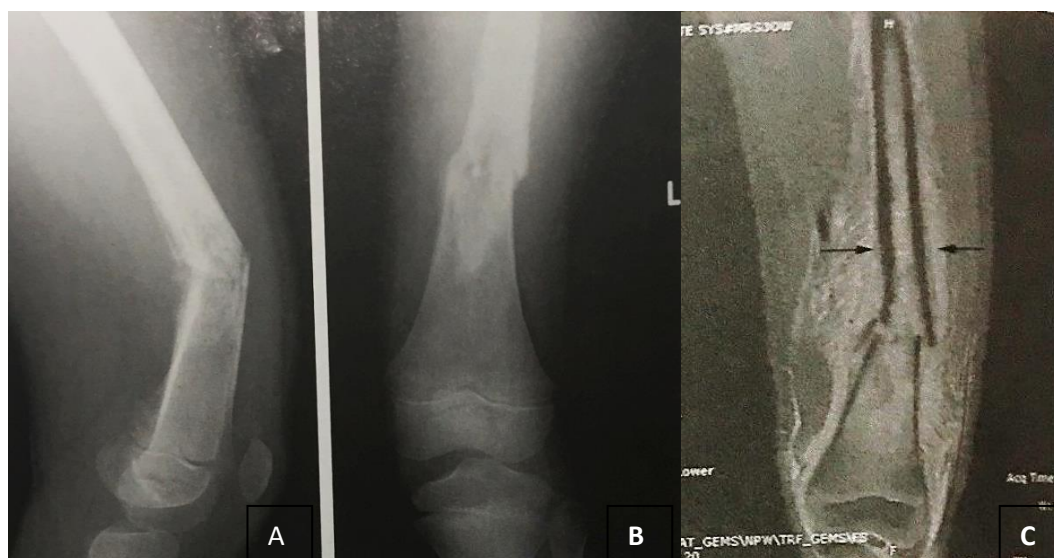
Το οστεοσάρκωμα έχει συσχετιστεί με προηγηθείσα έκθεση σε ακτινοβολία καθώς και με το ρετινοβλάστωμα. Η ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος σχετίζεται με το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RB1), ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, η σημειακή μετάλλαξη του οποίου, στη θέση 13q14 του χρωμοσώματος, συσχετίζεται με αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης οστεοσαρκώματος κατά 514 φορές (Stoller 2007). Επίσης, έχει παρατηρηθεί αύξηση της επίπτωσης σε ασθενείς με p53 μετάλλαξη, σε άτομα με την νόσο Paget ή σύνδρομο Rothmund-Thomson στο γονίδιο RECQL4 στο χρωμόσωμα 8q24 (Herring 2008). Άλλα ογκογονίδια που υπερεκφράζονται στους ιστούς του οστεοσαρκώματος είναι τα MDM2, HER2, c-myc και c-fos (Lieberman 2009; Greenspan et al., 2007). Επίσης, αυξημένη επίπτωση στο σύνδρομο Li Fraumeni με αντιγονίδια: Rb, p53, 18q/Rb53,13q (Χατζηπαύλου et al., 2004).

1.1.3 Κλινική εικόνα

Στους ασθενείς με οστεοσάρκωμα συχνά παρουσιάζεται διαλείπων πόνος που εξελίσσεται σε συνεχόμενο (νυχτερινό ή πόνο ανάπαυσης) που δεν υποχωρεί με την αναλγητική αγωγή (Lieberman 2009). Επίσης, οι πάσχοντες παρουσιάζουν οίδημα, περιορισμό κίνησης του άκρου ή όποια μπορεί να συνοδεύεται με αδυναμία ανάλογα με την περιοχή που βρίσκεται. Συχνά διαγιγνώσκεται μετά από αθλητικές δραστηριότητες σε νέους ασθενείς σαν τυχαίο εύρημα, άλλοτε θεωρούν οι ασθενείς ότι είναι αποτέλεσμα παλαιού τραύματος στην περιοχή (Lieberman 2009). Η πιο συχνή περιοχή παρουσίας του κλασσικού οστεοσαρκώματος είναι: η μετάφυση στο περιφερικό τμήμα του μηρού, το κεντρικό τμήμα της κνήμης, το κεντρικό τμήμα του

βραχιονίου οστού και στην πύελο. Το 10% των ασθενών με οστεοσάρκωμα διαγιγνώσκεται από παθολογικό κάταγμα (Εικόνα 2.2) (Herring 2008; Wiesel et al., 2011).

Εικόνα 2.2



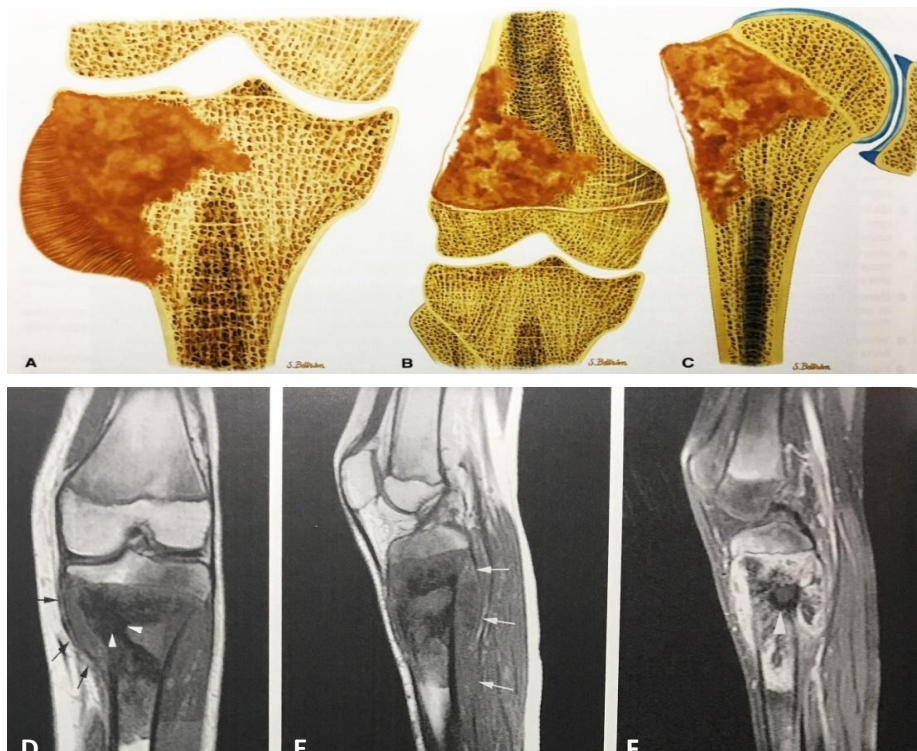
Εικόνα 2.2: Παθολογικό κάταγμα αποτέλεσμα της παρουσίας οστεοσαρκώματος στο περιφερικό μηριαίο οστό. Στα A και B οι ακτινογραφίες παρουσιάζουν ένα μετατοπισμένο κάταγμα στο περιφερικό μηριαίο οστό. Η μυελώδης κοιλότητα άμεσα περιφερικά στο κάταγμα δείχνει περιοχές με μεικτή ένταση ακτινοβολίας. Παρατηρείτε περιοστική ανύψωση που φαίνεται καλύτερα στην πλευρική ακτινογραφία ακριβώς δίπλα στο κάταγμα και υποδηλώνει επίσης την ύπαρξη παθολογικού κατάγματος. Στο C από μαγνητικό τομογράφο παρουσιάζουν την μάζα του όγκου που διηθεί στο μαλακό ιστό. Τα μαύρα τόξα της εικόνας δείχνουν το εκτεταμένο οίδημα που συσχετίζεται με το κάταγμα (Herring 2008).

1.1.4 Απεικόνιση

Κλασικά το οστεοσάρκωμα εμφανίζεται με αδιευκρίνιστη εικόνα αποδόμησης και οστεοπαραγωγής του οστού. Στους περισσότερους ασθενείς με σκελετική ανωριμότητα ο όγκος δεν ξεπερνά την επιφυσιική πλάκα. Στα περισσότερα

περιστατικά της νεοπλασίας αυτής παρατηρείται διάσπαση του φλοιού με μάζα μαλακών μορίων γειτονικά με τα τρίγωνα Codman (φυσιολογική αντίδραση του οστού κοντά στον όγκο) (Stoller 2007, 2008). Το κλασσικό οστεοσάρκωμα προέρχεται από το φλοιώδες οστό. Η ακτινολογική διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει την οστεομυελίτιδα και το σάρκωμα Ewing (Stoller 2007, 2008). Το σπινθηρογράφημα με TechnetiumTc 99m θα εμφανίσει τυχόν απομακρυσμένες εστίες του όγκου. Η αξονική τομογραφία αναδεικνύει με μεγάλη ακρίβεια την έκταση και τα χαρακτηριστικά της οστικής διάβρωσης και ελέγχει ή όχι την ύπαρξη πνευμονικών μεταστάσεων (Χατζηπαύλου et al., 2004). Επιπρόσθετα, η μαγνητική τομογραφία απεικονίζει το μέγεθος του μυελού που εμπλέκεται, την εγγύτητα με τα μαλακά μόρια και τις νευραγγειακές δομές καθώς και τις γειτονικές μεταστάσεις (Stoller 2007, 2008) (Εικόνα 1.3).

Εικόνα 1.3



Εικόνα 1.3: (A, B, C) Πρωτογενές οστεοσάρκωμα. Εικονική αναπαράσταση του γονάτου και του ώμου δείχνει σκληρωτικές και λυτικές περιοχές οστεοσαρκόματος και επιθετικές περιosteϊκές αντιδράσεις που αφορούν την κεντρική κνήμη (A), το περιφερικό μηριαίο οστό (B) και τον εγγύς βραχίονα (C). (D, E, F) Οστεοσάρκωμα στην κεντρική κνήμη. Στεφανιαία(D),οβελιαία (E) T1-σταθμισμένες εικόνες που δείχνουν αντικατάσταση του μυελού με την διαβρωμένη φλοιώδη περιοχή και μια μάζα μαλακού ιστού με ενδιάμεσο σήμα (τοξάκια). Οι περιοχές της σκλήρυνσης είναι μεσαίας με μικρής ακτινοβολίας (κεφάλια τόξων). Η μάζα του οστεοσαρκόματος και του μαλακού ιστού έχει αυξημένη ακτινοβολία στην T2 spin-echo εικόνα (F). (Stoller 2008)

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων θα πρέπει να γίνεται πάντα λαμβάνοντας αρχικά υπόψη τα ευρήματα της απλής ακτινογραφίας (Χατζηπαύλου etal., 2004). Τέλος, το σπινθηρογράφημα αναδεικνύει την οστεοβλαστική δραστηριότητα των οστών και είναι θετικό στις περιπτώσεις όγκων, αποτελεί δε μέθοδο με υψηλή ευαισθησία στην αναγνώριση του όγκου αλλά όχι σε ικανοποιητικά επίπεδα στην διαφορική διάγνωσή του (Χατζηπαύλου etal., 2004) (Εικόνα 1.4).

Εικόνα 1.4

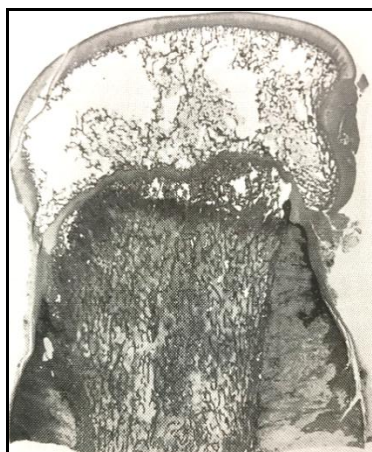


Εικόνα 1.4: Σπινθηρογράφημα οστών: αυξημένη καθήλωση ραδιοφαρμάκου στο άνω τριτημόριο της δεξιάς κνήμης (Χατζηπαύλουetal., 2004).

1.1.5 Παθολογία

Το οστεοσάρκωμα έχει μικτή εμφάνιση με ποικιλία από μαλακή σαρκοματώδη μάζα που γίνεται σταθερή, σφιχτή, με ινώδη ή σκληρυντική βλάβη (Εικόνα 1.5) (Herring 2008).

Εικόνα 1.5



Εικόνα 1.5. Οστεοσάρκωμα στον εγγύς βραχίονα. Φωτομικρογραφία οβελιαίας τομής από δείγμα ακρωτηριασμού. Το νεόπλασμα είναι μετατοπισμένο, έχει διηθήσει τον φλοιό και αυξήσει το περίοστεο. Η επίφυση είναι ανέπαφη, παραβιάζεται μόνο αργότερα κατά τη διάρκεια της νόσου (μεγένθυση x10) (Herring 2008).

1.1.6 Κλινικοί και ιστολογικοί τύποι οστεοσαρκώματος

Τύποι οστεοσαρκώματος σύμφωνα με τους Λαμπίρη 2003 και Χατζηπαύλου et al., 2004.

A. Πρωτογενές οστεοσάρκωμα:

1. κλασικό κεντρικό υψηλής κακοήθειας, επιθηλιοειδές (80%)
2. κεντρικό χαμηλής κακοήθειας (<2%)
3. τηλεαγγειεκτατικό (3%)
4. πολυεστιακό
5. γναθικό

B. Επιφανειακό οστεοσάρκωμα

1. παραοστικό (3%-5%), πιο συχνό στις γυναίκες (Χατζηπαύλου 2004)
2. περιοστικό (1%-2%)

3. επιφανειακό υψηλής κακοήθειας (8%)

Γ. Δευτερογενές οστεοσάρκωμα (6%)

1. επί εδάφους Paget

2. μετά από ακτινοβολία

3. αδιαφοροποίητο

Δ. Εξωσκελετικό οστεοσάρκωμα, εξαιρετικά σπάνιο (Campbell 2008). (Εικόνα

1.6)

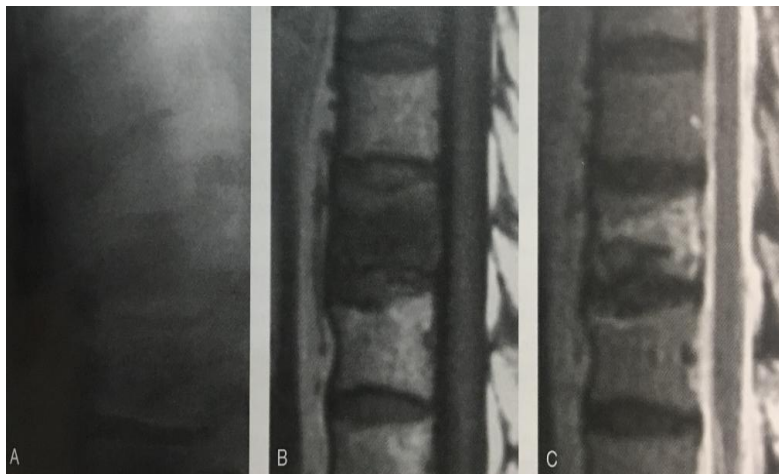
Εικόνα 1.6



Εικόνα 1.6: Ακτινογραφία από τον πήχη ενός 33 ετών ασθενή που παρουσιάζει ανώριμη οστεοποίηση με την μορφή μάζας του μαλακού ιστού και αποδείχτηκε να είναι εξωσκελετικό οστεοσάρκωμα (Canale and Beaty 2008).

Ε. Σπονδυλικό οστεοσάκωμα (1%) (Lieberman 2009). (Εικόνα 1.7)

Εικόνα 1.7



Εικόνα 1.7: Εικόνα από σπονδυλική στήλη ασθενούς με συμπτώματα συμπίεσης κατάγματος της σπονδυλικής στήλης. (A) Η ακτινογραφία δεν παρουσιάζει καμία δυσμορφία. Στο T1 – (B) και στο T2- (C) μαγνητικής τομογραφίας, η ίδια σπονδυλική στήλη φαίνεται να παρουσιάζει οστικό οίδημα ενδεικτικό παθολογικής κατάστασης ή κατάγματος (Lieberman 2009).

1.1.7 Ιστολογική Ταξινόμηση

Οι τύποι του οστεοσαρκώματος ταξινομούνται σε τρία στάδια, ανάλογα με την βιολογική τους συμπεριφορά. Η ακτινογραφία είναι ο καλύτερος προγνωστικός δείκτης για τον καθορισμό της συμπεριφοράς του όγκου. Χρησιμοποιείται ένα συγκεκριμένο σύστημα για την σταδιοποίηση του οστεοσαρκώματος που ονομάζεται: Σύστημα σταδιοποίησης όγκων κατά Enneking (Musculoskeletal Tumor Society). Το παραπάνω σύστημα βασίζεται: 1) στον βαθμό κακοήθειας, 2) στην ανατομική εντόπιση, 3) στην παρουσία ή απουσία μεταστάσεων (Χατζηπαύλου 2004, Πίνακας 1.1).

Άλλες ταξινομήσεις αναφέρονται από τους Miller et al., 2012, Greenspan et al. και Σκοπελίτου 2002.

Πίνακας 1.1

Στάδιο	Ιστολογική Ταξινόμηση	Θέση	Μετάσταση
IA	Χαμηλού βαθμού κακοήθεια (G1)	Ενδοδιαμερισματικός (T1)	Όχι (Mo)
I	Χαμηλού βαθμού κακοήθεια (G1)	Εξωδιαμερισματικός (T2)	Όχι (Mo)
IIA	Υψηλού βαθμού κακοήθεια (G2)	Ενδοδιαμερισματικός (T1)	Όχι (Mo)
IIIB	Υψηλού βαθμού κακοήθεια (G2)	Εξωδιαμερισματικός (T2)	Όχι (Mo)
IIIA	(G1 ή G2)	Ενδοδιαμερισματικός (T1)	Ναι (M1)
IIIB	(G1 ή G2)	Ενδοδιαμερισματικός (T2)	Ναι (M1)

(Χατζηπαύλου 2004)

1.1.8 Διάγνωση

A. Κλινική εικόνα

Στους ασθενείς με οστεοσάρκωμα εμφανίζεται ήπιο άλγος, που στην αρχή έχει διαλείποντα χαρακτήρα, αργότερα εξελίσσεται σε συνεχόμενο και εντονότερο που συχνά ξυπνά τον ασθενή την νύχτα. Υπάρχει έντονη τοπική ευαισθησία. Συχνά συνοδεύεται από οίδημα και τοπική διόγκωση. (Λαμπίρη 2003, Χατζηπαύλου et al., 2004). Σε οστεολυτικούς τύπους σαρκωμάτων συχνά διαπιστώνονται παθολογικά κατάγματα στους ασθενείς.

B. Εργαστηριακές εξετάσεις

Οι εργαστηριακές εξετάσεις των ασθενών με οστεοσάρκωμα παρουσιάζουν, υψηλές τιμές αλκαλικής φωσφατάσης ALP και γαλακτικής αφυδρογενάσης LDH και σχετίζονται με κακή πρόγνωση. Επίσης, οι εξετάσεις δείχνουν αύξηση ΤΚΕ και αναιμία. Σε πειραματικό στάδιο βρίσκεται η συσχέτιση της παρουσίας μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMP) με το οστεοσάρκωμα. (Χατζηπαύλου et al., 2004).

Γ. Απεικονιστικός έλεγχος

Πραγματοποιείται ακτινολογικός έλεγχος, στον οποίο ο όγκος παρουσιάζεται σαν μικρή οστεολυτική, οστεοσκληριντική εξεργασία που χαρακτηρίζεται από ασαφή όρια, ξεκινά ενδομυελικά και επεκτείνεται στα μαλακά μόρια. Η διάσπαση του φλοιού και η επακόλουθη υπέργερση του περιostίου από τον όγκο έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό νέου οστού (Greenspan et al., 2007).

Στα περιφερικά τμήματα του όγκου που ξεκινά η υπέργερση του περιostίου σχηματίζονται τα τρίγωνα Godman. Στις κεντρικότερες περιοχές του οστού η υπέργερση του περιostίου αποκολλά τα αγγεία προς τα έξω και δίνει ακτινολογική εικόνα με ακτινωτή διάταξη «σαν ακτίνες ήλιου». Η αγγειογραφία είναι σημαντική για την ανάδειξη της αγγειοβρίθειας και των ορίων του όγκου, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.8 (Greenspan et al., 2007).

Εικόνα 1.8



Εικόνα 1.8: Συμβατική μορφή οστεοσαρκώματος: αγγειογραφία. Η αγγειογραφία παρουσιάζει αγγειοβρίθεια ενός όγκου στην αριστερή κνημιαία μετάφυση. Επίσης, παρατηρούνται μη φυσιολογικά αγγεία όγκου του μαλακού ιστού. Βιοψία πραγματοποιείται συνήθως από τις πιο βιώσιμες (αγγειούμενες) περιοχές (Greenspan et al., 2007).

Επιπρόσθετα η αξονική τομογραφία αποτελεί εξέταση επιλογής για την ανάδειξη των ορίων του όγκου της οστικής διάβρωσης καθώς και για τον έλεγχο ύπαρξης πνευμονικών μεταστάσεων (Herring 2008). Οι δευτεροπαθείς εντοπίσεις εμφανίζονται συχνότερα στους πνεύμονες και μετά στα σπονδυλικά σώματα (Miller 2008).

Επίσης, σημαντικό διαγνωστικό ρόλο για τον έλεγχο μεταστάσεων αποτελεί το PET/CT και το PET/MRI (Behzadi et al., 2018).

Δ. Βιοψία

Η βιοψία αποτελεί την τελική φάση της διάγνωσης – σταδιοποίησης του όγκου και θα πρέπει να εκτελείται με συγκεκριμένες χειρουργικές-ογκολογικές αρχές. Έχει μεγάλη

αξία για τον παθολογοανατόμο, τον ορθοπαιδικό χειρουργό, τον ογκολόγο για την τελική θεραπεία.(Miller 2008)

Βασικές αρχές βιοψίας (Fischgrund 2007-2008; Miller 2008; Χατζηπαύλου 2004; Herring 2008):

- Σχεδιασμός της προσπέλασης των ιστών από τους οποίους θα διέλθει η βελόνη
- Απαγορεύονται οι εγκάρσιες χειρουργικές τομές βιοψίας
- Επιμελής αιμόσταση-αποφυγή αιματωμάτων
- Ταχεία ιστολογική εξέταση
- Όταν δεν είναι επαρκές το υλικό με την βιοψία δια βελόνης θα πρέπει να διενεργείται ανοικτή βιοψία
- Θα πρέπει να αποστέλλεται απαραίτητα το υλικό για καλλιέργεια και για ιστολογικό παθολογοανατομικό έλεγχο με αποφυγή λήψης αντιβιοτικών πριν την λήψη
- Ανασκόπηση των κλινικών-ακτινολογικών ευρημάτων με την βοήθεια ακτινολογικού – παθολογικού τμήματος πριν την βιοψία
- Η βιοψία θα πρέπει να προσαρμοστεί στην πλευρά της τελικής θεραπείας
- Να γίνεται το δυνατόν μικρότερη τομή επιμήκως των ινών
- Ελαχιστοποίηση του τραυματισμού των μυών αφαίρεση του όγκου όσον είναι δυνατόν αποφυγή δια μέσου των μυών
- Τα ράμματα θα πρέπει να είναι κοντά στην χειρουργική τομή ώστε να είναι δυνατή η αφαίρεση τους μαζί με το δέρμα στην τελική θεραπεία

- Θα πρέπει να γίνει επιλογή της καλύτερης πλευράς για την εκτομή του όγκου ώστε να είναι δυνατή η αφαίρεση των περιφερικών τμημάτων του όγκου και όχι του κεντρικού σημείου όπου υπάρχουν συνήθως νεκρωτικοί ιστοί. Η Μελέτη της MRI θα βοηθήσει αρκετά στο χειρουργικό πλάνο.
- Χρήση tourniquet όταν είναι εφικτό

E. Διαφορική διάγνωση

Η διαφορική διάγνωση του οστεοσαρκώματος είναι σημαντική για να διαχωριστεί από τα άλλα πρωτοπαθή σαρκώματα λόγω της διαφορετικής θεραπείας. Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες όπως η βιμεντίνη, η οστεοκαλσίνη, η οστεονεκτίνη και η αλκαλική φωσφατάση εκφράζονται από τα κύτταρα των περισσότερων οστεοσαρκωμάτων. Επίσης, έχει αναφερθεί σποραδική έκφραση-εστιακά και δεσμίνης, κυτοκερατίνης, πρωτεΐνης S100, ακτίνης και του επιθηλιακού μεμβρανικού αντιγόνου (EMA).

Η Διαφορική Διάγνωση περιλαμβάνει: καλοήθεις και κακοήθεις βλάβες:

- Γιγαντοκυτταρικό όγκο οστών
- Ανευρυσματική οστική κύστη
- Οστεοβλάστωμα
- Σάρκωμα Ewing
- Λέμφωμα
- Μεταστατικό νεόπλασμα

(Σκοπελίτου 2002, Χατζηπαύλου 2004)

Σε περίπτωση που ο ασθενής είναι παιδί μικρότερο των 5 ετών, θα πρέπει να γίνει διαφορική διάγνωση από το ιστοκύττωμα, μεταστατικό όγκο του Wilm's, και το νευροσβλάστομα (Herring 2008).

Μακροσκοπικά Ευρήματα (Σκοπελίτου 2002)

- Ερυθρόφαιης χροιάς όγκος
- Ορισμένοι όγκοι με διαφορετικό ποσοστό οστεοποίησης
- Χωρίς χαρακτήρες ειδικούς και αποκλειστικά δικούς του

Μικροσκοπικά Ευρήματα (Σκοπελίτου 2002)

- Το κλασσικό οστεοσάρκωμα χαρακτηρίζεται από την παραγωγή κακοήθους οστεοειδούς ή κακοήθων οστεοδοκίδων από τα πολλαπλασιαζόμενα νεοπλασματικά κύτταρα, διατασσόμενα σε ταινιοειδές, οφιοειδές ή «δίκην τάπητος» σχηματισμούς. Στο κακόηθες οστεοειδές και στις κακοήθεις οστεοδοκίδες μπορεί να εμφανίζονται και νεοπλασματικά κύτταρα που μπορεί να είναι ατρακτόμορφα, επιθηλιόμορφα ή στρογγυλά και μικρά σε διαφορετικές ποσότητες
- Είναι δυνατόν να συνυπάρχουν περιοχές χονδρόμορφες εναλλασσόμενες με οστεοβλαστικές αλλοιώσεις.
- Συνήθως η κυτταρολογική ατυπία είναι εμφανής αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις στις οποίες δεν είναι εύκολο να διαγνωστούν.

1.1.9 Πρόγνωση-Θεραπεία

Η κλασική θεραπεία του οστεοσαρκώματος είναι η νέο-επικουρική χημειοθεραπεία, ακολουθεί η χειρουργική εκτομή (διάσωση ή ακρωτηριασμός του μέλους). Ακολουθεί πρόσθετη επικουρική χημειοθεραπεία. Οι πιο συνηθισμένοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες είναι: adriamycin (doxorubicin), cisplatinum, methotrexate και ifosfamide (Fischgrund 2007-2008; Wiesel et al., 2011).

Η ακτινοθεραπεία δεν έχει θέση στην κλασική θεραπεία του οστεοσαρκώματος.

Χειρουργείο διάσωσης του άκρου επιχειρείται στο 90% των περιπτώσεων. Οι ασθενείς με παθολογικό κάταγμα μπορούν να θεραπευτούν με χειρουργείο διάσωσης του άκρου αλλά υπάρχει μεγαλύτερος κίνδυνος τοπικής υποτροπής σε παρεκτοπισμένα κατάγματα. Τοπική υποτροπή μετά από χειρουργική εκτομή αποτελεί το 5% των περιπτώσεων και συνοδεύεται από κακή πρόγνωση. Καλή ιστολογική αντίδραση και ευρεία χειρουργική εκτομή σχετίζονται με χαμηλό κίνδυνο τοπικής υποτροπής.

Οι επιλογές ανακατασκευής εξαρτώνται από την ηλικία του ασθενούς καθώς και την περιοχή που βρίσκεται ο όγκος, περιλαμβάνει μεταλλικές προθέσεις, εμφύλια αλλομοσχεύματα, σύνθετα προσθετικά αλλομοσχεύματα, ρυθμιζόμενες προθέσεις ή μοσχεύματα αγγειούμενης περόνης (μικροχειρουργική μέθοδος).

Η σταδιοποίηση του καρκινικού όγκου αποτελεί τον σημαντικότερο προγνωστικό δείκτη. Το ποσοστό νέκρωσης εντός του όγκου μετά την νέο-επικουρική χημειοθεραπεία είναι σχετικό με την συνολική διάσωση (>90% νέκρωση σχετίζεται με σημαντική διάσωση).

Η αύξηση της LDH και ALP έχει καταγραφεί ως φτωχός προγνωστικός παράγοντας.

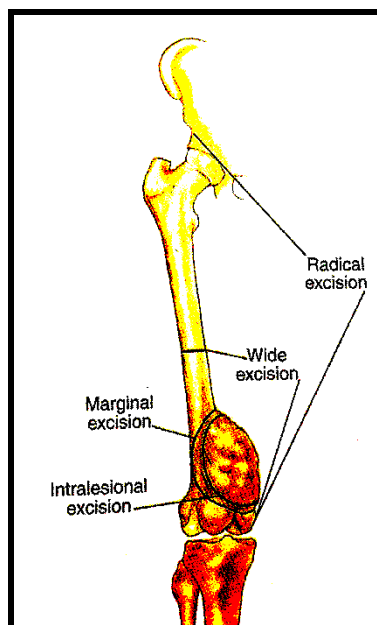
Όσον αφορά την χειρουργική θεραπεία των κακοήθων όγκων, σκοπός της είναι η ευρεία εκτομή του όγκου για την μείωση του κινδύνου τοπικής υποτροπής. Οι επεμβάσεις διάσωσης του μέλους πραγματοποιούνται όταν πληρούνται δύο βασικά κριτήρια:

- 1) Ο τοπικός έλεγχος του όγκου θα πρέπει να είναι τουλάχιστον ισοδύναμος με εκείνον που επιτυγχάνει ο ακρωτηριασμός του σκέλους.
- 2) Το σκέλος που πρέπει να διασωθεί με τις επεμβάσεις αυτές θα πρέπει να είναι λειτουργικό.

Ο στόχος θα είναι η εκτεταμένη εκτομή με επαρκή υγιή ιστό πέριξ του όγκου.

Τα όρια της χειρουργικής εκτομής ταξινομούνται με βάση το σύστημα σταδιοποίησης του Enneking (Εικόνα 1.9, Wiesel 2011).

Εικόνα 1.9



Εικόνα 1.9: Διαφορετικοί τύποι χειρουργικής εκτομής οστεοσαρκώματος από τον Martin M. Malawer (Wiesel 2011).

Οι χειρουργικές τεχνικές είναι (Campbell 2008):

A) Παρυφιαία ή οριακή εκτομή

Η εκτομή γίνεται στην αντιδραστική ζώνη του όγκου, η οποία χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδη κύτταρα, οίδημα, ινώδη ιστό και δορυφορικά κύτταρα του όγκου. Όταν αφορά κακοήθεις μεσεγχυματικούς όγκους, η παρυφιαία εκτομή έχει σαν αποτέλεσμα τοπική υποτροπή σε ποσοστό 25-50%. Είναι σημαντικό να διαπιστωθεί αν ο όγκος έχει καλή ανταπόκριση στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία (ποσοστά νέκρωσης του όγκου (95-100%).

B) Ευρεία εκτομή

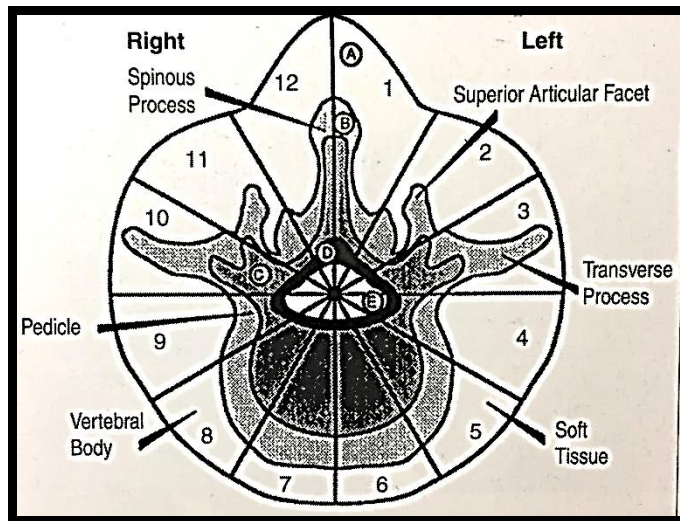
Η εκτομή περιλαμβάνει ολόκληρο τον όγκο μαζί με τμήμα περιβάλλοντος υγιούς ιστού. Μετά από ευρεία εκτομή το ποσοστό τοπικής υποτροπής είναι μικρότερο από 10 % .

Γ) Ριζική εκτομή.

Η αφαίρεση αφορά τον όγκο αλλά και το διαμέρισμα στο οποίο εντοπίζεται (οστόν, γειτονικοί περιβάλλοντες μύες, σύνδεσμοι, τένοντες, συνδετικοί ιστοί).

Δ) Προεγχειρητικός χειρουργικός σχεδιασμός για σπονδυλικούς όγκους (Fischgrund 2007-2008). (Εικόνα 1.10)

Εικόνα 1.10



Εικόνα 1.10: Προτεινόμενα χειρουργικά στάδια για όγκους της σπονδυλικής στήλης. A: εξω-οστικοί μαλακοί ιστοί, B: ενδο-οστικοί (επιφανειακοί), C: ενδο-οστικοί (βαθείς), D: εξω-οστικοί (εξωμηνιγγικοί). Τα νούμερα 1-12 είναι πιθανές θέσεις όγκων. (Fischgrund 2007-2008).

Επικουρική Θεραπεία

Η πολυπαραγοντική χημειοθεραπεία έχει σημαντική συμβολή τόσο στην αποτελεσματικότητα των χειρουργικών επεμβάσεων διάσωσης του μέλους όσο και στην ελεύθερη νόσου επιβίωση των ασθενών στην περίπτωση του οστεοσαρκώματος (Miller 2010). Ο συνηθέστερος μηχανισμός δράσης της χημειοθεραπείας είναι η αύξηση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (κυτταρική απόπτωση). Τα περισσότερα πρωτόκολλα χημειοθεραπείας περιλαμβάνουν προεγχειρητική χημειοθεραπεία για 8-24 εβδομάδες (Miller 2010). Μετά την ολοκλήρωση της προεγχειρητικής χημειοθεραπείας, γίνεται εκ νέου σταδιοποίηση και η επέμβαση διάσωσης του μέλους εάν είναι δυνατόν και ακολουθεί μετεγχειρητική χημειοθεραπεία για 6-12 μήνες. Η doxorubicin, μεγάλες δόσεις methotrexate, και cisplatin χρησιμοποιούνται συχνότερα (Miller 2010).

Οι ασθενείς με οστεοσάρκωμα χωρίς συστηματικές μεταστάσεις έχουν μέχρι 60-80% πιθανότητα για μακροχρόνια επιβίωση ελεύθερης νόσου με το συνδυασμό πολυπαραγοντικής χημειοθεραπείας και χειρουργικής επέμβασης με ευρεία εκτομή

του όγκου και 10%-20% επιβίωσης σε περιπτώσεις με παρουσία μεταστάσεων (Miller 2010). Η πλήρης χειρουργική αφαίρεση των μεταστάσεων αν είναι δυνατή θα παίζει ρόλο στην πρόγνωση του ασθενούς. Η πρόγνωση θα εξαρτηθεί από την έκφραση P – γλυκοπρωτεϊνών, την διήθηση μεγάλων αγγείων και το μεγάλο μέγεθος του όγκου (Χατζηπαύλου et al., 2004).

1.1.10 Επιβίωση

Η 5ετής επιβίωση στους ασθενείς με εντοπισμένο οστεοσάρκωμα στα άκρα είναι 65%-70%. Η 5ετής επιβίωση με πυελικό οστεοσάρκωμα είναι 25%. Η 5ετής επιβίωση σε ασθενείς με μεταστατική νόσο είναι 20%. Οι πιο συνηθισμένες μεταστάσεις είναι στους πνεύμονες και αμέσως μετά στα οστά. Επιθετική καθυστερημένη θεραπεία >1 έτους σε πνευμονικές μεταστάσεις με θωρακοτομή επιτυγχάνουν περίπου 30% 5ετή επιβίωση. Οι ασθενείς με οστικές μεταστάσεις εμφανίζουν την χειρότερη πρόγνωση πενταετούς επιβίωσης. Οι γειτονικές μεταστάσεις περιλαμβάνουν το 10% και έχουν παρόμοια πρόγνωση με τις πνευμονικές μεταστάσεις (Χατζηπαύλου et al., 2004; Λαμπίρης 2003; Miller 2010; Σκοπελίτου 2002).

2.1 Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) και μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRPs)

2.1.1 Συνδετικός ιστός – Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM)

Στον ανθρώπινο οργανισμό αναγνωρίζονται τέσσερα είδη ιστών: ο επιθηλιακός, ο νευρικός, ο μυϊκός και ο ερειστικός ή συνδετικός. Στους συνδετικούς ιστούς ανήκουν

ιστοί με κοινή προέλευση αλλά διαφορετικές λειτουργίες, όπως παραδείγματος χάριν ο οστίτης ιστός, το αίμα και ο στηρικτικός ιστός. Κύριο χαρακτηριστικό όλων αυτών των τύπων είναι πως αποτελούνται από κύτταρα και άφθονη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (extracellular matrix – ECM). Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, πέρα από δομική και μηχανική στήριξη, συμβάλλει επίσης στην κυτταρική ανάπτυξη, επιβίωση, διαφοροποίηση και μορφογένεση των ιστών (Pickup et al., 2014). Η σημασία της γίνεται έντονα φανερή από το μεγάλο πλήθος συνδρόμων, σοβαρά και μη, που προκύπτουν από γενετικές ανωμαλίες των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Jarvelainen et al., 2009). Παράγεται από την πλειοψηφία των στηρικτικών κυττάρων του συνδετικού ιστού. Τα στηρικτικά κύτταρα παίζουν καθοριστικό ρόλο στη μηχανική στήριξη των ιστών, καθώς διαθέτουν μηχανισμούς προσκόλλησης, μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν κατά κύριο λόγο με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Τα κυριότερα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας είναι οι ινιδικές πρωτεΐνες, οι πρωτεογλυκάνες (PGs) και οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) (Jarvelainen et al., 2009; Schaefer and Schaefer, 2010). Οι κυριότερες ινιδικές πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας είναι το κολλαγόνο, η ινιδίνη, η ελαστίνη και η ινονεκτίνη (Frantz et al., 2010).

2.1.2 Πρωτεογλυκάνες

Οι πρωτεογλυκάνες (PGs) αποτελούνται από έναν πρωτεϊνικό κορμό, πάνω στον οποίο μία ή περισσότερες αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών συνδέονται ομοιοπολικά. Παρά το γεγονός ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό πρωτεϊνών έχουν τη δυνατότητα να γλυκοζυλιώνονται και να γίνονται πρωτεογλυκάνες, είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι τα μακρομόρια αυτά επιτελούν πλήθος λειτουργιών. Οι λειτουργίες αυτές εξαρτώνται από τον τύπο της πρωτεογλυκάνης και την τοπολογία της στον οργανισμό. Επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο σε σπονδυλωτούς και ασπόνδυλους οργανισμούς, σε ότι

αφορά την ανάπτυξη, διατήρηση και επιδιόρθωση των ιστών τους (Couchman and Pataki, 2012).

Στον οργανισμό, όλες οι αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών, εκτός του υαλουρονικού οξέος (HA), μπορούν να συνδεθούν ομοιοπολικά με έναν πρωτεϊνικό κορμό προκειμένου να προκύψει μία πρωτεογλυκάνη. Η ομοιοπολική αυτή ένωση συντελείται μέσω ενός συγκεκριμένου τρισακχαρίτη, ο οποίος περιλαμβάνει δύο κατάλοιπα γαλακτόζης (Gal) και ένα κατάλοιπο ξυλόζης (Xyl).

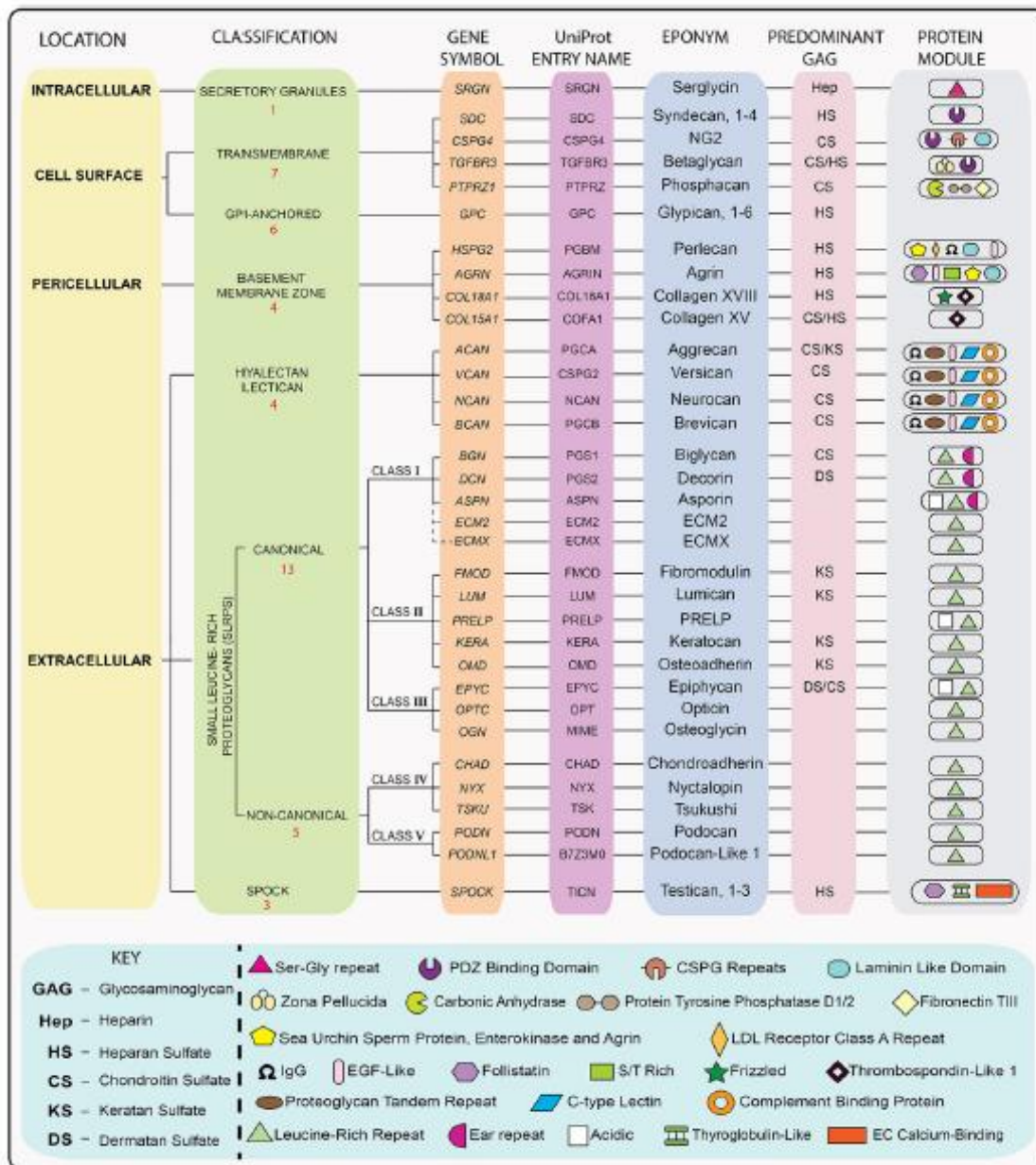
Κατά συνέπεια η συνολική ένωση έχει τη μορφή:



Τα κατάλοιπα αυτά συνδέονται με τον πρωτεϊνικό κορμό μέσω ενός Ο-γλυκοζιτικού δεσμού σε ένα κατάλοιπο σερίνης. Ορισμένες μορφές θειϊκής κερατάνης (KS) συνδέονται στον κορμό αυτό μέσω Ν-ασπαραγινλικού δεσμού (Gandhi and Mancera, 2008).

Προκειμένου να ταξινομηθούν οι πρωτεογλυκάνες, θα ληφθούν υπόψιν τρία κριτήρια. Τα κριτήρια αυτά είναι: η τοπολογία τους (κυτταρική ή υποκυτταρική), η συνολική έκφραση γονιδίων/πρωτεϊνών και η παρουσία συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μονάδων πάνω στους αντίστοιχους πρωτεϊνικούς κορμούς. Με βάση τα παραπάνω, προκύπτουν οι εξής PGs. (Εικόνα 1.11).

Εικόνα 1.11



Εικόνα 1.11: Κατηγοριοποίηση πρωτεογλυκανών (PGs). (Iozzo and Schaefer 2015)

Λαμβάνοντας υπόψιν το κριτήριο της τοπολογίας των πρωτεογλυκανών, προκύπτει μόνο μία ενδοκυτταρική πρωτεογλυκάνη, η σεργλίνη, η οποία είναι η μόνη που φέρει αλυσίδα ηπαρίνης (Iozzo and Schaefer, 2015). Επίσης, είναι πακεταρισμένη μέσα σε

κοκκία μαστοκυττάρων και λειτουργεί σαν βιολογική «κόλλα» για την πλειοψηφία των πρωτεασών που βρίσκονται μέσα σε αυτά τα κοκκία (Douaiher et al., 2014). Στην κυτταρική επιφάνεια εντοπίζονται δύο κατηγορίες πρωτεογλυκανών, οι διαμεμβρανικές και οι GPI-anchored. Στις διαμεμβρανικές ανήκουν οι συνδεκάνες 1-4, η NG2, η β-γλυκάνη και η φωσφακάνη, ενώ η μοναδικές GPI-anchored πρωτεογλυκάνες είναι οι γλυπικάνες 1-6. Γύρω από το κύτταρο εντοπίζονται οι πρωτεογλυκάνες βασικής μεμβράνης, οι οποίες είναι η perlecan, η agrin, το κολλαγόνο XVIII και το κολλαγόνο XV. Τέλος, εξωκυτταρικά διαμορφώνονται τρεις υποκατηγορίες, οι υαλεκτάνες/λεκτικάνες, οι μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRPs) και οι spock. Στις υαλεκτάνες-λεκτικάνες ανήκουν οι: αγγρικάνη, βερσικάνη, νευροκάνη και μπρεβικάνη. Η μοναδική υποκατηγορία στις spock είναι τεστικάνες 1-3. Οι SLRPs ταξινομούνται σε 5 τάξεις (Iozzo and Schaefer, 2015) (Πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2

Τάξη I	Ταξη II	Τάξη III	Τάξη IV	Τάξη V
Διγλυκάνη	Ινομοδουλίνη	Epirhycan	Chondreadherin	Podocan
Ντεκορίνη	Λουμικάνη	Opticin	Nyctalopin	Podocan-Like 1
Ασπορίνη	PRELP	Osteoglycin	Tsukushi	
ECM2	Κερατοκάνη			
ECMΧ	Osteoadherin			

2.2 Μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRPs)

2.2.1 Εισαγωγή

Η τάξη των μικρών πλούσιων σε λευκίνη πρωτεογλυκανών (SLRPs) είναι μια οικογένεια ομόλογων πρωτεογλυκανών με μικρό (36 – 42 kDa) πρωτεϊνικό κορμό συγκριτικά με τις μεγαλύτερες πρωτεογλυκάνες του χόνδρου και τις μεσεγχυματικές πρωτεογλυκάνες. Οι SLRPs εκφράζονται στις περισσότερες περιοχές του σκελετού και κατέχουν ειδικούς ρόλους κατά τη διάρκεια όλων των φάσεων του σχηματισμού των οστών. Δρουν και μεταβάλλουν σημαντικές λειτουργίες των κυττάρων όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η εναπόθεση οργανικής εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, η ανακατασκευή και η εναπόθεση ανόργανης ουσίας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω των βασικών σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την οστεογένεση, συμπεριλαμβανομένων των δραστηριοτήτων του αυξητικού παράγοντα του μετασχηματισμού-β (TGF-β), των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών (BMPs), των πρωτεϊνών Wnt και του πυρηνικού παράγοντα NF-κB, που επηρεάζουν τόσο τον αριθμό των διαθέσιμων οστεοβλαστών όσο και την ακόλουθη ανάπτυξη, διαφοροποίηση και λειτουργία τους. Από την άλλη πλευρά, η μείωση των SLRPs συσχετίζεται με εκφυλιστικές ασθένειες, όπως την οστεοπόρωση και τον έκτοπο σχηματισμό των οστών.

2.2.2 Δομή και ταξινόμηση των SLRPs

Οι μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRPs) αρχικά ορίστηκαν ως πρωτεογλυκάνες με σχετικά μικρό πρωτεϊνικό κορμό (36 – 42 kDa) που έχουν

διαδοχικές επαναλήψεις λευκίνης και υφίστανται μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένης της προσθήκης πλευρικών αλυσίδων γλυκοζαμινογλυκανών ποικίλων τύπων (Iozzo and Murdoch 1996, Iozzo 1997). Η κατανομή και η έκφραση τους σε στρατηγικές θέσεις στην εμβρυογένεση και την επιδιόρθωση του ιστού καταδεικνύουν ότι οι λειτουργίες των SLRPs έχουν σημαντικές συνέπειες. Αρχικά, οι SLRPs ταξινομήθηκαν σε τρεις ξεχωριστές τάξεις βάσει της συντήρησης της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων, της οργάνωσης των δισουλφιδικών δεσμών στο N-τελικό άκρο και το C-τελικό άκρο τους, και της γονιδιωματικής οργάνωσής τους (Iozzo 1997, Danielson et al., 1993). Πρόσφατα, η γονιδιακή οικογένεια των SLRPs επεκτάθηκε και περιλαμβάνει 18 γονίδια που ταξινομούνται σε πέντε ξεχωριστές υποοικογένειες (Πίνακας 2.3) (Schaefer and Iozzo 2008, Iozzo et al., 2011), επιπροσθέτως βάσει των πλούσιων σε κυστεΐνη συμπλεγμάτων του N-τελικού άκρου του πρωτεϊνικού πυρήνα και των επαναλήψεων EAR (επαναλήψεις του C-τελικού άκρου ειδικές για τις SLRPs) (McEwan et al., 2006), της οργάνωσης των χρωμοσωμάτων (Schaefer and Iozzo 2008, Iozzo et al., 2011) και της σημαντικής λειτουργικής κοινοτοπίας εν όψει του γεγονότος ότι μερικές SLRPs δεν είναι τυπικές πρωτεογλυκάνες (Schaefer and Iozzo 2008). Επομένως, τα μέλη της τάξεως I, η ντεκορίνη (DCN) και η διγλυκάνη (BGN), περιέχουν πλευρικές αλυσίδες χονδροϊτίνης ή θεικής δερματάνης, σε αντίθεση με την ασπορίνη που περιγράφηκε πιο πρόσφατα (Henry et al., 2001, Kizawa et al., 2005). Από την άλλη πλευρά, όλα τα μέλη της τάξεως II φέρουν αλυσίδες θεικής κερατάνης ή πολυλακτοζαμίνης στις πλούσιες σε λευκίνη επαναλήψεις τους, ενώ τα μέλη της τάξεως III μεταφέρουν θεική κερατάνη (οστεογλυκίνη), χονδροϊτίνη/θεική δερματάνη (επιφυκάνη) ή καθόλου αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών (οπτικήνη) (Schaefer and Iozzo 2008, Sanders et al., 2003). Ωστόσο, τα περισσότερα μέλη των μη κανονιστικών τάξεων IV

και V (Neame et al., 1994, Pusch et al., 2000, Ohta et al., 2006, Shimizu-Hirota et al., 2004) ως μη αναμενόμενο δεν έχουν αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών με εξαίρεση τη χονδροαντχερίνη, που υποκαθίσταται από θειική κερατάνη (Neame et al., 1994). Επομένως, τα μοναδικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνικών τους κορμών και η παρουσία των γλυκοζαμινογλυκανών μαζί με τις ειδικές μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις - αξιοσημείωτες αλλαγές στο βαθμό του επιμερισμού και της θείωσης των γλυκοζαμινογλυκανών - χαρακτηρίζουν αυτήν την τάξη των πρωτεογλυκανών με υψηλή δομική πολυπλοκότητα.

Πίνακας 1.3

Τάξεις των SLRPs: οργάνωση και αλληλεπιδρώσεις πρωτεΐνες.

Τάξεις των SLRPs	Μέλη των τάξεων	Παράμετροι ταξινόμησης	Παράμετροι δέσμησης
I	Διγλυκάνη (BGN) Ντεκορίνη (DCN) Ασπορίνη ECM-2	Τα N-τελικά άκρα έχουν τυπικό σύμπλεγμα κατάλοιπων κυστεΐνης που σχηματίζει δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Η ντεκορίνη και η διγλυκάνη μπορούν να υποκατασταθούν από μία ή δύο πλευρικές αλυσίδες χονδροϊτίνης/θειικής δερματάνης. Η ασπορίνη στερείται του τυπικού διπεπτιδίου Ser-Gly και πλευρικών αμινοξέων που απαιτούνται για την προσθήκη γλυκοζαμινογλυκανών (7, 8). Η ECM2 είναι πολύ μεγαλύτερη και δομικά διαφορετική από τις συμβατικές SLRPs, οι LRRs της είναι κατά 35% ίδιες με τις αντίστοιχες περιοχές της ντεκορίνης και το γονίδιο της ECM2 συνδέεται με φυσικό τρόπο με την ασπορίνη στο χρωμόσωμα 9 (4).	Η διγλυκάνη και η ντεκορίνη δεσμεύουν τον TGF-β μέσω των πρωτεϊνικών τους πυρήνων με τιμές Kd από 1 έως 20 nM για θέση δέσμησης υψηλής συγγένειας και από 50 έως 200 nM για θέση δέσμησης χαμηλότερης συγγένειας (21), τον TNF-α μέσω τόσο του πρωτεϊνικού πυρήνα όσο και των αλυσίδων των γλυκοζαμινογλυκανών με Kds, 0.26 μM και 0.81 μM για τη διγλυκάνη και τη ντεκορίνη αντίστοιχα (26). Η διγλυκάνη δεσμεύει τους BMP-4 (22), TLR-2/4 (33, 34) και BMP2/ALK6 (51). Η ντεκορίνη δεσμεύεται στον PDGF (15), στον υποδοχέα (IGF-I) στα ενδοθηλιακά κύτταρα με συγγένεια σε εύρος νανογραμμομορίων (Kd = 18 nM) που μπορεί να συγκριθεί με τον IGF-I (Kd = 1.2 nM) (27), τον EGFR (28), στον Met (32) και στον TLR2/4 (37). Η ασπορίνη δεσμεύει τον TGF-β1 και αυτή η δέσμηση αναστέλλεται σημαντικά από τη ντεκορίνη, τη διγλυκάνη και την ινομοδουλίνη (8).
II	Ινομοδουλίνη (FMOD) Λουμικάνη (LUM) PRELP Κερατοκάνη (KERA)	Οι SLRPs της τάξεως II περιέχουν συμπλέγματα κατάλοιπων θειικής τυροσίνης στα N-τελικά άκρα τους που θα μπορούσαν να	Η λουμικάνη υποστηρίζεται ότι δεσμεύει τον FasL (38), ρυθμίζει τη σηματοδότηση του TGF-β (40) και αλληλεπιδρά με

	Οστεοαντηρίνη (OSAD)	συνεισφέρουν στην πολυανιονική φύση των SLRPs. Αυτές οι SLRPs περιέχουν πρωταρχικά θειική κερατάνη και πολυλακτοζαμίνη, μια μη θειική μορφή της θειικής κερατάνης, και τα αντίστοιχα γονίδια τους έχουν παρόμοια εξονική οργάνωση (τρία εξόνια) με ένα μεγάλο κεντρικό εξόνιο που κωδικοποιεί τις περισσότερες πλούσιες σε λευκίνη επαναλήψεις (LRRs) (4).	τον πυρηνικό παράγοντα κB του p65 (NF-κB) (65).
III	Επιφυκάνη (EPYC) Οπτική (OPTC) Οστεογλυκίνη (OGN)	Τα τρία μέλη αυτής της τάξεως χαρακτηρίζονται από έναν σχετικά μικρό αριθμό LRRs (επτά LRRs) και γονιδιωματική οργάνωση που αποτελείται από επτά εξόνια. Αν και οι περισσότερες SLRPs έχουν αλληλουχία για την προσθήκη γλυκοζαμινογλυκανών, ορισμένες υπάρχουν ως γλυκοπρωτεΐνες στους ιστούς (4, 9).	Η οπτική δεσμεύει την αυξητική ορμόνη (9).
IV	Χονδροαντηρίνη (CHAD) Νυκταλοπίνη (NYC) Tsukushi (TSKU)	Η τάξη IV, μια μη κανονιστική τάξη των SLRPs, υποστηρίζεται ότι αποτελείται από χονδροαντηρίνη και νυκταλοπίνη (10, 11) και ένα νέο μέλος που ονομάζεται Tsukushi (12). Η νυκταλοπίνη είναι πολύ ενδιαφέρουσα επειδή αποτελεί το πρώτο μέλος στερεωμένο σε γλυκοσουλφωσφατιδιλινοσιτόλη που περιγράφεται και το δεύτερο που συνδέεται στο χρωμόσωμα X (11). Ο Tsukushi έχει αντίστοιχες λειτουργικές ιδιότητες με τις SLRPs της τάξεως I (12).	Ο Tsukushi είναι αναστολέας των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών και σχηματίζει τριμερές σύμπλεγμα με μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών και χορδίνη (12).
V	Ποδοκάνη (PODN) Πρωτεΐνη 1 τύπου ποδοκάνης (PODN-1)	Η τάξη V, μια νέα μη κανονιστική τάξη των SLRPs, υποστηρίζεται ότι περιέχει δύο γονίδια, την ποδοκάνη που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 και μια ιδιαίτερα ομόλογη πρωτεΐνη 1 τύπου ποδοκάνης (NCB1 αριθμός εισαγωγής 079101) που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19. Αν και αυτές οι πρωτεΐνες έχουν διαφορετικό σύμπλεγμα πλούσιο σε κυστεΐνη του N-τελικού άκρου, έχουν 20 LRRs με ομολογία στα μόρια των τάξεων I και II. Επιπλέον, η ποδοκάνη δεσμεύει το κολλαγόνο I και εμποδίζει την κυτταρική ανάπτυξη μέσω επαγωγής της p21, και άλλα μέλη των SLRPs έχουν αυτές τις δύο λειτουργικές ιδιότητες (13).	Η ποδοκάνη δεσμεύει το κολλαγόνο και αυξάνει την έκφραση της p21 (13).

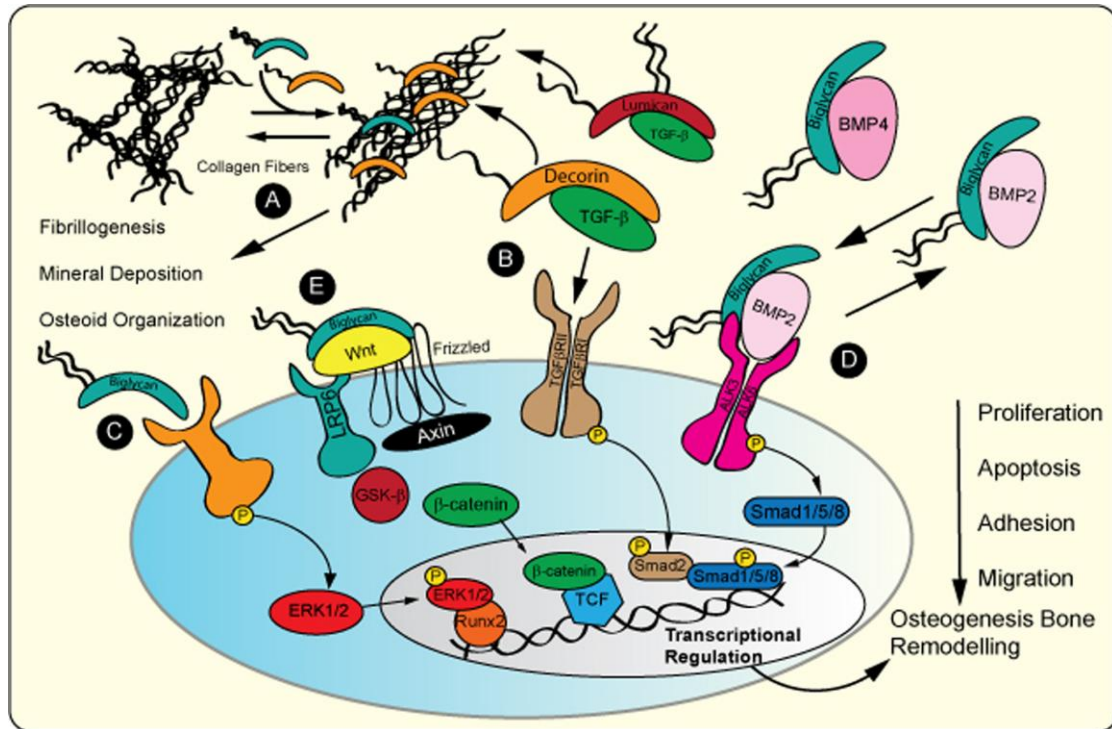
2.2.3 Λειτουργικό δίκτυο των SLRPs

Μετά τη σύνθεση οι περισσότερες SLRPs εκκρίνονται στην ECM, όπου είτε διασκορπίζονται και δεσμεύονται στα συστατικά της π.χ. κολλαγόνα, ή παραμένουν ελεύθερες. Η συγκέντρωση των SLRPs στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία φαίνεται ότι είναι αυστηρά προκαθορισμένη με συγκεκριμένες SLRPs να κατανέμονται κυρίως στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του συνδετικού ιστού (δηλαδή ακόμα περισσότερο απομακρυσμένες από το κύτταρο), ενώ άλλες συγκεντρώνονται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία που περιβάλλει άμεσα τα κύτταρα (Henry et al., 2001, Schaefer and Schaefer 2010, Gruber et al., 2002). Επιπλέον, η συγκέντρωση των SLRPs σε συγκεκριμένες περιοχές του κυττάρου εξαρτάται από τον ιστό προέλευσης (Egglı et al., 1985, Vanderploeg et al., 2012). Οι SLRPs της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του συνδετικού ιστού δεσμεύονται σε ποικίλους τύπους κολλαγόνων και έτσι ρυθμίζουν την κινητική, τη συγκέντρωση και την ιδιαίτερη οργάνωση των ινιδίων του δέρματος, των τενόντων, των οστών και του κερατοειδούς χιτώνα (Εικόνα 1.12A) (Iozzo 1997, Reed and Iozzo 2002, Zhang et al., 2006, Chakravarti et al., 2006).

Ωστόσο, πέρα από το γεγονός ότι είναι απομακρυσμένες κυρίως στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, οι SLRPs της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του συνδετικού ιστού υπάρχουν επίσης και ως διαλυτά μόρια, π.χ. όταν απελευθερώνονται από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία με πρωτεολυτική πέψη των ιστών που έχουν υποστεί βλάβη. Τόσο οι δεσμευμένες όσο και οι διαλυτές SLRPs αλληλεπιδρούν με ποικίλους αυξητικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του TGF- β (Εικόνα 1.12B) (Hildebrand et al., 1994), της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών BMP4 (Chen et al., 2004), της πρωτεΐνης WISP-1 (Wnt1-προκλητά εκκρινόμενη πρωτεΐνη-1) (Desnoyers et al., 2001), του παράγοντα von Willebrand (Guidetti et al., 2004), του

αυξητικού παράγοντα αιμοπεταλίων PDGF (Nili et al., 2003), του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF-α (Tufvesson and Thorsson 2002) και του αυξητικού παράγοντα Ι τύπου ινσουλίνης (IGF-I) (Schonherr et al., 2005).

Εικόνα 1.12



Εικόνα 1.12: Σχηματική αναπαράσταση των ρόλων των SLRPs και τα ειδικά σηματοδοτικά μονοπάτια τους στην οστεογένεση και την ανακατασκευή. A. Οι SLRPs έχουν ειδικούς ρόλους σε όλες τις φάσεις του σχηματισμού των οστών, συμπεριλαμβανομένων των περιόδων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την εναπόθεση της οργανικής θεμέλιας ουσίας, την ανακατασκευή και την εναπόθεση ανόργανης ουσίας. B. Η δέσμευση του TGF-β στις SLRPs (τη ντεκορίνη και τη λουμικάνη) ρυθμίζει τη σηματοδότηση καθοδικής ροής των Smad2/3 διευκολύνοντας ή εμποδίζοντας την παρουσίαση του προσδέτη στους αντίστοιχους υποδοχείς, ώστε να ελέγχεται ο σχηματισμός των οστών. C. Η διγλυκάνη διεγείρει τη φωσφορλίωση της ρυθμιζόμενης από εξωκυττάριο σήμα κινάσης ERK και τη μεταγωγή του σήματος μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Runx2, ώστε να προωθήσει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. D. Η διγλυκάνη διατηρεί τη δέσμευση του BMP2/ALK6 για να βελτιώσει τη φωσφορλίωση των Smad1/5/8, ώστε να διευκολύνει τη σηματοδότηση καθοδικής ροής που σχετίζεται με την οστεογένεση. E. Η διγλυκάνη προωθεί τη δέσμευση του Wnt3a στην υπομονάδα του συνυποδοχέα LRP6 (που χρησιμοποιεί τον υποδοχέα των πρωτεϊνών με ελικοειδή μορφή

(*Frizzled*) για ολοκληρωμένη σηματοδότηση μέσω των *Wnt*) κι έτσι ενεργοποιεί τη σηματοδότηση της β-κατενίνης, ώστε να προωθήσει την ανάπτυξη των οστών. TCF, παράγοντας T κυττάρων.

Αυτή η βιολογική αλληλεπίδραση ρυθμίζει τη βιοδιαθεσιμότητα των αυξητικών παραγόντων μέσω του σχηματισμού ειδικών βαθμίδων συγκέντρωσης. Από την άλλη πλευρά, η περικυτταρική συγκέντρωση των SLRPs επιτρέπει σε αυτά τα μόρια να αλληλεπιδρούν με διαφορετικούς προσδέτες και υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, και έτσι ρυθμίζουν μια ευρεία ποικιλία αλληλεπιδράσεων της κυτταρικής θεμέλιας ουσίας (Schaefer and Iozzo 2008). Η περικυτταρική ντεκορίνη δεσμεύει τον υποδοχέα EGF και τον ErbB4 στα κύτταρα των όγκων, οδηγώντας σε προσωρινή ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK, σε κινητοποίηση των επιπέδων του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} και σε ενεργοποίηση του αναστολέα της κυκλικο-εξαρτώμενης κινάσης p21^{WAF1} (De Luca et al., 1996) με ακόλουθη αρνητική ρύθμιση του υποδοχέα (Csordas et al., 2000, Santra et al., 1997, Moscatello et al., 1998). Επιπλέον, η ντεκορίνη δεσμεύεται απευθείας στον Met, τον υποδοχέα του ηπατοκυτταρικού αυξητικού παράγοντα (Goldoni et al., 2009), που είναι αξιοσημείωτος, καθώς η σηματοδότηση μέσω του Met οδηγεί στη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης, ενός γνωστού μεσολαβητή του εξαιρετικά σημαντικού σηματοδοτικού μονοπατιού των Wnt που ρυθμίζει θετικά την κινητικότητα των κυττάρων των όγκων, την εισβολή στους ιστούς και τη μετάσταση.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η σηματοδότηση της ντεκορίνης μέσω του υποδοχέα του IGF-I ασκεί αντιαποπτωτική επίδραση ευνοώντας με αυτόν τον τρόπο τη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη. Με τη δέσμευση στον υποδοχέα του IGF-I, η ντεκορίνη πυροδοτεί τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της κατάντι

σηματοδότησης της κινάσης PI3K (phosphoinositide 3-kinase), της πρωτεϊνικής κινάσης B (Akt) και της p21^{WAF1} επιφέροντας αντιαποπτωτικό αποτέλεσμα (Schonherr et al., 2005). Μια άλλη SLRP της τάξεως I, η διγλυκάνη, δρα ως σηματοδοτικό μόριο που είναι σημαντικό για το φυσικό ανοσοποιητικό σύστημα. Σε καταπόνηση ή τραυματισμό των ιστών, η απομακρυσμένη και ανοσοποιητικά αδρανής διγλυκάνη απελευθερώνεται από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία μέσω ενός απροσδιόριστου μέχρι στιγμής πρωτεολυτικού μηχανισμού. Η διαλυτή διγλυκάνη αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς τύπου Toll της φυσικής ανοσίας TLR-2 και TLR-4 στα μακροφάγα κύτταρα, αναλαμβάνοντας τον ρόλο ενδογενούς προσδέτη και συνεπώς πυροδοτώντας μια φλεγμονώδη αντίδραση (Schaefer et al., 2005, Babelova et al., 2009). Αυτός ο ρόλος θα μπορούσε να είναι σχετικός και στη βιολογία των όγκων, καθώς η σηματοδότηση του ενεργού υποδοχέα τύπου Toll σε κύτταρα όγκων φάνηκε ότι επηρεάζει τις λειτουργίες των επιμολυσμένων κυττάρων (Huang et al., 2008, Parkinson 2008). Μια βιβλιογραφική αναφορά (Merline et al., 2011) έδειξε ότι και η ντεκορίνη δεσμεύεται στον TLR-2/4, και έτσι προκαλεί την εκκίνηση του φλεγμονώδη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 4 (PDCD4) στα μακροφάγα κύτταρα. Επιπλέον, η ντεκορίνη αποτρέπει τη μεταφραστική καταστολή του PDCD4 μέσω της πρόκλησης του microRNA-21, ενός καταστολέα του PDCD4. Επομένως, η ντεκορίνη μπορεί να προωθήσει τη φλεγμονώδη δραστηριότητα και παράλληλα να επιβραδύνει την ανάπτυξη των όγκων μέσω της πρόκλησης του PDCD4 και του microRNA-21.

Έχουν επίσης αναγνωριστεί επιπρόσθετα σηματοδοτικά μονοπάτια για την SLRP της τάξεως II, τη λουμικάνη (LUM). Η σηματοδότηση του προσδέτη Fas-FasL, ενός βασικού κυτταρικού μονοπατιού, βρέθηκε ότι διακόπτεται στα κερατοκύτταρα του στρωματικού κερατοειδούς χιτώνα της λουμικάνης LUM^{-/-} (Vij et al., 2004).

Συνεπώς, έχει προταθεί ότι θα μπορούσε η λουμικήνη να δεσμεύσει απευθείας τον προσδέτη FasL, διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο την πρόκληση του Fas. Ανεπαρκής σηματοδότηση μέσω του προσδέτη Fas-FasL σε ποντίκια με $LUM^{-/-}$ οδηγεί τελικά σε μειωμένη απόπτωση των στρωματικών κυττάρων, εξασθενημένη πρόκληση των φλεγμονωδών κυτοκινών, εξασθενημένη επιστράτευση των φλεγμονωδών κυττάρων και καθυστερημένη επούλωση του κερατοειδούς χιτώνα. Η λουμικήνη φαίνεται ότι ελέγχει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών μέσω της ρύθμισης ειδικών μεσολαβητών της κυτταρικής ανάπτυξης. Επομένως, οι ινοβλάστες της $LUM^{-/-}$ έχουν μειωμένη $p21^{WAF1}$, έναν κύριο αναστολέα των κυκλικο-εξαρτώμενων κινασών, και μια επακόλουθη αύξηση σε κυκλίνες A, D_1 και E. Επιπλέον, ο καταστολέας όγκων p53, ένας ρυθμιστής ανοδικής ροής της $p21^{WAF1}$, είναι αρνητικά ρυθμισμένος στις ινοβλάστες της $LUM^{-/-}$, καταδεικνύοντας τη ρύθμιση της $p21^{WAF1}$ από τη λουμικήνη με τρόπο εξαρτώμενο από την πρωτεΐνη p53 (Vij et al., 2004). Βρέθηκε ότι η υπερέκφραση της λουμικήςνης καταστέλλει την ογκογόνο μεταμόρφωση των ινοβλαστών των αρουραίων που προκαλείται από τα v-src και v-K-ras (39), καταδεικνύοντας ότι η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης της λουμικήςνης ενδεχομένως παίζει ρόλο στην ανάπτυξη ορισμένων μορφών καρκίνου σε ανθρώπους. Σε μια μελέτη από τους Nikitovic et al. (Nikitovic et al., 2008) βρέθηκε ότι η λουμικήνη ρυθμίζει το εξαιρετικά σημαντικό σηματοδοτικό μονοπάτι της πρωτεΐνης Smad στα κύτταρα των όγκων των οστών.

Δεδομένου του γεγονότος ότι η παραγωγή, η ανανέωση και η τελική συγκέντρωση των SLRPs είναι δυναμικές διαδικασίες, η ευμετάβλητη διαθεσιμότητα των SLRPs σε διαφορετικούς χώρους θα διευκόλυνε τα σηματοδοτικά μονοπάτια να ρυθμίσουν ειδικές βιολογικές και παθολογικές διαδικασίες (Merline et al., 2009). Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί που ρυθμίζουν την ισορροπία ανάμεσα στις

ελεύθερες και τις δεσμευμένες SLRPs πρέπει σαφώς να μελετηθούν περισσότερο. Θα πρέπει να δοθούν απαντήσεις σε σημαντικές ερωτήσεις, όπως με ποιον τρόπο οι αλλαγές στη σύνθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας εκτρέπουν περισσότερες δεσμευμένες SLRPs στην ελεύθερη δεξαμενή και σε ποιο βαθμό η απελευθέρωσή τους εξαρτάται από την αποδόμηση της διατηρημένης εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Επιπλέον, πρέπει να ληφθούν υπόψη και οι δραστηριότητες των επεξεργασμένων θραυσμάτων των SLRPs σε σχέση με τις πρόδρομες πρωτεΐνες, που είναι ιδιαίτερα σχετικές σε παθολογικές συνθήκες. Πράγματι, συμβαίνει σημαντική πρωτεόλυση στους πρωτεϊνικούς κορμούς των SLRPs τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε ιστούς αρθρώσεων, με ειδικούς καταβολίτες διγλυκάνης και ινομοδουλίνης που αναγνωρίζεται μόνο σε χόνδρο κατεστραμμένων αρθρώσεων (Young et al., 2005).

Τα συγκεντρωτικά ευρήματα που συνοψίστηκαν παραπάνω δείχνουν με σαφήνεια ότι πολυάριθμα μονοπάτια μπορούν να επηρεαστούν από τις SLRPs. Προς το παρόν δεν είναι απόλυτα σαφές αν τα ίδια μονοπάτια είναι λειτουργικά στη βιολογία των οστών και των μυοσκελετικών ιστών. Ωστόσο, αυτές οι έρευνες παρέχουν μια θεμελιώδη πλατφόρμα για την ανάπτυξη και την εμβάθυνση της κατανόησής μας σχετικά με τη λειτουργία των SLRPs στα οστά (Εικόνα 1.12B).

2.2.4 Βασικοί ρόλοι των SLRPs στη φυσιολογία των οστών

Έχει πλέον καθιερωθεί ακλόνητα ότι ειδικές SLRPs εμπλέκονται λειτουργικά στη φυσιολογική ανάπτυξη των οστών και την ομοίωση. Χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό επιτόπιου υβριδισμού και ανοσοϊστοχημείας, οι SLRPs της τάξεως I (η διγλυκάνη και η ντεκορίνη) έχουν συγκεντρωθεί σε πολλές περιοχές του σκελετού, συμπεριλαμβανομένου του αρθρικού χόνδρου και του χόνδρου της επίφυσης, των

αγγειακών καναλιών, των υποχόνδριων περιοχών και του περιόστεου (Bianco et al., 1990). Οι SLRPs έχουν ειδικούς ρόλους σε όλες τις φάσεις του σχηματισμού των οστών, συμπεριλαμβανομένων των περιόδων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την εναπόθεση οργανικής θεμέλιας ουσίας, την ανακατασκευή και την εναπόθεση ανόργανης ουσίας (Waddington et al., 2003, Parisuthiman et al., 2005). Η γενιά των μεταλλαγμένων ποντικών με στοχευμένη διαγραφή της διγλυκάνης έδειξε ότι τα ποντίκια με έλλειψη διγλυκάνης είναι βιώσιμα και δεν έχουν εκτεταμένες ανωμαλίες στη σκελετική διάταξη κατά τη γέννησή τους. Ωστόσο, με το πέρασμα του χρόνου, τα μακρά οστά τους εμφανίζουν μειωμένο μήκος σε συνδυασμό με μειωμένη οστική πυκνότητα και μάζα συγκριτικά με τα ποντίκια αντίστοιχης ηλικίας της ομάδας ελέγχου (Xu et al., 1998). Η έλλειψη διγλυκάνης οδηγεί σε δομικές ανωμαλίες στα ινίδια κολλαγόνου στα οστά, τη δερμίδα και τους τένοντες και σε έναν υποκλινικό δερματικό φαινότυπο με λέπτυνση της δερμίδας, αλλά χωρίς εμφανή ευθραυστότητα του δέρματος (Corsi et al., 2002). Επιπλέον, τα αρσενικά ποντίκια που είχαν μειωμένη διγλυκάνη (το γονίδιο της διγλυκάνης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X, και επομένως τα αρσενικά ποντίκια δεν περιέχουν δεύτερο αλληλόμορφο της διγλυκάνης), προσδιορισμένη ως $BGN^{-0, +/0}$, εμφανίζουν μειωμένο σχηματισμό των οστών συγκριτικά με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου, καταδεικνύοντας ότι η διγλυκάνη είναι σημαντική για τα κύτταρα που ελέγχουν την παραγωγή των οστών (Corsi et al., 2002).

Διγλυκάνη

Η διγλυκάνη (BGN) αποτελεί μέλος της κατηγορίας I των SLRP οι οποίες περιέχουν δύο αλυσίδες θειικής χονδροϊτίνης ή θειικής δερματάνης συνδεδεμένες ομοιοπολικά στο N-άκρο (Mac Ewan et al., 2006). Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει τον ρόλο της διγλυκάνης στην βιολογία του καρκίνου και ειδικότερα στην ρύθμιση του

πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της μετανάστευσης, της κινητικότητας και στην δημιουργία φλεγμονής (Neill et al., 2015, Schaefer et al., 2017). Ο βασικός ρόλος της διγλυκάνης στην ανάπτυξη των οστών επιβεβαιώνεται από παρατηρήσεις του μυελού των οστών σε ποντίκια με μηδενική διγλυκάνη όπου διαπιστώνεται καθυστερημένη οστεογένεση (Chen et al., 2003). Συγκεκριμένα, τα ποντίκια με έλλειψη διγλυκάνης αναπτύσσουν ηλικιακά εξαρτώμενη οστεοπενία και έχουν πολλαπλά μεταβολικά μειονεκτήματα στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών τους, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης απόπτωσης, του μειωμένου αριθμού μονάδων σχηματισμού αποικιών και της μειωμένης παραγωγής κολλαγόνου (Chen et al., 2003). Επομένως, η στρατηγική της χρήσης ποντικίων με έλλειψη μίας ή περισσότερων SLRPs επιτρέπει την αναγνώριση πρώιμων μοριακών γεγονότων που προκαλούν σκελετικές ανωμαλίες που εξαρτώνται από τη λειτουργία των SLRPs.

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το γονίδιο της διγλυκάνης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X, οι ασθενείς με το σύνδρομο Turner (45 χρωμοσώματα, X0) έχουν μειωμένη έκφραση διγλυκάνης και εμφανίζουν χαμηλό ανάστημα, στειρότητα και πρώιμη οστεοπόρωση. Αντιθέτως, οι ασθενείς με υπεράριθμα φυλετικά χρωμοσώματα (π.χ. με το σύνδρομο Klinefelter) εμφανίζουν αυξημένη έκφραση διγλυκάνης και μακρύτερα άκρα (Geerkens et al., 1995). Επομένως, ο οστέινος μεταβολισμός σε ποντίκια με έλλειψη διγλυκάνης θα μπορούσε να εξαρτάται από το φύλο. Πράγματι, σε αντίθεση με τα αρσενικά ποντίκια, ο ιστός των οστών των θηλυκών ποντικίων επηρεάζεται λιγότερο, καταδεικνύοντας διαφορά μεταξύ των φύλων στη λειτουργία της διγλυκάνης στον σκελετό.

Η διγλυκάνη μπορεί επίσης να ελέγχει τα βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν το οστεογενετικό πρόγραμμα, συμπεριλαμβανομένης της δραστηριότητας των πολυλειτουργικών κυτοκινών TGF- β (Bi et al., 2005), της BMP4

(Chen et al., 2004, Young et al., 2002) και των Wnt (Berednesen et al., 2011) (Εικόνα 1.12C-E). Ως εκ τούτου, η διγλυκάνη μπορεί να επηρεάσει τον αριθμό των διαθέσιμων οστεογενετικών προδρόμων, όπως επίσης και της ακόλουθης ανάπτυξης, διαφοροποίησης και λειτουργίας τους στον σχηματισμό των οστών.

Η φαινοτυπική ανάλυση των ποντικών με διπλά μηδενική $DCN^{-/-}/BGN^{-/-}$ αποκαλύπτει ότι ο παθολογικός φαινότυπος των οστών είναι πιο σοβαρός και γίνεται εμφανής νωρίτερα συγκριτικά με τα ποντίκια με έλλειψη διγλυκάνης. Πέρα από τη συνολική φαινοτυπική εμφάνιση του σκελετού, η διπλή έλλειψη διγλυκάνης και ντεκορίνης έχει ως αποτέλεσμα μια εντυπωσιακή αλλαγή στο σχήμα και την οργάνωση των ινιδίων του κολλαγόνου σε μεγαλύτερο βαθμό από την αθροιστική επίδραση. Επομένως, η επίδραση της έλλειψης ντεκορίνης/διγλυκάνης στα οστά είναι πιθανώς συνεργιστική, αν και η έλλειψη ντεκορίνης δεν φαίνεται να επηρεάζει τον φαινότυπο του οστού από μόνη της (Corosci et al., 2002). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από την πρόταση ότι η απουσία διγλυκάνης και ντεκορίνης αποτρέπει τον αυξητικό παράγοντα TGF- β από την κατάλληλη απομάκρυνση μέσα στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Πρώτα, η ντεκορίνη και ακολούθως η διγλυκάνη, η ασπορίνη και η ινομοδουλίνη βρέθηκαν ότι δεσμεύουν τον TGF- β (Hildebrand et al., 1994, Kresse and Schonherr 2001) σχηματίζοντας συμπλέγματα SLRP·TGF- β που είτε εξαλείφονται από τον ιστό (μέσω της κυκλοφορίας ή της απέκκρισης μέσω των ούρων) είτε είναι απομακρυσμένα στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία με την παρουσία του κολλαγόνου I, και κατά συνέπεια ρυθμίζουν αρνητικά τη σηματοδότηση του TGF- β (Abdel-Wahab et al., 2002, Schaefer et al., 2001, Schonherr et al., 1998). Ωστόσο, η αλληλεπίδραση των SLRPs με τον TGF- β θα μπορούσε επίσης να βελτιώσει τη βιοδραστικότητα του TGF- β , όπως φαίνεται στην περίπτωση της ντεκορίνης στη διαδικασία του σχηματισμού των οστών κατά τη διάρκεια της

ανακατασκευής (Takeuchi et al., 1994) ή του σχηματισμού των μυών (Riquelme et al., 2001). Επομένως, η άμεση δέσμευση του πλεονάζοντα TGF- β στους υποδοχείς του στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών θα μπορούσε να προκαλέσει αλλαγή πορείας από την ανάπτυξη στην απόπτωση και επομένως να οδηγήσει τελικά σε μειωμένο αριθμό οστεοπρογονικών κυττάρων και ακόλουθο μειωμένο σχηματισμό των οστών (Bi et al., 2005). Επιπλέον, η διγλυκάνη προωθεί τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών μέσω της φωσφορυλίωσης της ρυθμιζόμενης από εξωκυττάριο σήμα κινάσης (ERK) και της μεταγωγής του σήματος μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Runx2 (Εικόνα 1.12C) (Wang et al., 2010). Εναλλακτικά, ο πρωτεϊνικός πυρήνας της διγλυκάνης μπορεί να δεσμευτεί στον BMP2 και τους BMP2·ALK6 (κινάση 6 τύπου υποδοχέα ακτιβίνης), και έτσι διατηρεί τη δέσμευση του BMP2·ALK6 (Εικόνα 1.12D). Το σύμπλεγμα BMP2·διγλυκάνη·ALK6 μπορεί να επιτύχει τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Smad1/5/8 και επομένως να διευκολύνει τη σηματοδότηση καθοδικής ροής τους που σχετίζεται με την οστεογένεση (Mochida et al., 2006). Πρόσφατα προτάθηκε ότι η διγλυκάνη υποστηρίζει τη σηματοδότηση των πρωτεϊνών Wnt σε ζώντα οργανισμό με ευεργετικό τρόπο για τον σχηματισμό των οστών (Berendsen et al., 2011). Σε αυτήν την τελευταία μελέτη, η διγλυκάνη προώθησε τη δέσμευση της πρωτεΐνης Wnt3a στη θεμέλια ουσία των οστών μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης που περιλάμβανε περαιτέρω επαφή με έναν βασικό συνυποδοχέα των πρωτεϊνών Wnt στα οστά, τον LRP6 (πρωτεΐνη 6 σχετιζόμενη με τον υποδοχέα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας) (Εικόνα 1.12E).

Λουμικάνη

Η λουμικάνη είναι μια σημαντική πρωτεογλυκάνη της θεμέλιας ουσίας των οστών. Εκκρίνεται τόσο από διαφοροποιημένους όσο και από ώριμους οστεοβλάστες, αλλά όχι από πρόδρομες μορφές οστεοβλαστών, και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί

ως δείκτης διάκρισης αν ένα κύτταρο είναι πρόδρομο ή διαφοροποιημένος οστεοβλάστης (Raouf et al., 2002). Η έκφραση της κερατοκάνης (KERA) συσχετίζεται με έναν πιο διαφοροποιημένο φαινότυπο οστεοβλαστών, ενώ η ιστομορφομετρική ανάλυση καταδεικνύει ότι τα ποντίκια με KERA^{-/-} έχουν σημαντικά μειωμένους ρυθμούς σχηματισμού των οστών και απόθεσης ανόργανης ουσίας (Igwe et al., 2011). Τα αρσενικά ποντίκια με έλλειψη επιφυκάνης (Dspg3) επίσης έχουν σημαντικά κοντύτερα μηριαία οστά από τα ποντίκια ελέγχου στους 9 μήνες. Οι αρθρώσεις των γονάτων σε ποντίκια με διπλά μηδενική Dspg3/διγλυκάνη εμφανίζουν αυξημένη έκφραση πρωτεΐνης θεμέλιας ουσίας συγκριτικά με τα ποντίκια ελέγχου. Αυτή η βελτιωμένη έκφραση περιλαμβάνει επίσης άλλα μέλη των SLRPs, όπως την ασπορίνη, την ινομοδουλίνη και τη λουμικάνη, επιδεικνύοντας αντισταθμιστικούς μηχανισμούς μεταξύ των διαφορετικών μελών της οικογένειας των SLRPs (Nuka et al., 2010). Η σημασία των SLRPs στην ομοιόσταση των οστών αναδεικνύεται με το εύρημα ότι το κάθε μέλος από αυτές εμφανίζει αλλαγές που αντανακλούν την αλλαγμένη ομοιόσταση του γηράσκοντος σκελετού (Singh et al., 2009). Άλλο παράδειγμα της σημασίας των SLRPs στη βιολογία των οστών είναι το γεγονός ότι η πλούσια σε λευκίνη επαναλαμβανόμενη δομή επηρεάζει αρνητικά την οστεοκλαστογένεση εμποδίζοντας πιθανώς τη δραστηριότητα του NF-κB (Rucci et al., 2009).

2.2.5 Ρόλοι στις εκφυλιστικές νόσους των οστών

Η βιολογία των SLRPs είναι επίσης στενά συνδεδεμένη με εκφυλιστικές διαδικασίες στον σκελετό. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η στοχευμένη διαταραχή του γονιδίου της διγλυκάνης οδηγεί σε φαινότυπο τύπου οστεοπόρωσης στα ποντίκια (Xu

et al., 1998). Ακολούθως, προτάθηκε ότι οι τροποποιημένοι φαινότυποι κολλαγόνου σε ποντίκια με έλλειψη μίας ή περισσότερων SLRPs εμφανίζουν μια συνεργατική, αλληλοδιάδοχη, χρονικά οργανωμένη δράση των SLRPs που συνολικά διαμορφώνουν την αρχιτεκτονική και τις μηχανικές ιδιότητες της θεμέλιας ουσίας του κολλαγόνου (Ameys and Young 2002). Η ανάπτυξη της οστεοπόρωσης μεταξύ άλλων νόσων σε ποντίκια με έλλειψη σε SLRPs καταδεικνύει ότι οι μεταλλάξεις στις SLRPs ενδεχομένως να αποτελούν τμήμα μη διαγνωσμένων προδιαθεσικών γενετικών παραγόντων ειδικών για τη νόσο (Ameys and Young 2002). Από την άλλη πλευρά, βρέθηκε ότι η έλλειψη διγλυκάνης προστατεύει από την αυξημένη ανακατασκευή του δοκιδώδους οστού και την οστική απώλεια ως απάντηση στην μείωση των οιστρογόνων, υποστηρίζοντας την άποψη ότι η διγλυκάνη μπορεί να ρυθμίζει τόσο τον σχηματισμό όσο και την επαναρρόφηση των οστών επηρεάζοντας τελικά τη διαδικασία της οστικής ανακατασκευής (Nielsen et al., 2003).

Πέρα από τη φυσιολογική οστική ανακατασκευή, οι SLRPs φαίνεται ότι συνεισφέρουν στην έκτοπη οστεοποίηση (Kilts et al., 2009) των μαλακών ιστών. Αν και τα ποντίκια με μεμονωμένη έλλειψη τόσο διγλυκάνης όσο και ινομοδουλίνης αναπτύσσουν έκτοπα οστά σε τένοντες, το αποτέλεσμα αυτό μεγεθύνεται όταν οι δύο SLRPs καταστέλονται ταυτόχρονα, και κατά συνέπεια καταδεικνύουν συνεργιστική δράση αυτών των δύο SLRPs στη συγκεκριμένη λειτουργία (Ameys et al., 2002). Πρόσφατα, τα πειράματα οστεόλυσης σε ζώντα οργανισμό έδειξαν ότι η επαγόμενη από λιποπολυσακχαρίτες οστεόλυση συνέβη γρηγορότερα και πιο εκτεταμένα σε ποντίκια με έλλειψη διγλυκάνης συγκριτικά με τα ποντίκια ελέγχου λόγω της αυξημένης διαφοροποίησης των οστεοκλαστών και της δευτερεύουσας δραστηριότητας συγκριτικά με τους τροποποιημένους οστεοβλάστες (Bi et al., 2006). Επιπλέον, η απορρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης της θεμέλιας ουσίας,

συμπεριλαμβανομένης της διγλυκάνης, φάνηκε σε ποντίκια με υποφωσφαταιμία και οστεομαλάκυνση (Miao et al., 2001). Αναλογιζόμενοι ότι η μείωση των SLRPs επιδεινώνει τις εκφυλιστικές νόσους, όπως την οστεοπόρωση, την οστεοαρθρίτιδα και τον έκτοπο σχηματισμό των οστών και λαμβάνοντας υπόψη έναν συνεχή γηράσκοντα πληθυσμό με άφθονα σκελετικά προβλήματα η αξιοποίηση των SLRPs μπορεί να αποτελέσει τη βάση μιας καινοτόμου θεραπείας.

2.2.6 Ρόλοι στην εξέλιξη των όγκων των οστών

Οι κακοήθεις όγκοι των οστών χαρακτηρίζονται από την παρουσία αδιαφοροποίητων οστεοπρογονικών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται και αναπτύσσουν μια μάζα ιστού όγκων που αναγνωρίζεται ως οστεοσάρκωμα. Είναι γνωστό ότι η έκφραση και η επακόλουθη λειτουργία των SLRPs σε πρωτοπαθείς όγκους των οστών διαφέρουν συγκριτικά με τον ιστό που δεν νοσεί. Η απουσία έκφρασης διγλυκάνης που παρατηρήθηκε σε βιοψίες οστεοσαρκώματος όπως και σε ορισμένες κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος οδηγεί σε τροποποίηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσία και ως εκ τούτου σε λιγότερο ασβεστοποιημένο οστεοειδές του οστεοσαρκώματος (Benayahu et al., 2001). Ο έλεγχος των ομάδων των γονιδίων που ρυθμίζουν τη συμπεριφορά των προ-οστεοβλαστών με μηδενική διγλυκάνη χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων αποκάλυψαν ότι η έλλειψη διγλυκάνης επηρεάζει τα γονίδια που ελέγχουν τη φλεγμονή, την ανοσολογική απάντηση και την ανάπτυξη των κυττάρων των όγκων (Chen et al., 2005). Πράγματι, η διγλυκάνη επηρεάζει τη συμπεριφορά των κυττάρων των όγκων των οστεοβλαστών, καθώς πρόσφατα προτάθηκε ότι τα κύτταρα του οστεοσαρκώματος αξιοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα Runx2 και τον άξονα FGF-2/συνδεκάνη/πρωτεογλυκάνη θεικής ηπαράνης, έναν βασικό μεσολαβητή του οστεογενετικού προγράμματος, ώστε

να ρυθμίσουν τη μετανάστευσή τους με τρόπο εξαρτώμενο από την έκφραση της διγλυκάνης (Datsis et al., 2011). Επιπλέον, οι δείκτες του οστεοσαρκώματος που παρουσιάζουν μικρή απάντηση στη θεραπεία (η απάντηση βαθμού I/II στην κλίμακα Huvos προσδιορίζει όγκους με μικρή ή καθόλου απάντηση στη χημειοθεραπεία) είναι κυρίως προϊόντα γονιδίων που συμμετέχουν στη μικροπεριβαλλοντική ανακατασκευή και διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, συμπεριλαμβανομένης της διγλυκάνης (Mintz et al., 2005). Από την άλλη πλευρά, η γονιδιακή ανάλυση έδειξε ότι η διγλυκάνη έχει τη μεγαλύτερη έκφραση (από 137 γονίδια) σε μεγάλους κυτταρικούς όγκους των οστών (Strauss et al., 2004). Επιπλέον, μια ομάδα χονδροσαρκωμάτων, που έχουν καθιερωθεί επιδημιολογικά ως το δεύτερο συχνότερο πρωτοπαθές κακόηθες νεόπλασμα του σκελετού σε ενήλικες (Huvos 1991), βρέθηκε ότι η διγλυκάνη ρυθμίζει θετικά τα επίπεδα μεταγραφής της ντεκορίνης (Soderstrom et al., 2002), ενώ κυτταρική σειρά ανθρώπινου χονδροσαρκώματος βρέθηκε ότι εκφράζει μεγαλύτερα ποσά διγλυκάνης και καθόλου ντεκορίνη (Chansky et al., 1998).

Η ντεκορίνη είχε κατά πολύ μειωμένη έκφραση στους ασθενείς με οστεοβλαστικό οστεοσάρκωμα συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς οστεοβλαστικό οστεοσάρκωμα, γεγονός που θα μπορούσε να συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση για την πρώτη ομάδα ασθενών (Kubista et al., 2011). Η ανοσοιστοχημεία που χρησιμοποιεί πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον των μορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, συμπεριλαμβανομένης της ντεκορίνης, έχει αποδειχθεί ότι είναι χρήσιμο εργαλείο για τον διαφορικό χαρακτηρισμό των οστεοειδών σε μια ομάδα 20 οστεοσαρκωμάτων με διάφορες παραλλαγές του σχηματισμού των οστεοειδών (Schulz et al., 1998). Είναι σημαντικό ότι αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο ιστολογικός υπότυπος του οστεοσαρκώματος είναι προγνωστικός παράγοντας για την απάντηση στη χημειοθεραπεία (Bacci et al., 1998,

Hauben et al., 2002) και συσχετίζεται με την περίοδο χωρίς νόσο (Bacci et al., 2006, Hauben et al., 2006) και τη συνολική επιβίωση (Ferrari et al., 2001). Επιπλέον, βρέθηκε ότι η ντεκορίνη καταστέλλει τη μετάσταση του οστεοσαρκώματος των ποντικών στους πνεύμονες, γεγονός που συσχετίστηκε με μικρότερες ικανότητες προσκόλλησης και κινητικότητας των κυττάρων του οστεοσαρκώματος με έκφραση ντεκορίνης (Shintani et al., 2008). Αυτά τα ευρήματα συσχετίζονται ιδιαίτερα με τις καλά καθιερωμένες αντικαρκινικές ιδιότητες της ντεκορίνης (Reed and Iozzo 2002). Είναι ενδιαφέρον ότι η μόνη εξαίρεση στο καθιερωμένο μοντέλο ογκοκαταστολής είναι η περίπτωση των ιδιαίτερα επιθετικών κυττάρων του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος MG-63, που βρέθηκε ότι παράγουν διαρκώς ντεκορίνη και είναι ανθεκτικά στην αναστολή της ανάπτυξης που προκαλείται από τη ντεκορίνη (Zafiropoulos et al., 2008).

Ο ρόλος της λουμικάνης στην παθογένεση του οστεοσαρκώματος έχει ήδη ερευνηθεί (Nikitovic et al., 2008). Πράγματι, η γενιά των κυττάρων του οστεοσαρκώματος με έλλειψη λουμικάνης κατέδειξε ότι η έκφραση της λουμικάνης ίσως να συσχετίζεται θετικά με τη διαφοροποίηση και αρνητικά με την εξέλιξη του οστεοσαρκώματος (Nikitovic et al., 2008). Επιπλέον, περιγράφηκε ένα καινοτόμο σηματοδοτικό κύκλωμα από έξω προς τα μέσα στα κύτταρα του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος: βρέθηκε ότι η εκκρινόμενη λουμικάνη είναι ενδογενής αναστολέας της δραστηριότητας του TGF- β 2, καταλήγοντας σε ρύθμιση καθοδικής σηματοδότησης του μεσολαβητή, συμπεριλαμβανομένης της φωσφοπρωτεΐνης Smad2, της ντεγκρίνης β 1 και της φωσφορυλιωμένης κινάσης εστιακής προσκόλλησης, ώστε να ρυθμίσει την προσκόλληση του οστεοσαρκώματος (Nikitovic et al., 2011). Από την άλλη πλευρά, φάνηκε ότι η έκφραση της ινομοδουλίνης ρυθμίζεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι της μορφογενετικής

πρωτεΐνης των οστών και επομένως συσχετίζεται πιθανώς με την κυτταρική μεταμόρφωση οστεοβλαστικής προέλευσης (Gori et al., 2001).

2.2.7 Πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες για νόσους των οστών

Ως ρυθμιστές των σηματοδοτικών μορίων, οι SLRPs ίσως προσφέρουν ελπίδα για τη θεραπεία και την πρόληψη των νόσων. Έχει προταθεί ότι η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της διγλυκάνης εκπροσωπεί έναν μηχανισμό που εξουδετερώνει την απώλεια του ασβεστοποιημένου οστού σε συνθήκες μείωσης των οιστρογόνων (Nielsen et al., 2003). Η εφαρμογή υπερήχων χαμηλής έντασης στο σημείο επούλωσης του μοσχεύματος του τένοντα και του οστού δραστηριοποίησε την ενδογενή έκφραση της διγλυκάνης και του κολλαγόνου I, βελτιώνοντας έτσι την επούλωση του τένοντα και του οστού (Paratheodorou et al., 2009). Οι παραπάνω μελέτες υποστηρίζουν την αξιοποίηση της θεραπείας με διγλυκάνη ως αξιόπιστο χώρο θεραπείας για τη μείωση ή τον αποκλεισμό των εκφυλιστικών νόσων των οστών. Η απόδειξη της αρχής της πιθανότητας μιας τέτοιας εφαρμογής προέρχεται από μια πρόσφατη μελέτη που δείχνει ότι οι ενέσεις διγλυκάνης σε mdx ποντίκια με έλλειψη δυστροφίνης μπορούν να επιδιορθώσουν πολυάριθμα ελαττώματα που μιμούνται τη μυϊκή δυστροφία, συμπεριλαμβανομένης της βελτίωσης της μυϊκής λειτουργίας (Amenta et al., 2011). Σε αυτό το σημείο, μπορεί να σημειωθεί ότι η εξωγενώς εφαρμοσμένη ανασυνδυασμένη διγλυκάνη θα μπορούσε να διασώσει την εξασθενημένη σηματοδότηση του LRP6 που προκλήθηκε από μετάλλαξη στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα των πρωτεϊνών Wnt (Abdel-Wahab et al., 2002). Επομένως, η ειδική τοποθεσία και λειτουργία των SLRPs έξω από το κύτταρο παρέχουν προσβασιμότητα για αποτελεσματική και απλή θεραπευτική παρέμβαση.

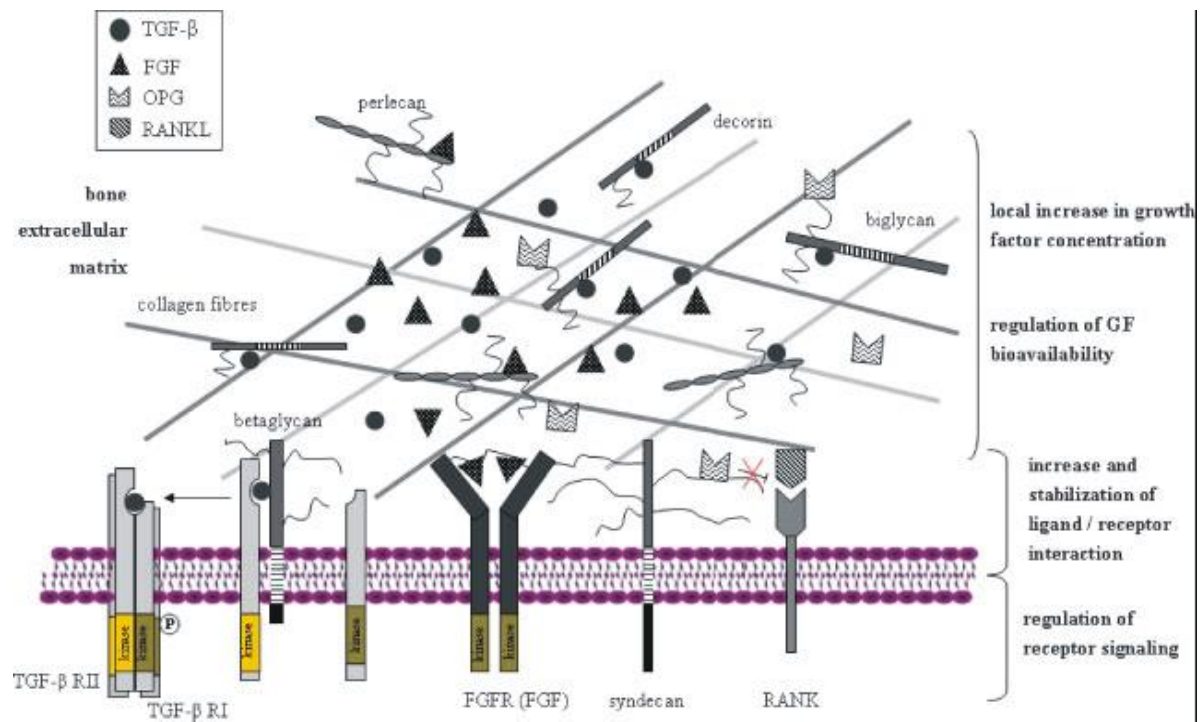
Στην περίπτωση των πρωτοπαθών όγκων των οστών (οστεοσαρκώματα) βρέθηκε ότι τα κύτταρα του οστεοσαρκώματος με έκφραση ντεκορίνης έχουν μειωμένη ικανότητα να προκαλέσουν μεταστάσεις στους πνεύμονες στο μοντέλο ποντικών, και επομένως δείχνουν ότι η ντεκορίνη έχει θεραπευτική δυνατότητα να μειώσει τη μετάσταση στους πνεύμονες στο οστεοσάρκωμα (Shintani et al., 2008). Μια σημαντική πλευρά σχετικά με τον ρόλο των SLRPs στην ανάπτυξη και την εδραίωση των όγκων είναι ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος των όγκων. Πράγματι, πολλές SLRPs, συμπεριλαμβανομένης της διγλυκάνης, της ντεκορίνης και της ινομοδουλίνης, εκφράζονται στο στρώμα και τουλάχιστον η ινομοδουλίνη φαίνεται ότι ελέγχει τη δομή και την ακεραιότητά του (Oldberg et al., 2007).

2.3 Αυξητικός παράγοντας του μετασχηματισμού TGF-β

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

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

Εικόνα 1.13



Εικόνα 1.13: Πρωτεογλυκάνες ως ρυθμιστές της δραστηριότητας των αυξητικών παραγόντων στα οστά (Mintz, 2006).

Μετά τη ενεργοποίησή του, ο TGF-β προκαλεί τη σηματοδότηση, μέσω αλληλεπίδρασης και ένωσης του, με τους δύο αντίστοιχους υποδοχείς της κινάσης της σερίνης / θρεονίνης, που αναφέρονται σαν υποδοχείς τύπου I και II. Ο υποδοχέας II φωσφορυλιώνει τον τύπου I υποδοχέα που επάγει την ενεργοποίηση της κινάσης (Massague, 2005). Υπάρχουν και αναπληρωματικοί υποδοχείς για το TGF-β, στους οποίους περιλαμβάνεται ο τύπος III (TβR-III) υποδοχέας που ονομάζεται και μεταγλυκάνη (Εικόνα 1.13). Η μεταγλυκάνη είναι μια πρωτεογλυκάνη που λειτουργεί σαν συνυποδοχέας παρουσιάζοντας τους προσδέτες στο υποδοχέα τύπου II (Blobe et al. 2002). Ο κύριος μηχανισμός μετατροπής του σήματος του TGF-β πραγματοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Smad από τον υποδοχέα τύπου I. Οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες Smad συγκεντρώνονται στον

πυρήνα, όπου συνεργάζονται με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων (Massague et al, 2005). Είναι γνωστό ότι οι ισομορφές του TGF-β ενεργοποιούν τα Smad 1 και 2.

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

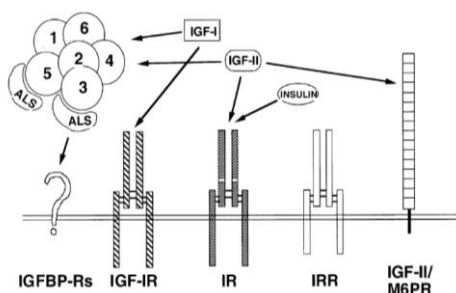
Ο TGF-β είναι άφθονος στο οστίτη ιστό (Seyedin et al, 198) και διεγείρει το σχηματισμό νέου οστού in vivo μετά από τοπική ή συστηματική χορήγηση (Critchlow et al, 1994; Noda & Camilliere, 1989). Υψηλού βαθμού κακοηθείας οστεοσαρκώματα εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα TGF-β συγκρινόμενα με εκείνα του χαμηλού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

2.4 Αυξητικός παράγοντας IGF-I και υποδοχέας IGF-IR

Οι ινσουλινόμορφοι αυξητικοί παράγοντες IGFs είναι πολυπεπτιδικές ορμόνες που προκαλούν τη διαίρεση πλήθους υγιών και καρκινικών κυτταρικών τύπων (Furlanetto et al., 1994). Η «οικογένεια» των IGFs αποτελείται από τους IGF προσδέτες (IGF-I

και IGF-II), τους υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας (IGF-IR υποδοχέας, IGF-IIR υποδοχέας και υποδοχέας ινσουλίνης IR), που ρυθμίζουν τις βιολογικές επιδράσεις των IGFs, όπως επίσης και από πρωτεΐνες πρόσδεσης των IGFs (IGFBPs) (LeRoith and Roberts, 2003)(Εικόνα 1.14).

Εικόνα 1.14



Εικόνα 1.14: Η οικογένεια IGF αποτελείται από τους προσδέτες, τους υποδοχείς και τις IGFBP πρωτεΐνες. Leroith et al., 2003.

Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί στην κυκλοφορία και στην ECM τουλάχιστον 6 πρωτεΐνες IGFBPs και ο ρόλος αυτών είναι η επίδραση στην ημιζωή και στη βιοενεργότητα των προσδετών IGFs (Kooijman et al., 2006). Συνολικά όλη η οικογένεια των IGFs παίζει καταλυτικό ρόλο στην αύξηση και διαφοροποίηση των ιστών και ρυθμίζει τη συνολική ανάπτυξη, κυρίως προγεννητικά.

Επίσης έχει αποδειχτεί ότι συμμετέχει σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις, μία από τις οποίες είναι και η ογκογένεση (LeRoith and Roberts, 2003).

Τα ώριμα πεπτίδια IGF-1 και IGF-2 αποτελούνται από Β και Α περιοχές, οι οποίες είναι ομόλογες με τις Β και Α αλυσίδες της ινσουλίνης. Σε αντίθεση όμως με την ινσουλίνη, τα IGF πεπτίδια δεν έχουν διασπαστεί, αλλά παραμένουν ενωμένα στα ώριμα πεπτίδια από C περιοχές ανάλογες με το C πεπτίδιο της ινσουλίνης. Τόσο το IGF-1, όσο και το IGF-2, περιέχουν μία επιπλέον D επικράτεια η οποία δεν υπάρχει

στην ινσουλίνη. Οι πρόδρομες μορφές των ορμονών IGF-1 και IGF-2 περιέχουν στη C επικράτεια ένα E πεπτίδιο, το οποίο διασπάται στο σύμπλεγμα Golgi κατά τη διάχυση (Daughaday and Rotwein, 1989). Η έκφραση του IGF-2 γονιδίου είναι έντονη πριν τη γέννηση στα τρωκτικά και μειώνεται σημαντικά μετά από αυτήν. Μόνο το χοριοειδές πλέγμα και η αραχνοειδής μήνιγγα συνθέτουν IGF-2 σε ενήλικα άτομα. Αντίθετα, η έκφραση του IGF-1 είναι χαμηλή κατά τα εμβρυικά στάδια των ποντικών και αυξάνεται σημαντικά κατά την εφηβεία και την ενήλικη ζωή, όπου η ηπατική παραγωγή παίζει καθοριστικό ρόλο στη γενική ρύθμιση των επιπέδων του IGF-1. Ο IGF-1 ασκεί ενδοκρινικές, παρακρινικές και αυτοκρινικές επιδράσεις και επίσης παράγεται από έναν αριθμό άλλων οργάνων όπως το νεφρό, τον πνεύμονα και τα οστά. Επομένως, η τελική εικόνα δείχνει ότι ο IGF-2 είναι παράγοντας της εμβρυικής ανάπτυξης και ο IGF-1 παράγοντας ανάπτυξης σε ενήλικα άτομα. Παρόλα αυτά, το μοτίβο αυτό ισχύει μόνο για την ανάπτυξη των τρωκτικών, καθώς στον άνθρωπο τόσο ο IGF-1 όσο και ο IGF-2 παράγονται σε πλήθος ιστών καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του. Στην πραγματικότητα, τα επίπεδα του IGF-2 στην κυκλοφορία του αίματος των ανθρώπων είναι αρκετές φορές υψηλότερα από αυτά του IGF-1, γεγονός που είναι συμβατό με το σενάριο ότι ο IGF-1 και ο IGF-2 έχουν αποκλίνοντες ρόλους στην ανθρώπινη φυσιολογία (Daughaday and Rotwein, 1989).

Οι προσδέτες IGF-1 και IGF-2 αλληλεπιδρούν με μία σειρά μεμβρανικών υποδοχέων, οι οποίοι μπορεί να βρίσκονται μόνοι ή σε συνδυασμούς στα κύτταρα στόχους. Τόσο ο IGF-1 όσο και ο IGF-2 αλληλεπιδρούν με τον IGF-1R – υποδοχέα κινάσης τυροσίνης – ο οποίος είναι δομικά και λειτουργικά σχετιζόμενος με τον IR (insulin receptor). Ο IGF-2 μπορεί επίσης να προσδεθεί στον IGF-2R. Οι περισσότερες, αν όχι όλες, οι μετέπειτα ενέργειες του IGF-1 είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του από τον IGF-1R, καθώς ο IGF-1 δεν επιδρά με τον IR (Frasca et al., 1999; LeRoith et al.,

1995; Pandini et al., 2002). Όταν οι προσδέτες IGF-1 και IGF-2 συνδέονται με την εξωκυτταρική υπομονάδα του IGF-1R, επάγεται η αλλαγή στη στερεοδιάταξη της trans- μεμβράνης της β υπομονάδας, που έχει ως συνέπεια την trans-αυτοφωσφορυλίωση στην περιοχή της κυτταροπλασματικής κινάσης της τυροσίνης της β υπομονάδας. Έτσι ο υποδοχέας κινάσης τυροσίνης ενεργοποιείται και επιπλέον κατάλοιπα τυροσίνης αποφωσφορυλιώνονται. Στη συνέχεια έχουμε μία σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων που έχουν ως τελικό στόχο μέλη από τις οικογένειες των ETS και FOX μεταγραφικών παραγόντων. Ρύθμιση της λειτουργίας των μεταγραφικών παραγόντων παρέχει ένα μηχανισμό με τον οποίο η δράση του IGF στην κυτταρική επιφάνεια μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και τελικά να επηρεάσει τους ρυθμούς πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και απόπτωσης των IGFs.

2.5 Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης

Το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt είναι ένα εξαιρετικά διατηρημένο σύστημα που ρυθμίζει τις σύνθετες βιολογικές διεργασίες σε όλα τα μετόζωα. Σε κυτταρικό επίπεδο, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες του μονοπατιού Wnt χρησιμεύουν για να αλλάζουν την συμμετρία και να παρέχουν στα κύτταρα πληροφορίες θέσης που είναι κρίσιμες για το σχεδιασμό ολόκληρου του σώματος. Στον οργανισμό, χρησιμοποιούνται σήματα Wnt για την οργάνωση των θεμελιωδών αναπτυξιακών διαδικασιών, περιλαμβανομένης της προδιαγραφής του κέφαλο - ουραίου άξονα του σώματος και των επακόλουθων κινήσεων κατά τη γαστριδίωση των εμβρύων καθώς της δημιουργίας ποικιλομορφίας κυττάρων και ιστών. Οι λειτουργίες του μονοπατιού Wnt φαίνονται και στην ενηλικίωση όπου ρυθμίζουν τη συμπεριφορά των κυττάρων,

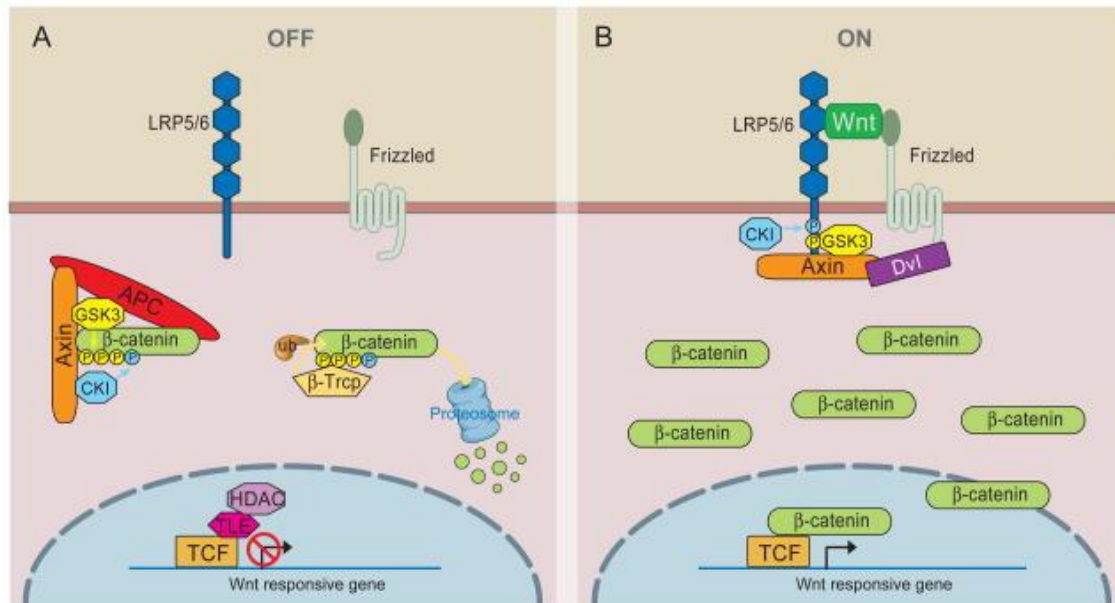
την ομοιόσταση των ιστών και την αποκατάσταση βλαβών. Η διαταραχή της δραστηριότητας σηματοδότησης Wnt κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη ή στους ενήλικες έχει ως αποτέλεσμα ένα φάσμα διαταραχών και ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Οι μοριακοί μηχανισμοί του μονοπατιού που εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές επιδράσεις είναι αντικείμενο της έρευνας (Grainger and Willert, 2018).

Όταν ένα σήμα του μονοπατιού Wnt έχει μετακινηθεί κατά μήκος της μεμβράνης, μπορεί να ενεργοποιηθεί μια ποικιλία μονοπατιών σηματοδότησης. Μια βασική οδός σηματοδότησης είναι αυτή στην οποία συμμετέχει η β-κατενίνη (Wnt / β-κατενίνης), κοινώς αναφερόμενη ως "canonical" ή "cell fate" σηματοδότηση (Loh et al., 2016). Επιπροσθέτως αυτής της οδού, η οποία δίνει σήμα στον πυρήνα για την ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων, έχουν περιγραφεί αρκετές άλλες κυτταροπλασματικές οδοί και μεσολαβητές, που ονομάζονται "non-canonical" ή "με σήματα ανεξάρτητα από τη β-κατενίνης. Παρόλο που αυτές οι εναλλακτικές οδοί σηματοδότησης πιθανώς εκδηλώνουν ανεξάρτητα σηματοδοτικά γεγονότα, δεν αλληλοαποκλείονται η μία από την άλλη, απαραίτητα. (Grainger and Willert 2018).

Το ρυθμιστικό μόριο της β-κατενίνης δρα ως ο πρωτεύων μεσολαβητής της σηματοδότησης Wnt είτε μετατοπιζόμενο στον πυρήνα για να ενεργοποιήσει την έκφραση του γονιδίου στόχου είτε για να αποικοδομήσει συστατικά του κυττάρου. Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοαπτιού Wnt προάγει την ενεργοποίηση των υποδοχέων Fzd και Lrp5 / 6 (Εικόνα 1.15). Η εξωκυτταρική περιοχή του Lrp5 / 6 αποτελείται από τέσσερις περιοχές β-έλικας που μεσολαβούν σε αλληλεπιδράσεις με αρκετά εξωκυτταρικά προσδέματα (Grainger and Willert, 2018). Απουσία Wnt, η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη της β-κατενίνης αποικοδομείται συνεχώς από τη δράση του συμπλέγματος Axin, το οποίο αποτελείται από την πρωτεΐνη Axin, το γονιδιακό

προϊόν APC, την κινάση καζεΐνης 1 (CK1) και την κινάση συνθάσης γλυκογόνου 3 (GSK3). Η CK1 και η GSK3 φωσφορυλιώνουν διαδοχικά την αμινοτελική περιοχή της β-κατενίνης, με αποτέλεσμα την αναγνώριση της β-κατενίνης από β-Trcp, μια υπομονάδα λιγάσης ουμπικουΐνης E3 και την επακόλουθη ουβικιτινυλίωση της β-κατενίνης και πρωτεασωμική αποικοδόμησή της. Αυτή η συνεχής εξάλειψη της β-κατενίνης παρεμποδίζει την β-κατενίνη να φθάσει στον πυρήνα, και τα γονίδια-στόχοι Wnt καταστέλλονται έτσι από την οικογένεια πρωτεϊνών TCF / LEF. Η οδός Wnt / β-κατενίνης ενεργοποιείται όταν ένας συνδετήρας Wnt δεσμεύεται στον υποδοχέα Fz ή Fzd και τον LRP6 ή τον παρόμοιο LRP5 υποδοχέα. Ο σχηματισμός ενός πιθανού συμπλόκου Wnt-Fz-LRP6, μαζί με την πρόσληψη της πρωτεΐνης Dvl, έχει ως αποτέλεσμα φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση LRP6 και την πρόσληψη του συμπλόκου Axin στους υποδοχείς. Αυτά τα γεγονότα οδηγούν στην αναστολή της φωσφορυλίωσης β-κατενίνης με τη μεσολάβηση του Axin και συνεπώς στη σταθεροποίηση της β-κατενίνης, η οποία συσσωρεύεται και μετακινείται στον πυρήνα για να σχηματίσει σύμπλοκα με TCF / LEF και ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων στόχων Wnt (MacDonald et al., 2009). Έχει αποδειχθεί ότι ένα από τα γονίδια που επηρεάζεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt είναι αυτό της κυκλίνης D1 (Frysak et al. 2015). Η κυκλίνη D1 είναι ένα μόριο που ελέγχει μεταγραφικά, μεταφραστικά και μετα-μεταφραστικά τον κυτταρικό κύκλο και επομένως την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων (Qie and Diehl 2016).

Εικόνα 1.15



Εικόνα 1.15: Σηματοδότηση μονοπατιών β-κατενίνης/Wnt. Απενεργοποιημένο μονοπάτι (αριστερά) και ενεργοποιημένη οδός (δεξιά) (MacDonald et al., 2009)

Λόγω των πολλών δράσεων στα κύτταρα, η αναστολή της σηματοδότησης Wnt θα μπορούσε να είναι στόχος στη θεραπεία των καρκίνων, ενώ η ενεργοποίηση σηματοδότησης του Wnt θα ήταν χρήσιμη στην κατανόηση μηχανικής των ιστών και στην αναπτυξιακή βιολογία.

2.6 Στόχοι της διατριβής

Συμπερασματικά, αναλύθηκε στην εισαγωγή ο σημαντικός ρόλος των SLRPs στη φυσιολογία και τις νόσους των οστών. Έχει καθιερωθεί ότι αυτές οι μικρές πρωτεογλυκάνες ρυθμίζουν ειδικά τόσο την οστική οστεογένεση όσο και την ανακατασκευή, και επίσης συμμετέχουν στην εξέλιξη κοινών εκφυλιστικών νόσων των οστών. Χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για την περιγραφή των ειδικών σηματοδοτικών μονοπατιών στην ανάπτυξη και την ομοιόσταση του σκελετού. Λόγω της συμμετοχής των SLRPs σε πολλαπλές εκφυλιστικές, φλεγμονώδεις και νεοπλασματικές νόσους, αναμένεται ότι κάποια από τα προϊόντα των γονιδίων που εκκρίνονται από τις SLRPs θα μπορούσαν να γίνουν αξιόπιστοι βιοδείκτες για τις νόσους των οστών και ίσως στόχοι για καινοτόμες θεραπευτικές παρεμβάσεις. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρουσιάζονται σηματοδοτικοί μηχανισμοί με τους οποίους τα SLRPs και πιο συγκεκριμένα η λουμικάνη και η διγλυκάνη, δρουν και ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες κυττάρων του οστεοσαρκώματος:

- 1) Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (Nikitovic et al., 2008) απέδειξαν ότι σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος εκφράζεται και εκκρίνεται λουμικάνη με γλυκοζαμινογλυκανικές αλυσίδες θειικής κερατίνης. Η λουμικάνη παρουσιάζεται να δρα στην παθογένεια του οστεοσαρκώματος, αφού η ανάπτυξη των Saos 2 κυττάρων μειώθηκε με την προσθήκη της, ενώ η μεταναστευτική και χημειοτακτική ικανότητα των κυττάρων αυτών αυξήθηκε σημαντικά (Nikitovic et al., 2008). Οι παραπάνω λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων ρυθμίζονται από σημαντικά μονοπάτια των όγκων των οστών, όπως το Smad σηματοδοτικό μονοπάτι (Nikitovic et al., 2008). Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η δράση της λουμικάνης στην προσκόλληση κυττάρων

του οστεοσαρκώματος και διερευνήθηκε ο ρόλος της λουμικάνης στην ρύθμιση της διαθεσιμότητας των ισομορφών του αυξητικού παράγοντα του μετασχηματισμού β (transforming growth factor-β, TGF-β) και την περαιτέρω μεταβολή της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης και της ρύθμισης των κυτταρικών λειτουργιών.

- 2) Σηματοδοτικά μόρια κατάντι της διγλυκάνης έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος καθώς και την πρόγνωσή του. Πρόσφατα έχειδειχθεί ότι η μείωση του υποδοχέα LRP6 (low-density lipoprotein receptor related protein 6) του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/b-catenin, με την χρήση microRNA-183 (miR-183), ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό και την διήθηση κυττάρων του ινοσαρκώματος (Yang et al., 2018). Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Wnt θεωρείται ένα από τα κύρια μονοπάτια της παθογένεσης του καρκίνου του οστεοσαρκώματος (Cai et al., 2014). Στην παρούσα διατριβή, βάση της σημασίας της διγλυκάνης στην ρύθμιση της σηματοδότησης των λειτουργιών των κυττάρων οστεοβλαστικής προέλευσης, εξετάσαμε την δράση της στον πολλαπλασιασμό του οστεοσαρκώματος καθώς και στα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται σε αυτόν.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

Τα αντίσωμα έναντι της λουμικάνης (L-21, 1/100 αραιώση), Smad 2 (S-20, 1/200) , διγλυκάνης (sc100857, 1/100), β-κατενίνης (sc7963, 1/300 και 1/50 για τον ανοσοφθορισμό), IGF-IR (sc81464, 1/100), pERK1/2 (sc136521, 1/100) και fibrillarin (sc374022) αγοράστηκαν από την SantaCruz. Το αντίσωμα εναντίον της ακτίνης ήταν από την Millipore (MAB150, 1/500) και από την Thermoscientific για το ERK (MA5-15343, 1/500 dilution) και pIGF-IR (PA5-37602, 1/500 και 1/50 για ανοσοφθορισμό), για την τουμπουλίνη (Sigma-AldrichT4026, 1/1,000) και για το LRP6 (ElabscienceE-AB17347, 1/50). Το πολυκλωνικό αντίσωμα για το φωσφορυλιωμένο Smad 2 (pSmad2, Ser465/467) αγοράστηκε από την εταιρία CellSignaling. Το αντίσωμα έναντι της FAK αγοράστηκε από την BDTransductionLaboratories ενώ το αντίσωμα p-FAK (Y397) αγοράστηκε από την εταιρία Millipore. Τα δεύτερα αντισώματα HRPanti-rabbit (AP182PR), και anti-mouse (AP192PM) χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1/3,000 και αγοράστηκαν από την Millipore. Η εξωγενής διγλυκάνη (2667-CM), ο TGF-β2 (302-B2), το αντίσωμα για τον TGF-β1-2 και ο IGF-I (insulin-likegrowthfactorI, 291-G1) προμηθεύτηκαν από την R&D Diagnostics. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης, ο αναστολέας του ERK1/2 (CellSignalingTechnology, U016) και ο αναστολέας του IGF-IR (Sigma-Aldrich, AG1024).

Όλα τα αντιδραστήρια για τις κυτταροκαλλιέργειες αγοράστηκαν από την Biosera. Ο ορός FBS (fetal bovine serum) ήταν από την Invitrogen και το θρεπτικό υλικό DMEM αγοράστηκαν από την εταιρία Biochrom KG.

2.2 Κυτταροκαλλιέργειες

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα ήταν τα Saos 2 και τα MG63, κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος. Όλα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε κλίβανο στους 37°C και 5% CO₂. Στο θρεπτικό υλικό DMEM της καλλιέργειας είχαν προστεθεί 10% ορός (FBS, fetal bovine serum), 4 mM γλουταμίνης L, 2 g/L διανθρακικού νατρίου, 100 IU/mL πενικιλίνης και 100 g/mL στρεπτομυκίνης. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας 75 cm² και το μέσο της καλλιέργειας άλλαζε κάθε δεύτερη ημέρα. Κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων και πριν τη διέγερση με παράγοντες όπως ο TGF-β2 (10 ng/mL), η διγλυκάνη 10μg/ml ή ο IGF-I 10 ng/ml, το anti-TGF-β1 και 2 (0,5 μg/ml) τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με DMEM χωρίς ορό. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν επιπλέον 24 ή 48 ώρες πριν την απομόνωση του RNA ή την συλλογή των πρωτεϊνών αντίστοιχα. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε αναστολέας (αναστολέας ERK ή IGF), αυτός προστέθηκε 1 ώρα πριν την προσθήκη των άλλων παραγόντων.

2.3 Απομόνωση του RNA και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Το μεταγραφικό RNA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο TRIzol (GibcoBRL) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το συνολικό RNA μετρήθηκε φθορισμομετρικά χρησιμοποιώντας το σετ δοκιμασίας κυτταρικού πολλαπλασιασμού CyQuant-Cell (εταιρία MolecularProbes). Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πακέτου αντιδραστηρίων TAKARA (RR037A) RT cDNA. Η ημι-ποσοτικοποίηση των γονιδίων προς μελέτη έγινε με το σετ

Universal qPCR kit (KAPABiosystems; KK4602) σε συνολικό όγκο 20 μ L, πραγματοποιώντας αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-timePCR) σε κυκλοποιητή Mx300P. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καταγράφονται στον Πίνακα 2.1. Σε κάθε αντίδραση Real-timePCR υπήρχε και μια πρότυπη καμπύλη παραγωγής του γονιδίου προς μελέτη, βάση της οποίας ημι-ποσοτικοποιήθηκε κάθε στόχος. Η ποσότητα κάθε στόχου διορθώθηκε σε σύγκριση με την ποσότητα του γονιδίου GAPDH.

Πίνακας 2.1

Ακολουθία εκκινητών

Primers	Sequences
GAPDH	Forward: 5'-GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA-3' Reverse: 5'-GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CAC T-3'
β -κατενίνη	Forward: 5'-TTC TGG TGC CAC TAC CAC AGC-3' Reverse: 5'-TGC ATG CCC TCA TCT AAT GTC-3'
Κυκλίνη D1	Forward: 5'-CTC CAC CTC ACC CCC TAA AT-3' Reverse: 5'-AGA GCC CAA AAG CCA TCC-3'
διγλυκάνη	Forward: 5'-TCT GAA GTC TGT GCC CAA-3' Reverse: 5'-TCT GAG ATG CGC AGG TA-3'
λουμικάνη	Forward: 5' CTTCAATCAGATAGCCAGACTGC 3' Reverse: 5' AGCCAGTTCGTTGTGAGATAAAC 3'

TGFβ1	Forward: 5' AAGGACCTCGGCTGGAAGTG 3' Reverse: 5' CCCGGGTTATGCTGGTTGTA 3'
TGFβ2	Forward: 5' CTGTCCCTGCTGCACTTTTGT 3' Reverse: 5' TCTTCCGCCGGTTGGTCTGTT 3'
TGFβ3	Forward: 5' GGGCTTTGGACACCAATTAC 3' Reverse: 5' GCAGATGCTTCAGGGTTCAG 3'
TGFR1	Forward: 5' TCGTCTGCATCTCACTCA 3' Reverse: 5' GATAAATCTCTGCCTCACG 3'
TGFR2	Forward: 5' GCGGGAGCACCCCTGTGTC 3' Reverse: 5' CCCGAGAGCCTGTCCAGAT 3'
TGFR3	Forward: 5' AATCTGGGCCATGATGCAG 3' Reverse: 5' ACTGCTTGTTTTCCGAGGC 3'
Θερμοκρασίες RT-PCR (Thermal conditions)	94 °C for 15 min; 40 cycles at 94 °C for 20 sec; 55 °C for 30 sec; 72 °C for 30 sec; 72 °C for 10 min

2.4 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western

Η συνολική πρωτεΐνη που εκκρίθηκε στο θρεπτικό της καλλιέργειας συμπυκνώθηκε χρησιμοποιώντας φυγοκεντρικούς συγκεντρωτικούς σωλήνες Vivaspin, από τον όγκο των 20 mL σε όγκο των 500 μ L. Τα προσκολλημένα κύτταρα λύθηκαν με διάλυμα RIPA (50mM Tris-HCl, 1% NP-40, 0.25% Na-Deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM EDTA, πρωτεάσες και φωσφατάσες). Ίσες ποσότητες πρωτεΐνης, είτε κυτταρικής ή εκκρινόμενης υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE χρησιμοποιώντας 8% γέλη πολυακρυλαμιδίου υπό αναγωγικές συνθήκες. Οι διαχωρισθείσες πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε νιτροκυτταρινικές μεμβράνες που στη συνέχεια, μετά από 24 ώρες επώαση με 5% γάλα στους 4°C, επώασθηκαν για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με τα υπό μελέτη πρώτα αντισώματα σε κάθε περίπτωση. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες πλύθηκαν σε PBS που περιείχε 0.1% Tween-20 (PBS-Tween) και επώασθηκαν με τα απαραίτητα δεύτερα αντισώματα, για κάθε περίπτωση, επιπλέον 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αντισώματα κατά την επώαση ήταν διαλυμένα σε PBS-Tween και 1% (w/v) γάλα. Μετά την πλύση, η προσκόλληση των αντισωμάτων οπτικοποιήθηκε μέσω ενισχυμένης χημιφωταύγειας χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Lumi Sensor Chemiluminescent HRP substrate kit (Genscript; L00221V500).

2.5 Απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνικών δειγμάτων

Τα κύτταρα αφαιρέθηκαν από φλάσκα καλλιέργειας 75 cm² με την χρήση 0,25% θρυψίνη/EDTA, απενεργοποίηση του ενζύμου με την προσθήκη PBS και φυγοκέντρωση στις 1,100 rpm στροφές για 5 λεπτά. Τα υπερκείμενα των δειγμάτων αφαιρέθηκαν και οι πελέτες (φυγοκεντρίμενα κύτταρα) επαναδιαλύθηκαν σε 250 μL παγωμένου PBS με πρωτεασικούς και φωσφατασικούς αναστολείς. Μετά από φυγοκέντρωση στις 1,100 rpm στροφές για 5 λεπτά στους 4°C οι πελέτες επαναδιαλύθηκαν σε 200 μL 5xCPVNP-40 lysisbuffer (10mMTris-HCl, 10mMNaCl, 3mMMgCl₂, 0.5% NP-40 με πρωτεασικούς και φωσφατασικούς αναστολείς). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε οριζόντιο αναδευτήρα στους 4°C για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν στην συνέχεια στις 1,000 rpm στροφές για 5 λεπτά στους 4°C. Τα υπερκείμενα (κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες) φυλάχθηκαν στους -80°C. Οι πελέτες των δειγμάτων επαναδιαλύθηκαν σε 100 μL διαλύματος RIPA (50mMTris-HCl, 1% NP-40, 0.25% Na-Deoxycholate, 150mMNaCl, 1mM EDTA με πρωτεασικούς και φωσφατασικούς αναστολείς), αναδευτήκαν με δύναμη και έμειναν για 1 ώρα σε επίπεδο αναδευτήρα στους 4°C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε και πάλι φυγοκέντρωση στις 13,000 rpm στροφές για 30 λεπτά στους 4°C και τα υπερκείμενα (πυρηνικές πρωτεΐνες) φυλάχθηκαν στους -80°C, όπως και οι πελέτες (μεμβρανικές πρωτεΐνες).

2.6 Σίγανση με siRNA

Για τα πειράματα επιμόλυνσης με μικρά σε μέγεθος RNA (siRNA) τα κύτταρα αφαιρέθηκαν από την φλάσκα καλλιέργειας με την χρήση 0,25% θρυψίνη/EDTA και τοποθετήθηκαν με συγκεκριμένο αριθμό σε άλλα πιάτα καλλιέργειας ανάλογα με την ανάγκη του κάθε πειράματος (πχ 8×10^5 κύτταρα ανά οπή 24-πιάτου). Για την βέλτιστη επιμόλυνση, τα siRNA και η λιποφεκταμίνη 0,25% LipofectamineTM 2000 (Invitrogen) διαλύθηκαν, πρώτα, στο μειωμένου ορού μέσο Opti-MEM^a I (Invitrogen). Μετά από πέντε λεπτά επώασης, η αραιωμένη Lipofectamine[@] 2000 (1 μ L ανά 50 μ L μέσου) αναμείχθηκε με αραιωμένο siRNA (100 pmol ανά 50 μ L μέσου) σε ίσες ποσότητες για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επιτραπεί στα συμπλέγματα λιποσωμάτων του siRNA να σχηματιστούν. Στα κύτταρα προστέθηκε θρεπτικό χωρίς ορό και αντιβιοτικά και στην συνέχεια τα συμπλέγματα του siRNA. Το siRNA για τα υπό μελέτη γονίδια στόχους ή ο αρνητικός δείκτης ελέγχου scrambled siRNA αφαιρέθηκε από τις καλλιέργειες μετά από έξι ώρες επώασης κι αντικαταστάθηκε με φρέσκο θρεπτικό μέσο που περιείχε αντιβιοτικά - η επώαση συνεχίστηκε για 48 ώρες με θρεπτικό ή με τους επιθυμητούς παράγοντες σε κάθε περίπτωση. Σε αυτό το σημείο τα κύτταρα συλλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκε είτε απομόνωση mRNA ή απομόνωση πρωτεϊνών ή χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα δοκιμών κυτταρικών λειτουργιών της μελέτης.

2.7 Δοκιμασία κυτταρικής προσκόλλησης

Πιάτα 96 οπών στρώθηκαν με υπόστρωμα ινονεκτίνης (FN, 5μg/cm²) για 1 ώρα στους 37°C. Οι μη ειδικές θέσεις προσκόλλησης καλύφθηκαν με 1% bovine serum albumin (BSA) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα αφαιρέθηκαν από την φλάσκα καλλιέργειας 75 cm² με την χρήση 0,25% θρυψίνη/EDTA και στρώθηκαν με συγκέντρωση 10⁵cells στις οπές με υπόστρωμα FN. Οι χρόνοι επώασης βελτιστοποιήθηκαν σε αρχικά πειράματα. Τα Saos 2 κύτταρα αφού έμειναν σε θρεπτικό απουσία ορού για 24 ώρες μετά επώαστηκαν με τους αντίστοιχους υπό μελέτη παράγοντες για 48 ώρες στους 37 °C και 5% CO₂. Σε κάποια πειράματα χρησιμοποιήθηκαν και κύτταρα που είχαν πρώτα επιμολυνθεί με siRNAs των γονιδίων υπό μελέτη. Τα μη προσκολλημένα κύτταρα αφαιρέθηκαν με πλύσεις των οπών χρησιμοποιώντας θρεπτικό απουσία ορού. Ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων μετρήθηκε με το πακέτο αντιδραστηρίων φθορισμού CyQuant (MolecularProbes, Invitrogen,) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο φθορισμός μετρήθηκε με μηχανήμα της Biotek και με την χρήση φίλτρων 480/520nm. Για τον υπολογισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μια πρότυπη καμπύλη από αραιώσεις δειγμάτων με γνωστό αριθμό κυττάρων.

2.8 Δοκιμασία κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Τα κύτταρα αφαιρέθηκαν από την φλάσκα καλλιέργειας με την χρήση 0,25% θρυψίνη/EDTA και τοποθετήθηκαν με συγκέντρωση 3500 κύτταρα ανά οπή σε μαύρα πιάτα καλλιέργειας 96 οπών. Τα κύτταρα μετά από 24 ώρες σε θρεπτικό 10% ορού είτε επιμολύνθηκαν με siRNAs ή επώαστηκαν για ακόμα 24 ώρες σε θρεπτικό απουσία ορού. Όλοι παράγοντες υπό μελέτη προστέθηκαν στη συνέχεια, ανάλογα την περίπτωση και

έμειναν για 48 ώρες στους 37°C και 5% CO₂. Ο αριθμός των κυττάρων στη συνέχεια μετρήθηκε με το πακέτο αντιδραστηρίων φθορισμού CyQuant (ThermoScientific; C7026) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο φθορισμός μετρήθηκε με μηχανήμα της Biotek και με την χρήση φίλτρων 480/520nm. Για τον υπολογισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μια πρότυπη καμπύλη από αραιώσεις δειγμάτων με γνωστό αριθμό κυττάρων.

2.9 Ανοσοφθορισμός κυττάρων

Τα MG63 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε κυκλικές καλυπτρίδες και τοποθετήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 24 οπών σε συγκέντρωση 50.000 κύτταρα/οπή. Τις πρώτες 24 ώρες καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 10% ορό και ακολούθησε αλλαγή θρεπτικού με απουσία ορού. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκαν οι υπό μελέτη παράγοντες για κάθε περίπτωση πειράματος. Τα κύτταρα επώαστηκαν με αυτούς για 48 ώρες στους 37° C και 5% CO₂. Κατόπιν, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 5% φορμαλδεΐδης και 2% σακχαρόζης σε PBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 3 πλύσεις με PBS που περιείχε 1% ορό, στα κύτταρα προστέθηκε ο παράγοντας διαπερατότητας μεμβρανών TritonX-100 για 10 λεπτά. Ακολούθως οι καλυπτρίδες πλύθηκαν με PBS διάλυμα συμπληρωμένο με 1% ορό, πριν την προσθήκη του πρώτου αντισώματος. Με τα πρώτα αντισώματα έγινε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι καλυπτρίδες που δεν επώαστηκαν με πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικά δείγματα ελέγχου. Οι καλυπτρίδες πλύθηκαν ξανά και επώαστηκαν στο σκοτάδι σε κανονικές συνθήκες για 1 ώρα με τα δεύτερα αντισώματα. Το ιωδιούχο TO-PRO-3 (MolecularProbes; T3605) αραιωμένο σε συγκέντρωση 1:1000 και διαλυμένο σε απιονισμένο νερό,

εφαρμόστηκε για 10 λεπτά στις καλυπτρίδες με σκοπό να γίνει η χρώση του πυρήνα. Οι καλυπτρίδες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες, χρησιμοποιώντας γλυκερόλη ως μονωτικό και απεικονίστηκαν χρησιμοποιώντας συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy).

2.10 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το student'st-test στην περίπτωση που τα συγκρινόμενα δείγματα ήταν δύο και με ANOVA analysis of variance με Tukey'spost-test στην περίπτωση που τα συγκρινόμενα δείγματα ήταν πάνω από δύο. Το software που χρησιμοποιήθηκε για τις παραπάνω αναλύσει ήταν το Graph PadPrism (version 4.0).

3. Αποτελέσματα

3.1 Περίληψη

Η λουμικήνη ανήκει στην οικογένεια των πλούσιων σε λευκίνη πρωτεογλυκανών (SLRP), τα μέλη της οποίας αποτελούν ένα σημαντικό μέρος των μακρομορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM) (Iozzo, 1997). Αρχικά αναφέρθηκε ως ένα μόριο που συν-εντοπίζεται με τις ίνες του κολλαγόνου στο στρώμα των κυττάρων και ρυθμίζει την οργάνωση και την διάμετρό τους (Blochbergeretal., 1992). Είναι γνωστό πλέον ότι η λουμικήνη εκφράζεται σε πολλούς διαφορετικούς τύπους ανθρώπινου ιστού, συμπεριλαμβανομένου του δέρματος (Chakravartietal., 1998), των αρτηριών (Funderburghetal., 1991), του πνεύμονα (Dolhnikoffetal., 1998), των ασπόνδυλων δίσκων (Sztrolovicsetal., 1999), των νεφρών (Schaeferetal., 2000), των οστών (Raoufetetal., 2002), της αορτής (Qinetal., 1999) και του αρθρικού χόνδρου (Groveretal., 1995). Σε παθολογικές καταστάσεις η λουμικήνη υπερ-εκφράζεται κατά την επούλωση του κερατοειδούς και κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση της καρδιάς (Babaetal., 2001; Saikaetal., 2000). Τα επίπεδα της λουμικήςνης στο μικροπεριβάλλον του όγκου είναι σημαντικά, καθώς έχει αποδειχτεί ότι μειωμένη έκφραση των μορίων αλληλεπίδρασης της οδηγεί σε κακή έκβαση του επιθετικού καρκίνου του μαστού (Leygueetal., 1998). Επίσης, αυξημένη έκφραση των μορίων αλληλεπίδρασης της λουμικήςνης έχει συνδεθεί με υψηλό βαθμό διαφοροποίησης του όγκου, χαμηλά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα των οιστρογόνων σε καρκινικούς ιστούς και με την μικρή ηλικία των ασθενών (Troupetal., 2003). Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των γλυκοζυλιωμένων μορφών της λουμικήςνης στα κύτταρα και στο στρώμα των ιστών συνδέονται με την επιθετικότητα του αδενοκαρκινώματος και του πλακώδους καρκινώματος του πνεύμονος

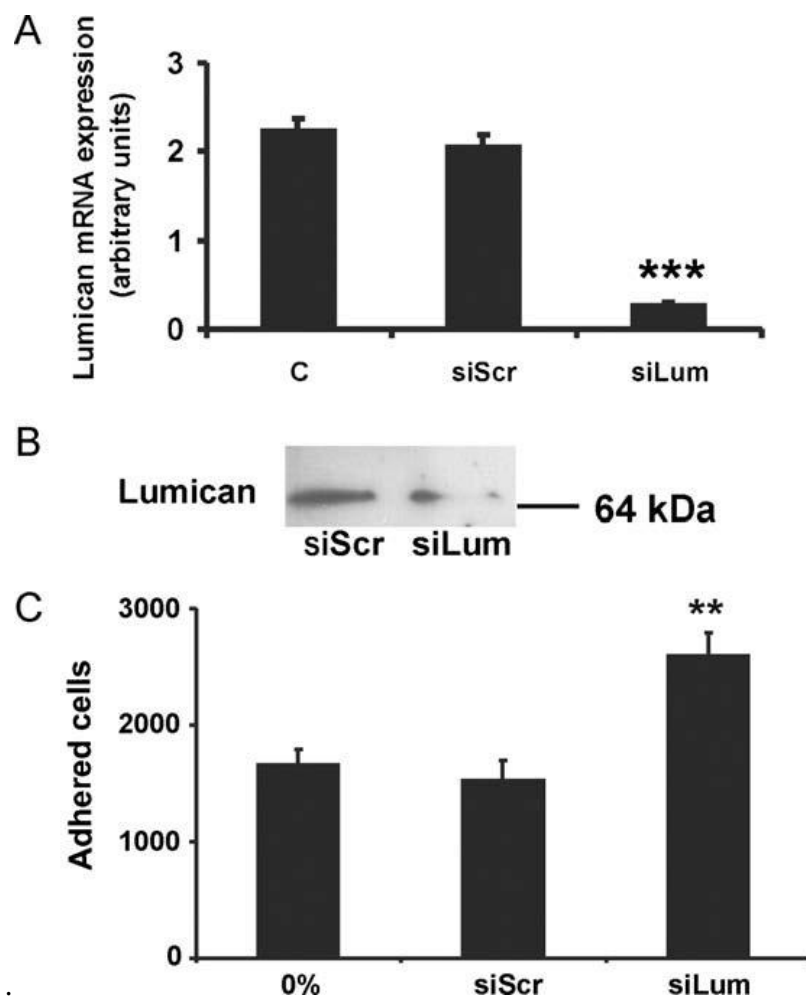
(Matsudaetal., 2008). Αρκετές μελέτες αποδεικνύουν τον ρόλο της λουμικάνης στην έκφραση μορίων ρυθμιστών των κυτταρικών λειτουργιών και δίνουν καινούριες πληροφορίες για τους μηχανισμούς δράσης της. Αναστολή της μετανάστευσης κυττάρων του μελανώματος σε υπόστρωμα λουμικάνης αναφέρθηκε να σχετίζεται άμεσα από την άμεση πρόσδεση του πρωτεϊνικού κορμού της λουμικάνης με την ιντεργκρίνη $\alpha_2\beta_1$ (Zeltzet al., 2010), την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και την μείωση της φωσφορυλιωμένης FAKκινάσης (Brezillonetal.,2009). Επιπρόσθετα, μια ισομορφή της λουμικάνης με μοριακό βάρος 50 kDa βρέθηκε να αναστέλλει την προσκόλληση και την αύξηση των HEK κυττάρων μέσω της ρύθμισης της ενεργοποίησης του μονοπατιού των ιντεγκρινών χωρίς να επηρεάζεται η μεταναστευτική τους ικανότητα (Ishiwataetal., 2010). Στο εργαστήριο μας αποδείξαμε ότι σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος εκφράζεται και εκκρίνεται λουμικάνη με γλυκοζαμινογλυκανικές αλυσίδες θειικής κερατίνης. Η λουμικάνη παρουσιάζεται να δρα στην παθογένεια του οστεοσαρκώματος, αφού η ανάπτυξη των Saos 2 κυττάρων μειώθηκε με την προσθήκη της, ενώ η μεταναστευτική και χημειοτακτική ικανότητα των κυττάρων αυτών αυξήθηκε σημαντικά (Nikitovic et al., 2008). Οι παραπάνω λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων ρυθμίζονται από σημαντικά μονοπάτια στους όγκους των οστών, όπως το Smad σηματοδοτικό μονοπάτι (Nikitovic et al., 2008). Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η δράση της λουμικάνης στην προσκόλληση κυττάρων του οστεοσαρκώματος και διερευνήθηκε ο ρόλος που αυτή έχει στην ρύθμιση της διαθεσιμότητας των ισομορφών του αυξητικού παράγοντα του μετασχηματισμού β (transforming growth factor- β , TGF- β) καθώς και στην περαιτέρω μεταβολή της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης και ρύθμισης των κυτταρικών λειτουργιών.

3.2 Ο ρόλος της λουμικάνης στην προσκόλληση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

Σε αυτήν την μελέτη η κυτταρική σειρά του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος Saos 2 χρησιμοποιήθηκε σε *in vitro* μοντέλο για να εξεταστεί η πιθανή επίδραση της λουμικάνης στις προσκολλητικές ιδιότητες των κυττάρων του οστεοσαρκώματος. Τα κύτταρα Saos 2 είναι καλά διαφοροποιημένα κύτταρα μορφολογικά παρόμοια με τους οστεοβλάστες (Benayahuetal., 1998). Η ικανότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος να προσκολλώνται στην ινονεκτίνη (FN) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την δοκιμασία της προσκόλλησης *in vitro*, όπου το καλύτερο χρονικό σημείο προσκόλλησης ήταν τα 30 λεπτά.

Τα κύτταρα Saos 2 επιμολύνθηκαν με siRNA λουμικάνης για να διερευνηθεί η πιθανή συμμετοχή της λουμικάνης στην προσκόλληση των κυττάρων του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος (Nikitovic et. al., 2008). Όπως επιβεβαιώνεται από το εικόνα 3.1A η αναστολή της έκφρασης του mRNA της λουμικάνης ήταν σημαντική (81%) 48 ώρες μετά την επιμόλυνση (Εικόνα 3.1A). Επίσης στα ίδια κύτταρα υπήρξε σημαντική μείωση στην έκκριση της λουμικάνης (Εικόνα1B). Η μείωση της έκφρασης της λουμικάνης αύξησε στατιστικά σημαντικά την ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων στην FN συγκριτικά με τα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με μη κωδικοποιημένο siScr ($p \geq 0.01$) (Εικόνα3.1C). Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην προσκόλληση ανάμεσα στα κύτταρα siScr και στα κύτταρα ελέγχου (Control, C) (Εικόνα 3.1C). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η ικανότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος να προσκολλώνται ειδικά πάνω στο υπόστρωμα της FN εξαρτάται από τη λουμικάνη.

Εικόνα 3.1



Εικόνα 3.1: Επιμόλυνση με siRNA. Τα κύτταρα Saos 2 επιμολύνθηκαν με επεμβατικό RNA εναντίον της λουμικάνης και μη επεμβατικό RNA (siScr) ως αρνητικό δείκτη. (A) Η αναστολή της έκφρασης του mRNA λουμικάνης επιβεβαιώθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου συγκριτικά με το siScr στο χρονικό σημείο των 48 ωρών. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν κι εκφράζονται ως μέση τιμή \pm S.E.M. Στατιστική σημασία: $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.01$ συγκριτικά με τα δείγματα ελέγχου. (B) Έγινε ανάλυση για λουμικάνη με ανοσοαποτύπωση κατά Western στη συνολική εκκρινόμενη πρωτεΐνη από τα κύτταρα Saos 2 siScr και siLum. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης παρουσιάζονται. (C) Επίδραση του siRNA λουμικάνης στην κυτταρική προσκόλληση. 48 ώρες μετά τη επιμόλυνση, τα επιμολυσμένα κύτταρα με λουμικάνη (siLum) και αυτά με τον αρνητικό δείκτη siScr συλλέχθηκαν και καλλιεργήθηκαν (10^5 κύτταρα) για 30 λεπτά σε πλάκες 96 οπών που ήταν επιστρωμένες με την FN ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας CyQUANT. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Μέσες τιμές \pm S.E.M. αποτυπωμένες. Στατιστική σημασία: $**p \leq 0.01$ ανάμεσα στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με λουμικάνη και τα siScr.

3.3 Δράση της λουμικάνης στην TGF-β2 ρυθμιζόμενη κυτταρική προσκόλληση

Παρομοίως με άλλες πρωτεογλυκάνες (Naito, 2005), η λουμικάνη έχει αποδειχτεί ότι προσδένεται με τον TGF-β2 *in vitro* (Kao, 2006) και με αυτόν τον τρόπο μπορεί να ρυθμίσει την σηματοδότηση του TGF-β2. Η αρχική ανάλυση των ισομορφών του TGF-β (TGF-β-1, 2 και 3) και η έκφραση των αντίστοιχων υποδοχέων τους (TGFRI, TGFRII και βήτα γλυκάνες) έδειξαν ότι τα κύτταρα Saos 2 εκφράζουν όλες τις ισομορφές του TGF-β και των αντίστοιχων υποδοχέων τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Πίνακας 3.1), σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές (Franchietal., 1998) όπου ο TGF-β2 ήταν η κυρίαρχη ισομορφή.

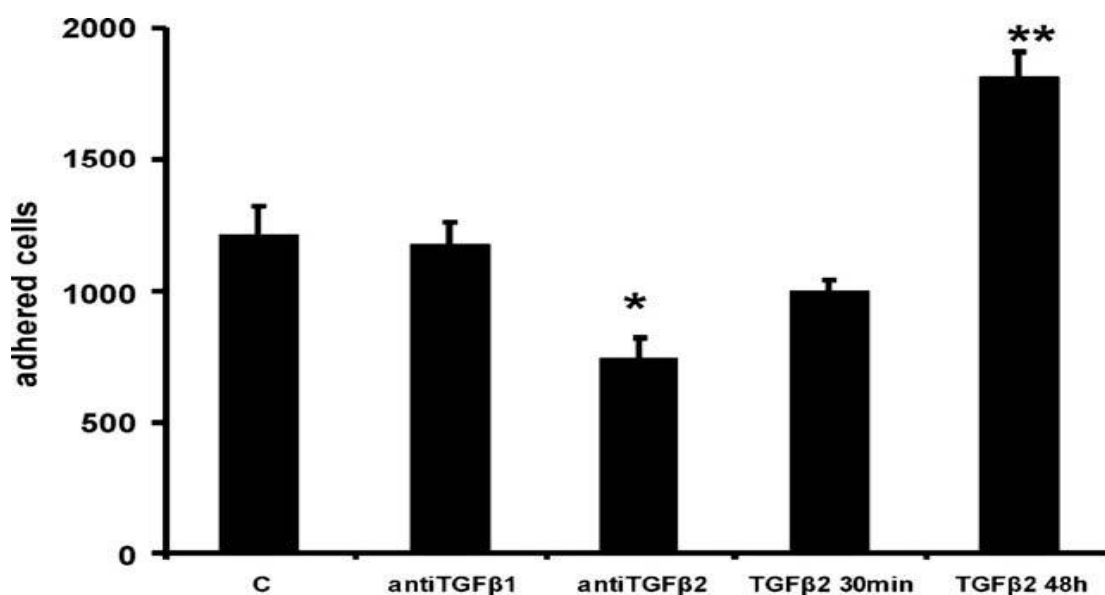
Πίνακας 3.1

<u>Έκφραση των ισομορφών και υποδοχέων TGFβ</u>	
<u>Γονίδιο</u>	<u>Αυθαίρετες μονάδες</u>
TGFβ1	2.4
TGFβ2	3.9
TGFβ3	0.5
TGFR1	3.7
TGFR2	2.4
TGFR3	0.3

Τα αντισώματα anti-TGF-β1 και β2 χρησιμοποιήθηκαν (0.5 μg/ml) για να μελετηθεί η επίδραση των ενδογενών ισομορφών του TGF-β στην προσκόλληση των κυττάρων Saos 2. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2, η χρήση των δύο αντισωμάτων anti-TGF-β2 εμπόδισε την

προσκόλληση των κυττάρων Saos 2 ($p \leq 0.05$) υποδεικνύοντας ότι ο ενδογενής TGF- β 2 δραστηριοποιεί την προσκολλητική ικανότητα των κυττάρων Saos 2. Παρομοίως, η εξωγενής προσθήκη του TGF- β 2 (10 ng/ml) αύξησε την προσκόλληση των κυττάρων Saos 2 στο υπόστρωμα FN ($p \leq 0.01$) (Εικόνα 3.2). Αντιθέτως, η επώαση με το αντίσωμα TGF- β 1 δεν επηρέασε τις προσκολλητικές ικανότητες των κυττάρων Saos 2 ($p = NS$) (Εικόνα 3.2). Επιπλέον, η προσθήκη του TGF- β 2 σε κύτταρα (που καλλιεργήθηκαν σε 0% FBS) κατά τη διάρκεια της τριαντάλεπτης περιόδου επανακαλλιέργειας δεν επηρέασε την προσκολλητική τους ικανότητα (Εικόνα 3.2). Πειράματα, επίσης, έδειξαν ότι η προσκόλληση των κυττάρων Saos 2 σε πλαστικό δεν επηρεάστηκε από τον TGF- β 2 (δεδομένα που δεν έχουν παρουσιαστεί) υποδεικνύοντας επομένως ότι ο TGF- β 2 ρυθμίζει συγκεκριμένα την εξαρτώμενη από την FN προσκόλληση σε κύτταρα οστεοσαρκώματος.

Εικόνα 3.2

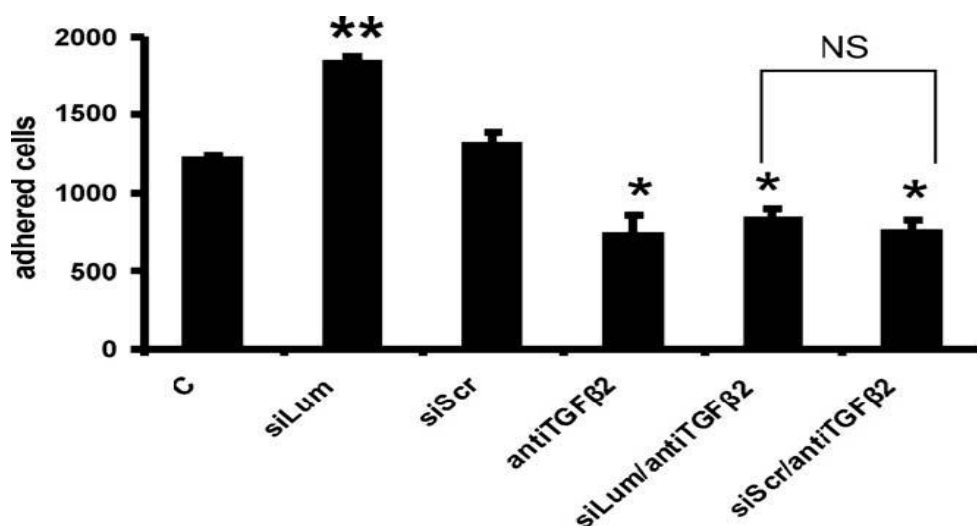


Εικόνα 3.2: Η επίδραση της σηματοδότησης του TGF- β 2 στην κυτταρική προσκόλληση του οστεοσαρκώματος. Τα κύτταρα Saos 2 επώαστηκαν με τον TGF- β 2 (10 ng/ml), το anti-TGF- β 1 (0.5 μ g/ml) και το anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml) για 48 ώρες πριν τη συλλογή και την επανακαλλιέργεια (10^4 κύτταρα) για 30 λεπτά σε πιάτα 96 οπών επιστρωμένα με την FN (5 μ g/cm²). Ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το σετ φθορισμομετρικής δοκιμασίας CyQUANT (εταιρία Molecular Probes). Τα κύτταρα που

καλλιεργήθηκαν σε 0% FBS (0%) χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Μέσες τιμές \pm S.E.M. αποτυπωμένες. Στατιστική σημασία: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ ανάμεσα στα δείγματα ελέγχου (C) και τις αντίστοιχες επεξεργασίες.

Επομένως, υποθέσαμε ότι η εκκρινόμενη λουμικήνη μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα του ενδογενούς TGF- β 2 στην ρύθμιση της προσκόλλησης των κυττάρων Saos 2 που εξαρτάται από την FN. Η προσκολλητική ικανότητα των ανεπαρκή σε λουμικήνη κυττάρων Saos 2 που επώαστηκαν με το ειδικό αντίσωμα του TGF- β 2 δεν αυξήθηκε συγκριτικά με τα κύτταρα siScr που επώαστηκαν με το anti-TGF- β 2 (Εικόνα 3.3). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η εκκρινόμενη λουμικήνη ρυθμίζει τη δραστηριότητα του TGF- β 2 ελέγχοντας την προσκολλητική ικανότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος Saos 2 πάνω στο υπόστρωμα της FN.

Εικόνα 3.3



Εικόνα 3.3: Η επίδραση της λουμικήνης στη δράση του ενδογενούς TGF- β 2. 48 ώρες μετά τη επιμόλυνση, κύτταρα ελέγχου (C), τα siLum και siScr κύτταρα Saos 2 επώαστηκαν με το anti-

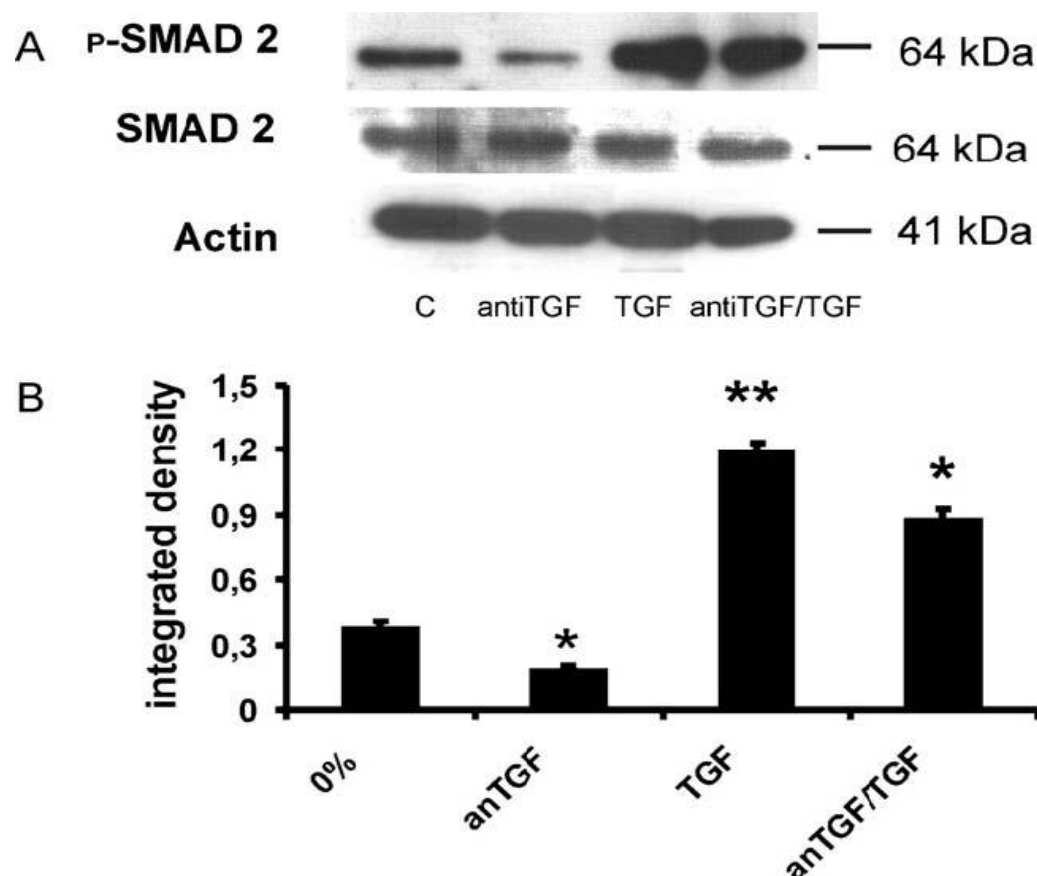
*TGF-β2 (0.5 μg/ml), συλλέχθηκαν κι επανακαλλιιεργήθηκαν (10^4 cells) για 30 λεπτά σε πλάκες 96 κυψελών επιστρωμένες με την FN ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας CyQUANT. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Μέσες τιμές \pm S.E.M. αποτυπωμένες. Στατιστική σημασία: * $p \leq 0.05$: ** $p \leq 0.01$ ανάμεσα στα δείγματα ελέγχου (C) και τις αντίστοιχες επεξεργασίες.*

3.4 Επίδραση του ενδογενούς TGF-β2 στην ενεργοποίηση της Smad2 των κυττάρων του οστεοσαρκώματος

Η κύρια ισομορφή των Smad που δραστηριοποιείται με τον υποδοχέα TGF-β στα κύτταρα Saos 2 έχει προσδιοριστεί ως η Smad 2 (Yuetal., 2004). Επομένως, εξετάστηκε ο ρόλος του ενδογενούς TGF-β2 στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Smad 2 με επώαση των κυττάρων Saos 2 με το ειδικό αντίσωμα anti-TGF-β2 για 48 ώρες. Σε αυτό το σημείο η έκφραση της Smad 2 και τα επίπεδα έκφρασης της p-Smad μελετήθηκαν με την χρήση των ειδικών αντισωμάτων anti-Smad 2 και anti-phospho-Smad 2. Οι πρωτεϊνικές ποσότητες διορθώθηκαν ως προς την έκφραση της ακτίνης των ίδιων δειγμάτων. Η ανάλυση της ανοσοαποτύπωσης κατά Western έδειξε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Smad 2 (ειδική ζώνη με μοριακή μάζα 65 kDa) δεν επηρεάστηκε από τα πεπτίδιο anti-TGF-β2 (Εικόνα 3.4A). Από την άλλη πλευρά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4A, τα βασικά επίπεδα φωσφορυλίωσης της Smad 2 (ειδική ζώνη με μοριακή μάζα 60 kDa) ρυθμίστηκαν αρνητικά ($p \leq 0.05$) όταν ο ενδογενής TGF-β2 ουδετεροποιήθηκε με το ειδικό αντίσωμα anti-TGF-β2 δείχνοντας την ύπαρξη ενός αυτοκρινούς μονοπατιού του TGF-β στα κύτταρα του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος Saos 2. Σε επόμενα πειράματα, ο εξωγενώς προστιθέμενος TGF-β2 ενίσχυσε την ενεργοποίηση της Smad 2 ($p \leq 0.01$) ενώ

η εξαρτώμενη από τον TGF-β2 φωσφορυλίωση της Smad 2 ουδετεροποιήθηκε μερικώς από τη δράση του anti-TGF-β2 όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με ένα μείγμα από TGF-β2/anti-TGF-β2, (Εικόνα3.4A και B). Η πυκνομετρική ανάλυση των αντίστοιχων ζωνών παρουσιάζεται στην Εικόνα3.4B.

Εικόνα 3.4

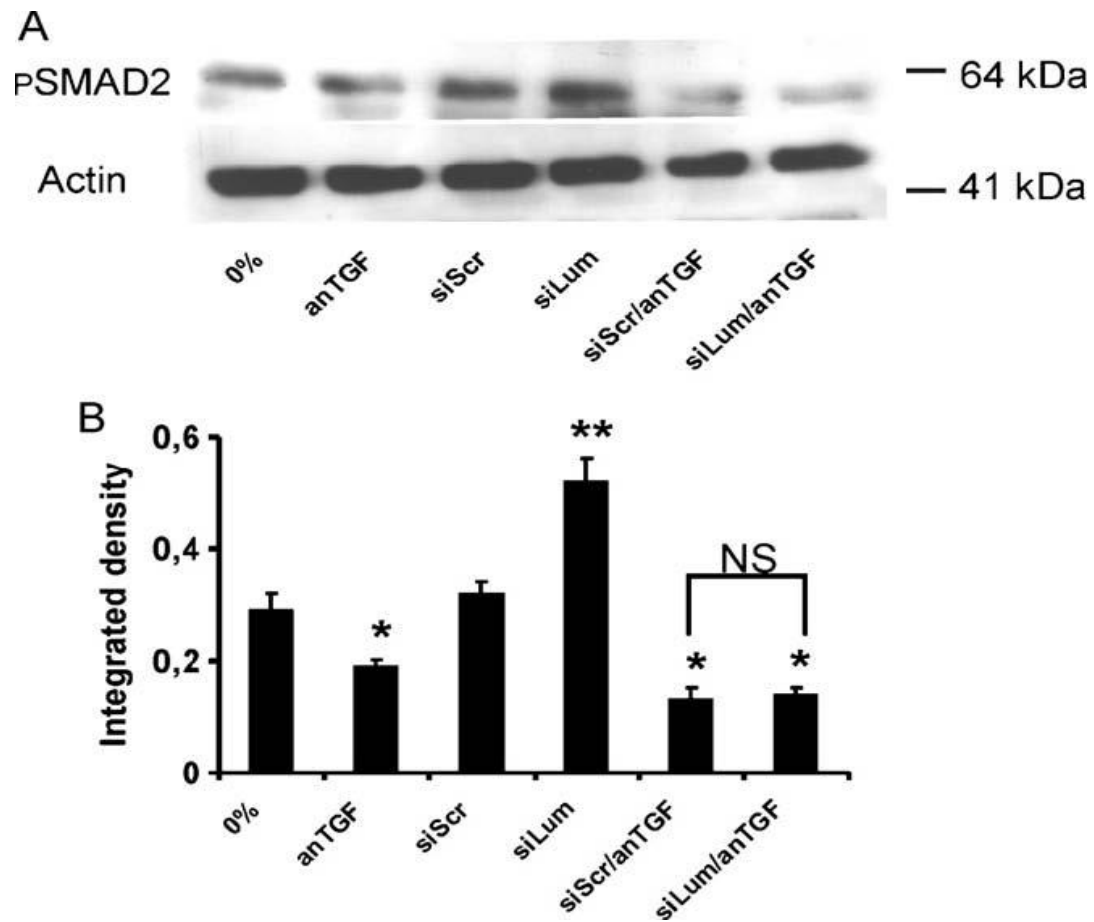


Εικόνα 3.4: Επίδραση του ενδογενούς TGF-β2 στην ενεργοποίηση της Smad στα κύτταρα οστεοσαρκώματος. (A) τα κύτταρα Saos 2 που επώαστηκαν με τον TGF-β2 (10 ng/ml), το anti-TGF-β2 (0.5 μg/ml) ή τον συνδυασμό τους για 48 ώρες συλλέχθηκαν και ίσες ποσότητες πρωτεΐνης που εξήχθη από τα κύτταρα αποτυπώθηκαν με αντισώματα για την φωσφορυλιωμένη Smad 2 (pSmad) και την ολική Smad 2. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης παρουσιάζονται. (B) Οι ζώνες της ειδικής πρωτεΐνης pSmad και της ολικής πρωτεΐνης Smad 2 αναλύθηκαν πυκνομετρικά και διορθώθηκαν ως προς την έκφραση της ακτίνης. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Στατιστική σημασία: * $p \leq 0.05$: ** $p \leq 0.01$ ανάμεσα στο δείγμα ελέγχου (0%) και τις αντίστοιχες επεξεργασίες.

3.5 Η λουμικήνη επηρεάζει την εξαρτώμενη από τον ενδογενή TGF-β ενεργοποίηση της Smad 2

Έχουμε αποδείξει ότι η λουμικήνη συμμετέχει στη ρύθμιση της σηματοδότησης της Smad σε κύτταρα Saos 2 δείχνοντας ότι τα ανεπαρκή σε λουμικήνη κύτταρα Saos 2 είχαν υψηλότερα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Smad 2 συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου siScr. Επομένως, στην συνέχεια της μελέτης εξετάστηκε η πιθανή συμμετοχή της λουμικήνης στην ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από τον ενδογενή TGF-β πρωτεΐνης Smad 2. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Smad 2 (pSmad) εξετάστηκαν σε siScr κύτταρα Saos 2 με την χρήση αντισωμάτων ειδικά για Smad 2 και της p-Smad 2. Το πιο σημαντικό αποτέλεσμα ήταν ότι δεν υπήρξαν διαφορές στη ενεργοποίηση της pSmad 2 ανάμεσα στα κύτταρα siScr και siLum που επώαστηκαν με το anti-TGF-β2 ($p = NS$) υποδεικνύοντας ότι η λουμικήνη ρυθμίζει την ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από τον ενδογενή TGF-β2 Smad 2 σε κύτταρα Saos 2 (Εικόνα 3.5A και B). Η πυκνομετρική ανάλυση των αντίστοιχων ζωνών παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.5B.

Εικόνα 3.5

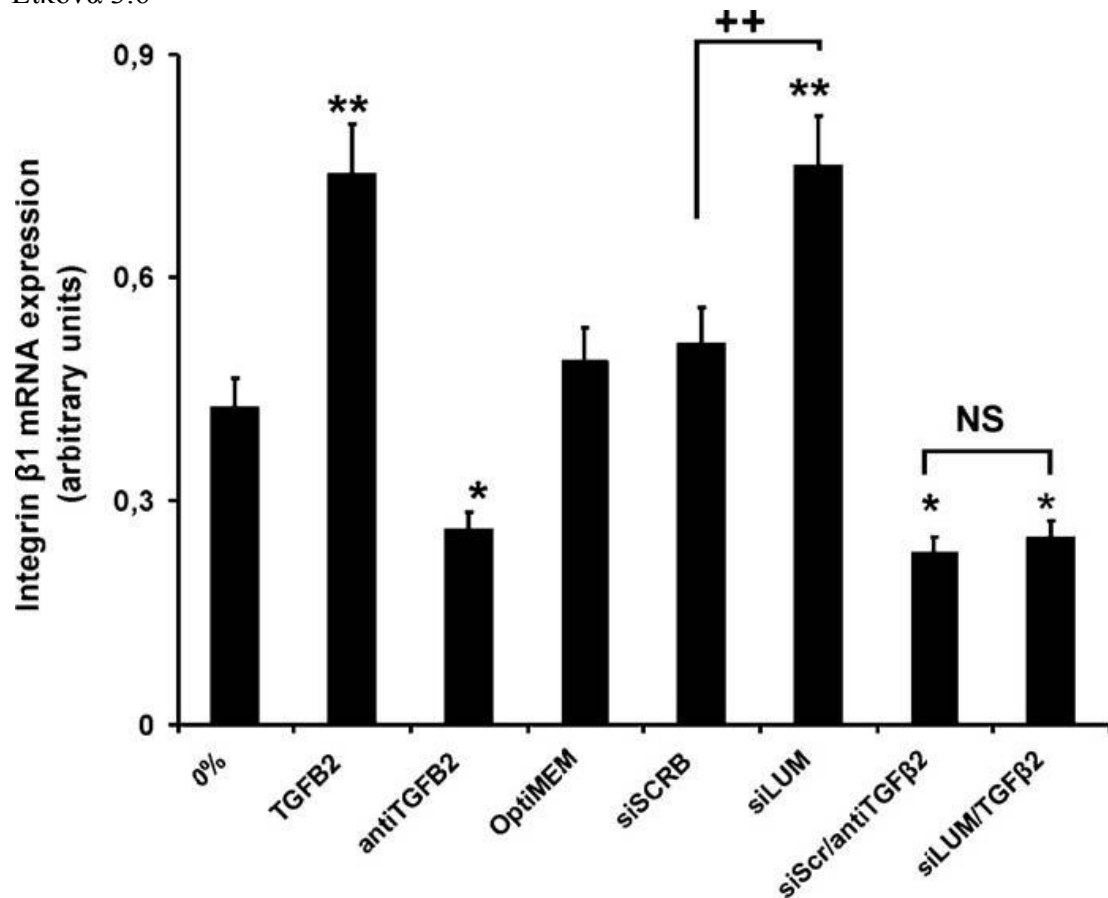


Εικόνα 3.5: Η επίδραση της λουμικάνης στην ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από τον ενδογενή TGF- β 2 πρωτεΐνης Smad 2. (A) 48 ώρες μετά τη επιμόλυνση, τα επιμολυσμένα με siRNA λουμικάνης Saos 2 κύτταρα, τα siScr και τα κύτταρα ελέγχου (0%) επωάστηκαν με το anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml) συλλέχθηκαν και ίσες ποσότητες πρωτεΐνης που εξήχθη από τα κύτταρα αποτυπώθηκαν με αντισώματα για την φωσφορυλιωμένη Smad 2 (pSmad) και την ολική Smad 2. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης παρουσιάζονται. (B) Οι ζώνες της ειδικής πρωτεΐνης pSmad 2 και της ολικής πρωτεΐνης Smad 2 αναλύθηκαν πυκνομετρικά και διορθώθηκαν ως προς την έκφραση της α -actin. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Στατιστική σημασία: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ ανάμεσα στο δείγμα ελέγχου και τις αντίστοιχες επεξεργασίες.

3.6 Η λουμικάνη μεταβάλλει την έκφραση της ιντεγκρίνης β1 ρυθμίζοντας τη σηματοδότηση του TGF-β

Οι ιντεγκρίνες, ιδιαίτερα η β1, αποτελούν σημαντικούς υποδοχείς της μεμβράνης των οστεοβλαστών συμμετέχοντας στην προσκόλληση σε υπόστρωμα FN (Nakayamadaetal., 2003). Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι ο TGF-β2 ενισχύει την έκφραση της ιντεγκρίνης β1 αυξάνοντας την προσκόλληση των κυττάρων HELC (Yaoetal., 2007), ενώ ο TGF-β1 βρέθηκε ότι ρυθμίζει θετικά την έκφραση της ιντεγκρίνης β1 στα κύτταρα MG-63 του οστεοσαρκώματος (Laietal., 2000). Επομένως, εξετάστηκε αν η σηματοδότηση του TGF-β2 επηρεάζει την έκφραση της ιντεγκρίνης β1 και στα κύτταρα της παρούσας μελέτης (Saos 2). Βρέθηκε ότι τα κύτταρα Saos 2 που επώαστηκαν με τον TGF-β2 αύξησαν την έκφραση του mRNA της ιντεγκρίνης β1 (Εικόνα 3.6) ($p \leq 0.01$). Αντιθέτως, η επεξεργασία με το anti-TGF-β2 IG μείωσε την έκφραση της ιντεγκρίνης β1 στα κύτταρα Saos 2 ($p \leq 0.05$). Για να εξεταστεί ο υποτιθέμενος ρόλος της ρύθμισης της έκφρασης της ιντεγκρίνης β1 από την εξαρτώμενη από τον TGF-β2 λουμικάνη, αναλύθηκαν για την έκφραση της ιντεγκρίνης β1 κύτταρα που ήταν ανεπαρκή σε λουμικάνη (siLum). Τα κύτταρα siLum βρέθηκε ότι είχαν μεγαλύτερη έκφραση ιντεγκρίνης β1 (41%) συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου siScr (Εικόνα 3.6) ($p \leq 0.01$). Όταν η σηματοδότηση του ενδογενούς TGF-β2 ουδετεροποιήθηκε με την προσθήκη του ειδικού αντισώματος TGF-β2, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση της λουμικάνης στην έκφραση της ιντεγκρίνης β1 (Εικόνα 3.6) ($p = NS$). Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η λουμικάνη αυξάνει την έκφραση της ιντεγκρίνης β1 στη κυτταρική σειρά του οστεοσαρκώματος Saos 2 μέσω της ρύθμισης της σηματοδότησης του TGF-β2.

Εικόνα 3.6

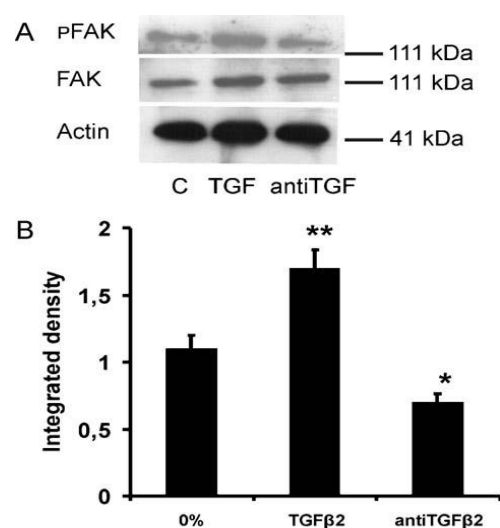


Εικόνα 3.6: Επίδραση της σηματοδότησης του TGF- β 2 στην έκφραση της ιντεγκρίνης β 1 και ο ρόλος της λουμικάνης. Σαράντα οκτώ ώρες μετά τη επιμόλυνση, κύτταρα επιμολυσμένα με siRNA λουμικάνης (siLUM), κύτταρα που επωάστηκαν με τον TGF- β 2 (10 ng/ml), κύτταρα αρνητικού ελέγχου (siSCRB, OptiMEM, 0%), κύτταρα με τον anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml), μη επιμολυσμένα κύτταρα με τον anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml) και μη επιμολυσμένα κύτταρα με τον anti-TGF- β 2 (10 μ g/ml) συλλέχθηκαν και το RNA απομονώθηκε. Η έκφραση του mRNA της ιντεγκρίνης β 1 προσδιορίστηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου χρησιμοποιώντας για το γονίδιο της ιντεγκρίνης β 1. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν κι εκφράζονται ως αυθαίρετες μονάδες. Στατιστική σημασία: * $p \leq 0.05$: ** $p \leq 0.01$ ανάμεσα στον έλεγχο και τις αντίστοιχες επεξεργασίες. ++ $p \leq 0.01$ ανάμεσα στις επεξεργασίες με siScr και siLum.

3.7 Δράση του TGF-β2 στη φωσφορυλίωση της FAK (397) κινάσης

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι ο TGF-β2 ενισχύει την κυτταρική προσκόλληση σε υπόστρωμα FN ρυθμίζοντας θετικά τη φωσφορυλίωση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης (FAK-397) (Yao et al., 2007). Η σύνδεση της ιντεγκρίνης σε συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας αυξάνει την φωσφορυλίωση της τυροσίνης της FAK (pFAK). Επομένως, σε αυτήν τη μελέτη εξετάστηκε η πιθανή επίδραση του TGF-β2 στη ενεργοποίηση της pFAK. Τα κύτταρα Saos 2 επωάστηκαν με TGF-β2 (10 ng/ml) ή με το αντίσωμα anti-TGF-β2 (0.5 μg/ml) για 24 και 48 ώρες και διερευνήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση των FAK και pFAK με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Εικόνα 3.7A και B). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο TGF-β2 ενίσχυσε στατιστικά σημαντικά τη δραστηριότητα της FAK ($p \leq 0.01$) σε αντίθεση με το αντίσωμα anti-TGF-β2 που εμπόδισε τη φωσφορυλίωση της στο σημείο της τυροσίνης 397 ($p \leq 0.05$) (Εικόνα 3.7). Επομένως, τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση της FAK στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος Saos 2 εξαρτάται από τον TGF-β2.

Εικόνα 3.7

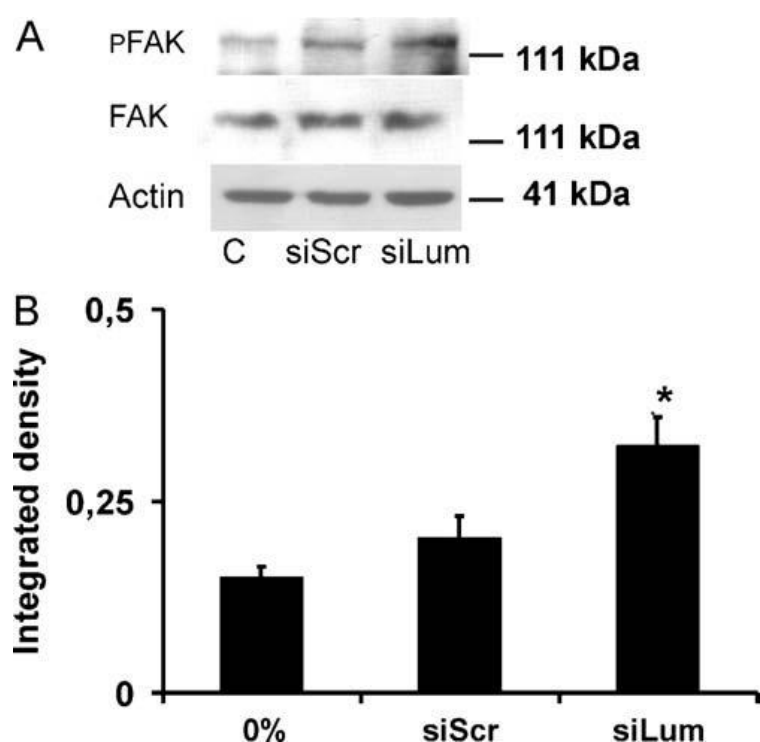


Εικόνα 3.7: Η επίδραση της σηματοδότησης του TGF-β2 στην έκφραση της ολικής πρωτεΐνης FAK των κυττάρων Saos 2 και στη φωσφορυλίωση της FAK (Y397). (A) Τα κύτταρα Saos 2 υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το anti-TGF-β2 (0.5 μg/ml) και τον TGF-β2 (10 ng/ml) για 48 ώρες. Ακολούθως συλλέχθηκαν και ίσες ποσότητες πρωτεΐνης που εξήχθη από κύτταρα αποτυπώθηκαν στη φωσφορυλιωμένη FAK (Y397) (pFAK) και την ολική FAK (FAK) αξιοποιώντας ειδικά αντισώματα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Αντιπροσωπευτικές κηλίδες αποτύπωσης παρουσιάζονται. (B) Οι ζώνες των πρωτεϊνών pFAK και FAK αναλύθηκαν πυκνομετρικά και προσαρμόστηκαν στην ακτίνη. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Στατιστική σημασία: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

3.8 Η επίδραση της λουμικάνης στη φωσφορυλίωση της FAK κινάσης

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της λουμικάνης στην ενεργοποίηση της FAK κινάσης. Τα ελλιπή σε λουμικάνη (siLum) κύτταρα καθώς και τα κύτταρα ελέγχου siScr λύθηκαν και μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών FAK και pFAK με την χρήση ειδικών αντισωμάτων (Εικόνα 3.8A). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα ελλιπή σε λουμικάνη κύτταρα αύξησαν τη ενεργοποίηση της FAK (397) ($p \leq 0.05$) (Εικόνα 3.8A και B). Επομένως, τα αποτελέσματα της μελέτης αποδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση της κινάσης FAK (pFAK-Y397) στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος Saos 2 είναι αντιστρόφως ανάλογη με την έκφραση της λουμικάνης.

Εικόνα 3.8

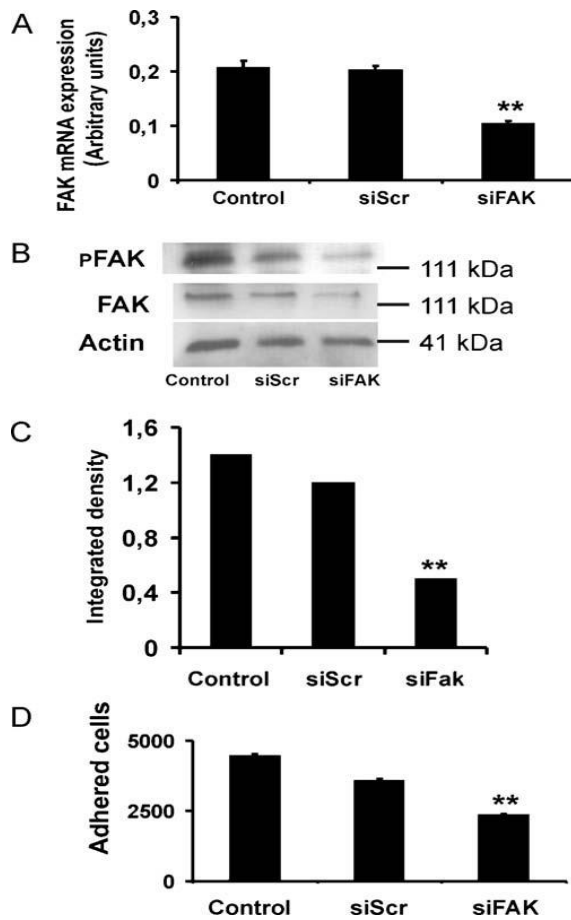


Εικόνα 3.8. Επίδραση της λουμικάνης στην έκφραση και ενεργοποίηση της FAK. (A) Αναλύθηκαν ίσες ποσότητες δειγμάτων πρωτεΐνης των 0%medium, siScr και siLum για την έκφραση φωσφορυλιωμένης και ολικής (pFAK και FAK) με ειδικά αντισώματα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης. (B) Οι ζώνες των πρωτεϊνών pFAK και FAK αναλύθηκαν πυκνομετρικά και προσαρμόστηκαν σε σχέση με την ακτίνη. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Στατιστική σημασία: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

3.9 Ο ρόλος της FAK κινάσης στην κυτταρική προσκόλληση του οστεοσαρκώματος.

Για την περαιτέρω διερεύνηση της συμμετοχής της FAK σηματοδότησης στην ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων του οστεοσαρκώματος πραγματοποιήθηκε καταστολή της έκφρασης της FAK κινάσης σε κύτταρα Saos 2 με την χρήση siRNAs (siFAK) σχεδιασμένα ειδικά από τους Honget., al (2006). Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.9A-C, η επιμόλυνση των κυττάρων Saos 2 με siFAK για 48 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της FAK σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης ($p \leq 0.01$). Τα ελλιπή σε FAK κύτταρα Saos 2, συλλέχθηκαν στις 48 ώρες μετά την επιμόλυνση και εκτιμήθηκε η προσκολλητική τους ικανότητα. Η αναστολή της έκφρασης της FAK μείωσε σημαντικά την προσκολλητική τους ικανότητα (36%) συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου siScr ($p \leq 0.01$) (Εικόνα 3.9D). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η κυτταρική προσκόλληση του οστεοσαρκώματος είναι αντιστρόφως ανάλογη με την έκφραση της FAK και τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της (Εικόνα 3.9D).

Εικόνα 3.9



Εικόνα 3.9. Ο ρόλος της FAK στην κυτταρική προσκόλληση του οστεοσαρκώματος. (A) Τα κύτταρα Saos 2 επιμόλυνθηκαν με το επεμβατικό RNA εναντίον της FAK (siFAK) και με siRNA (siScr) ως δείγμα αρνητικού ελέγχου. Η μείωση της έκφρασης του mRNA της FAK επιβεβαιώθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου στο χρονικό σημείο των 48 ωρών (B) Κυτταρικά εκχυλίσματα δειγμάτων Control, siFAK και siScr αναλύθηκαν για την πρωτεϊνική έκφραση της FAK. (C) Οι ζώνες της πρωτεΐνης FAK στα διαφορετικά δείγματα αναλύθηκαν πυκνομετρικά και προσαρμόστηκαν σε σχέση με την ακτίνη. (D) Η επίδραση του siFAK στην κυτταρική προσκόλληση. 48 ώρες μετά τη επιμόλυνση, τα ελλιπή σε FAK Saos 2 κύτταρα (siFAK) και τα κύτταρα ελέγχου (control, siScr) συλλέχθηκαν και καλλιεργήθηκαν (10^5 κύτταρα) για 30 λεπτά σε πλάκες 96 κυψελών επιστρωμένες με FN ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων προσδιορίστηκε με την χρήση CyQUANT. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Μέσες τιμές \pm S.E.M. παρουσιάζονται. Στατιστική σημασία: $**p \leq 0.01$.

4. Αποτελέσματα

4.1 Περίληψη

Η διγλυκάνη (BGN) αποτελεί μέλος της κατηγορίας I των SLRP οι οποίες περιέχουν δύο αλυσίδες θειϊκής χονδροϊτίνης ή θειϊκής δερματάνης συνδεδεμένες ομοιοπολικά στο N-άκρο (MacEwan et al., 2006). Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει τον ρόλο της διγλυκάνης στην βιολογία του καρκίνου και ειδικότερα στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της μετανάστευσης, της κινητικότητας και στη δημιουργία φλεγμονής (Neill et al., 2015, Schaefer et al., 1917). Η διγλυκάνη, επιπρόσθετα, έχει εμπλακεί στην παθογένεση του οστεοσαρκώματος, ενός πρωτογενή καρκινικού όγκου των οστών (Nikitovic et al., 2012, Nikitovic et al., 2008).

Προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου μας έχουν περιγράψει την δράση τμήματος της παραθορμόνης PTH (1-34) και του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών 2 (FGF-2) στην μετανάστευση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος μέσω ενός καινούριου συνεργατικού μηχανισμού που αφορά την ρύθμιση της έκφρασης της διγλυκάνης στον εξωκυττάριο χώρο (Datsis et al., 2011, Nikitovic et al., 2016). Σηματοδοτικά μόρια κατάντι της διγλυκάνης έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος καθώς και την πρόγνωση του. Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι η μείωση του υποδοχέα LRP6 (low-density lipoprotein receptor related protein 6) του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/b-catenin, με την χρήση microRNA-183 (miR-183), ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό και την διήθηση κυττάρων του ινοσαρκώματος (Yang et al., 2018). Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Wnt θεωρείται ένα από τα κύρια μονοπάτια της παθογένεσης του καρκίνου του οστεοσαρκώματος (Cai et al., 2014). Επιπρόσθετα, το μονοπάτι των Wnt/b-catenin αποτελεί θεραπευτικό στόχο στο ινοσάρκωμα, καθώς η

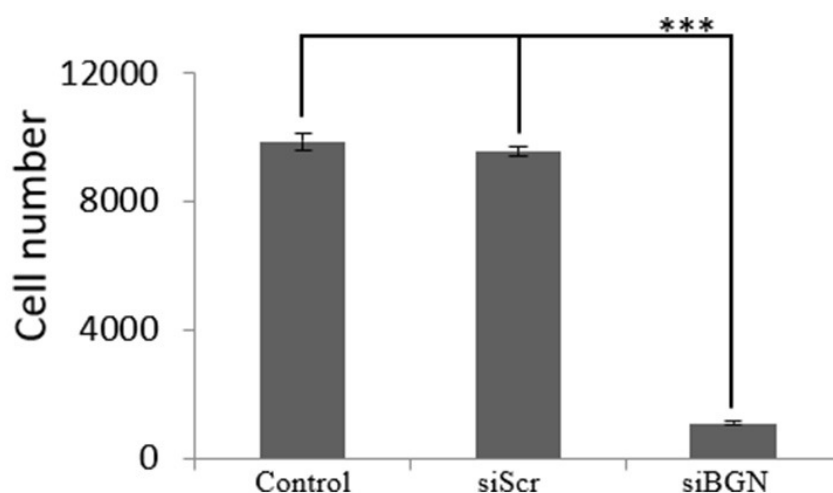
καταστολή του με την χρήση ρεσβερατρόλης έχει αντι-καρκινική δράση (Xie et al., 2017). Άλλες SLRPs έχει επίσης δειχθεί ότι δρουν παρόμοια σε διαφορετικές λειτουργίες των κυττάρων του οστεοσαρκώματος όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση ή η προσκόλληση (Zafiropoulos et al., 2008, Nikitovic et al., 2008, Nikitovic et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη, βάση της σημασίας της διγλυκάνης στην ρύθμιση της σηματοδότησης των λειτουργιών των κυττάρων οστεοβλαστικής προέλευσης, εξετάσαμε την δράση της στον πολλαπλασιασμό του οστεοσαρκώματος καθώς και στα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται σε αυτόν. Τα αποτελέσματά μας απέδειξαν ότι η διγλυκάνη μέσω του LPR6/b-catenin/IGFIR μονοπατιού ρυθμίζει θετικά την ανάπτυξη των MG63 κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

4.2 Ο ρόλος της διγλυκάνης στον επαγόμενο από τον IGF-I πολλαπλασιασμό των MG63 κυττάρων του οστεοσαρκώματος

Προηγούμενη δημοσίευση του εργαστηρίου μας έχει αποδείξει ότι η διγλυκάνη αποτελεί σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα της μεταναστευτικής ικανότητας κυττάρων του οστεοσαρκώματος (Datsis et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε ο πιθανός ρόλος της διγλυκάνης στον πολλαπλασιασμό του οστεοσαρκώματος. Επομένως, χρησιμοποιήθηκε αρχικά ένα siRNA ειδικό για την μείωση του γονιδίου της διγλυκάνης (siBGN) και πραγματοποιήθηκε πείραμα παρεμβολής RNA (RNA interference), το οποίο είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης της διγλυκάνης σε mRNA αλλά και σε πρωτεϊνικό, όπως είχε δειχθεί και σε προηγούμενη δημοσίευση του εργαστηρίου για τα MG63 κύτταρα (Datsis et al., 2011). Ο πολλαπλασιασμός των ελλειπή σε διγλυκάνη κυττάρων, των αρχικών κυττάρων καθώς και των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικά δείγματα ελέγχου, επιμολυσμένα

με siScr (siScrambled) μετρήθηκε με το kit πολλαπλασιασμού CyQUANT. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια στατιστικά σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των ελλειπή σε διγλυκάνη κυττάρων ($p \leq 0.001$) σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 4.1).

Εικόνα 4.1



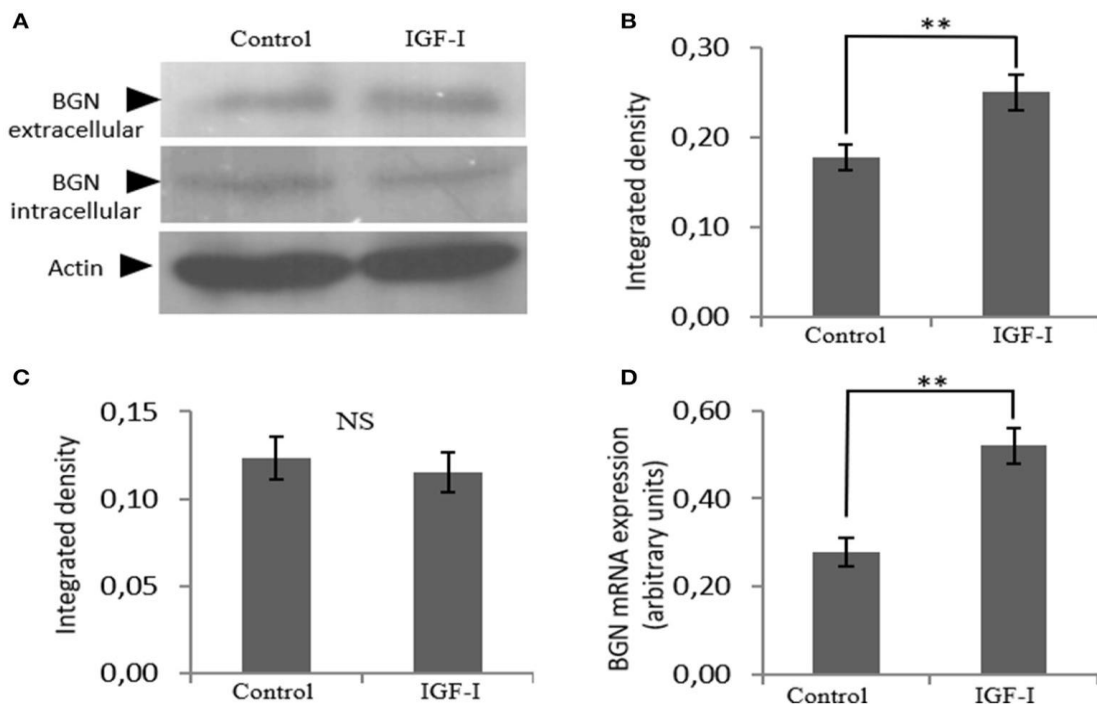
Εικόνα 4.1: Δράση του siBGN στον πολλαπλασιασμό των MG63 κυττάρων. Τα MG63 κύτταρα αποκολλήθηκαν και στρώθηκαν (3500 κύτταρα/οπή) σε πιάτα καλλιέργειας 96-οπών. Τα κύτταρα, στο πιάτο, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό απουσία ορού και επιμολύνθηκαν είτε με siRNAs εναντίον της διγλυκάνης (siBGN) ή siRNAs αρνητικού ελέγχου, scrambled siRNAs (siScr). Μετά από 48 ώρες επώασης ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας CyQUANT. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Μέσες τιμές \pm S.E.M. αποτυπωμένες. Στατιστική σημασία: $**p \leq 0.001$ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

4.3 Δράση του IGF-I στην ρύθμιση της έκφρασης της διγλυκάνης

Για να μπορέσουμε να εντοπίσουμε πιθανά μόρια αλληλεπίδρασης ή διαμεσολάβησης της δράσης της διγλυκάνης μελετήσαμε την επίδραση σημαντικών μορίων στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού του οστεοσαρκώματος και πως αυτά μεταβάλουν την έκφραση της διγλυκάνης. Στα πειράματα αυτής της μελέτης, ο αυξητικός παράγοντας

IGF-I εντοπίστηκε να ρυθμίζει την έκφραση της διγλυκάνης. Επώαση των MG63 κυττάρων με IGF-I (10 ng/mL) για 48 h έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της εκκρινόμενης διγλυκάνης ($p \leq 0.01$) με την χρήση ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε δείγματα υπερκειμένων αλλά και κυττάρων (Εικόνα 4.2). Έγινε επίσης χρήση αντισώματος εναντίον της ακτίνης στα δείγματα των υπερκειμένων για να αποκλειστεί η επιμόλυνση από πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. Τα επίπεδα mRNA της διγλυκάνης αυξήθηκαν επίσης στατιστικά σημαντικά ($p \leq 0.01$) με την προσθήκη IGF-I (10 ng/mL) (Εικόνα 4.2D). Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που απέδειξαν την ρύθμιση της έκφρασης της διγλυκάνης από τον IGF-I σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές οστεοβλαστικής προέλευσης (D' Avis et al., 1997).

Εικόνα 4.2

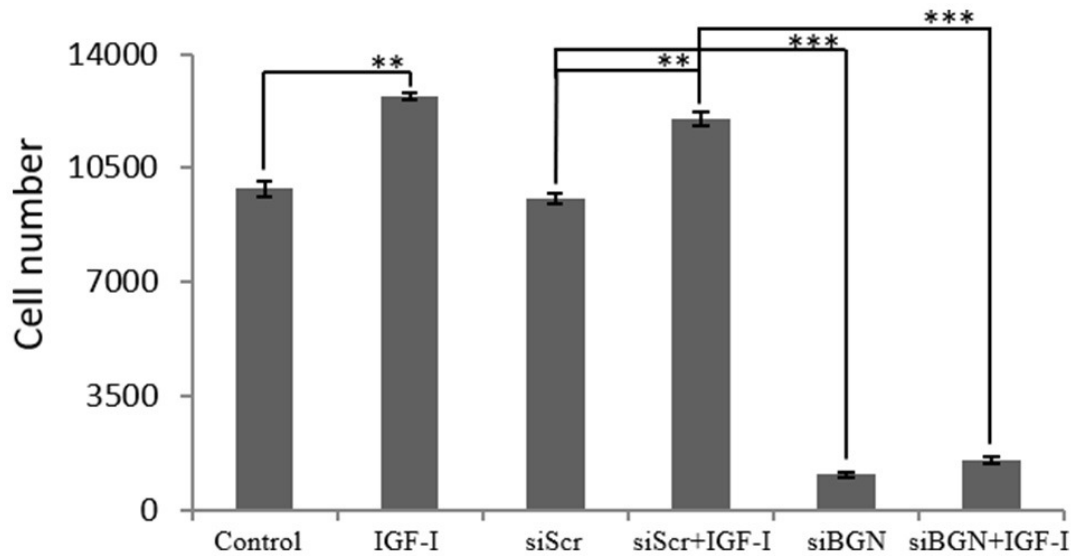


Εικόνα 4.2: Δράση του IGF-I στα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της διγλυκάνης. (A) Έκφραση της εκκρινόμενης (extracellular) και της ενδοκυτταρικής (intracellular) διγλυκάνης (BGN) σε κύτταρα με επώαση σε θρεπτικό απουσία ορού (control) και σε κύτταρα με προσθήκη IGF-I (10ng/ml), με την χρήση ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Ανάλυση της εκκρινόμενης BGN

πρωτεϊνική μπάντα (100KDa γλυκοζυλιωμένη πρωτεογλυκάνη) (B) και της ενδοκυτταρικής BGN πρωτεϊνική μπάντα (45KDa πρωτεϊνικός κορμός) (C) ως προς την έκφραση της ακτίνης. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης παρουσιάζονται. (D) Ανάλυση επιπέδων mRNA της διγλυκάνης σε MG63 κύτταρα μετά από προσθήκη IGF-I (10ng/ml) για 48 ώρες με την χρήση PCR-πραγματικού χρόνου και με ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο της BGN ως προς την έκφραση του GAPDH. Μέσες τιμές \pm S.E.M. αποτυπωμένες. Στατιστική σημασία: $**p \leq 0.01$ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του IGF-I/IGF-IR είναι ρυθμιστής των αναβολικών λειτουργιών των οστών και προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει τον ρόλο του στον πολλαπλασιασμό του οστεοσαρκώματος (Pirkanen et al., 1993). Σε αυτήν την μελέτη θελήσαμε να εξακριβώσουμε την δράση του IGF-I/IGF-IR στην ανάπτυξη των MG63 κυττάρων και την πιθανή συμμετοχή της διγλυκάνης. Επώαση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος με IGF-I (10 ng/ml) προκάλεσε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στον πολλαπλασιασμό τους ($p \leq 0.01$, Εικόνα 4.3). Για να προσδιορίσουμε την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην διγλυκάνη και το μονοπάτι του IGF-I, κύτταρα ελλιπή σε διγλυκάνη (siBGN) και κύτταρα ελέγχου (επιμολυσμένα με scramblesiRNAs) (siScr) επώαστηκαν με IGF-I (10 ng/mL) για 48 h και πραγματοποιήθηκε δοκιμή πολλαπλασιασμού. Ο επαγόμενος από τον IGF-I πολλαπλασιασμός των MG63 ($p \leq 0.01$) μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ($p \leq 0.001$, Εικόνα 4.3) στα κύτταρα με μειωμένη έκφραση διγλυκάνης (siBGN). Επομένως, η διγλυκάνη συνέβαλε στατιστικά σημαντικά στην ρύθμιση του βασικού ρυθμού αλλά και του επαγόμενου από τον IGF-I πολλαπλασιασμού των MG63 κυττάρων, προτείνοντας την ύπαρξη συνεργασίας μεταξύ της biglycan και του IGF-I σηματοδοτικού μονοπατιού στην ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος.

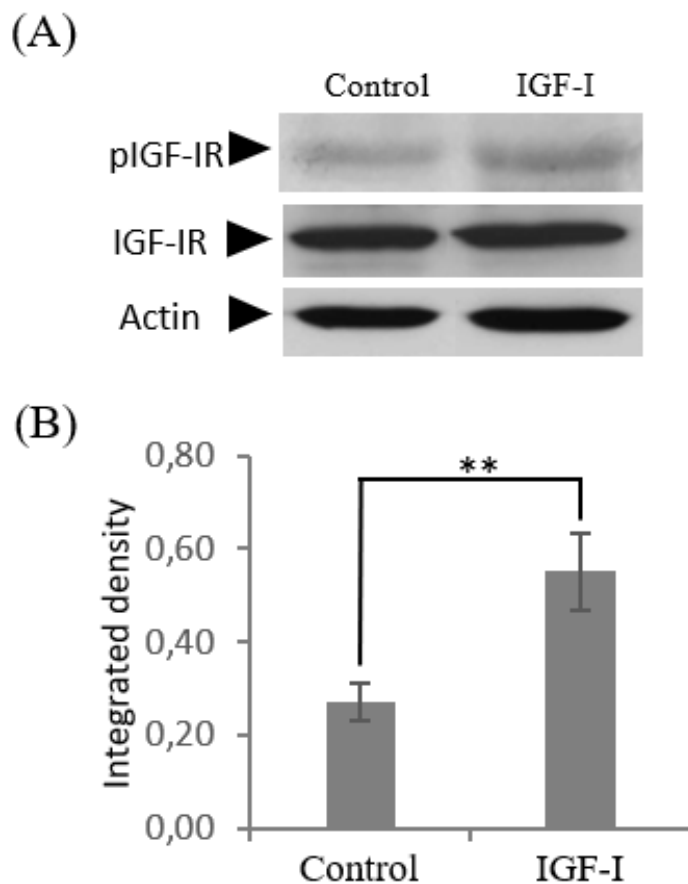
Εικόνα 4.3



Εικόνα 4.3: Δράση του IGF-I στον πολλαπλασιασμό των MG63 κυττάρων. Τα MG63 κύτταρα αποκολλήθηκαν και στρώθηκαν (3500 κύτταρα/οπή) σε πιάτα καλλιέργειας 96-οπών και πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση με siRNAs. Τα κύτταρα που επώαστηκαν με 0% θρεπτικό απουσία ορού (control), 10ng/ml IGF-I (IGF-I) και επίσης κύτταρα ελλιπή σε (siBGN) ή κύτταρα αρνητικού ελέγχου της επιμόλυνσης (siScr) που επώαστηκαν με ή χωρίς τον IGF-I, μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας CyQUANT. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Μέσες τιμές \pm S.E.M. αποτυπωμένες. Στατιστική σημασία: $***p \leq 0.001$, $**= p \leq 0.01$ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

Στη συνέχεια ερευνήθηκε ο μηχανισμός που συμμετέχει στον επαγόμενο από τον IGF-I πολλαπλασιασμό, συνυπολογίζοντας το ότι ο IGF-IR υποδοχέας είναι ο κύριος υποδοχέας δράσης του μονοπατιού του IGF-IR (25). Έγινε επιβεβαίωση της ενεργοποίησης του υποδοχέα αυτού με αρχικά πειράματα ελέγχου όπως φαίνεται στην εικόνα 4.4.

Εικόνα 4.4



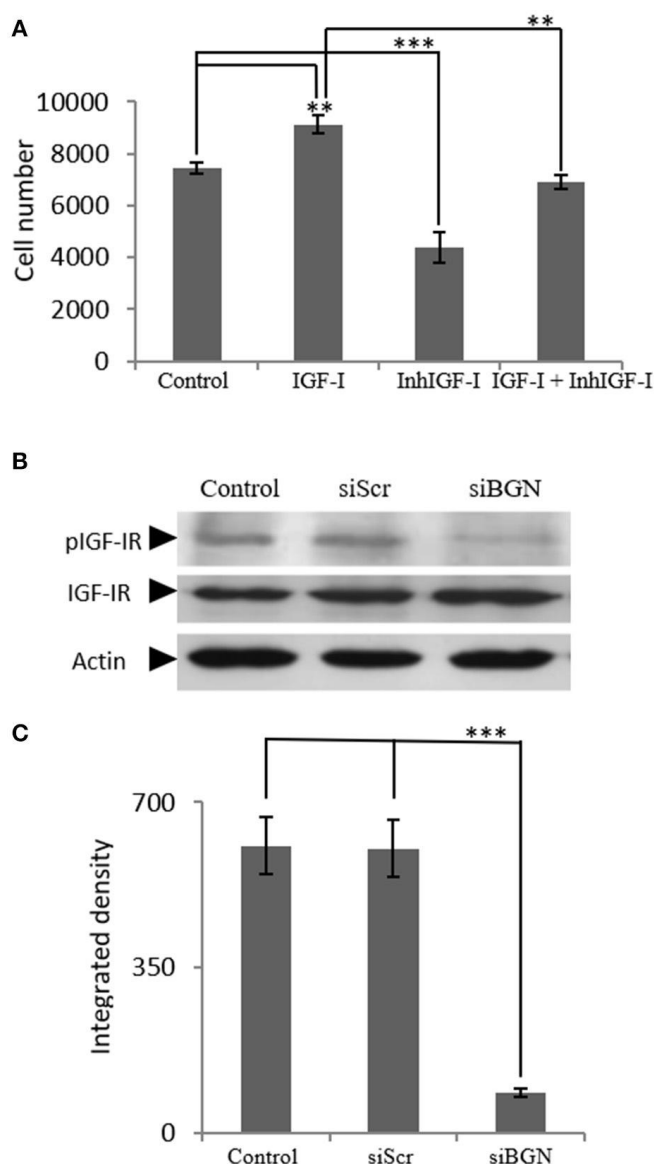
Εικόνα 4.4: Ενεργοποίηση του IGF-IR υποδοχέα από τον IGF-I στα MG-63 κύτταρα του οστεοσαρκώματος. (A) Πρωτεϊνική έκφραση του συνολικού IGF-IR (IGF-IR) και του φωσφορυλιωμένου IGF-IR (pIGF-IR) σε κύτταρα με θεραπευτικό απουσία ορού (Control) και σε κύτταρα με 10ng/ml IGF-I (IGF-I). (B) Η ανάλυση του ενεργοποιημένου IGF-IR (pIGF-IR /IGF-IR) κανονικοποιήθηκε με τα αντίστοιχα δείγματα για την έκφραση της ακτίνης. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Μέσες τιμές \pm S.E.M. αποτυπωμένες. Στατιστική σημασία: ** = $p \leq 0.01$ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

Ακολούθως MG63 κύτταρα επώαστηκαν με 1μM του ειδικού αναστολέα για τον IGF-IR (AG1024) για 48 h, με ή χωρίς την παρουσία IGF-I αυξητικού παράγοντα (10 ng/ml). Η συγκέντρωση του AG1024 που χρησιμοποιήθηκε επιλέχθηκε μετά από

πειράματα βελτιστοποίησης με επώαση των κυττάρων σε διαφορετικές συγκέντρωσης του αναστολέα. Η δοκιμή πολλαπλασιασμού έδειξε μια στατιστικά σημαντική μείωση στην βασική αλλά και στην εξαρτώμενη από τον IGF-I κυτταρική ανάπτυξη ($p \leq 0.001, p \leq 0.01$ αντίστοιχα, Εικόνα 4.5A). Τα αποτελέσματα επομένως επιβεβαιώνουν ότι ο IGF-IR υποδοχέας μεσολαβεί στα βασικά αλλά και στα επαγόμενα από τον IGF-I επίπεδα του πολλαπλασιασμού των MG63 κυττάρων του οστεοσαρκώματος. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν την σημασία της σηματοδότησης του ενδογενή IGFIR υποδοχέα στην ρύθμιση της ανάπτυξης των MG-63 κυττάρων (Εικόνα 4.5A).

Στη συνέχεια για να διερευνήσουμε τον άμεσο ρόλο της διγλυκάνης στην κατάντι σηματοδότηση του IGF-IR, μελετήθηκε η ενεργοποίηση του IGF-IR υποδοχέα. Κυτταρικά εκχυλίσματα πρωτεΐνης από siBGN και κύτταρα ελέγχου siScr, αναλύθηκαν με την χρήση αντισωμάτων εναντίων του IGF-IR υποδοχέα και του φωσφορυλιωμένου pIGFIR υποδοχέα. Όπως φαίνεται στη εικόνα 4.5B,C η ενεργοποίηση του IGF-IR αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά ($p \leq 0.01$) στα MG63 κύτταρα ελλιπή σε διγλυκάνη (siBGN) (Εικόνα 4.5B,C).

Εικόνα 4.5



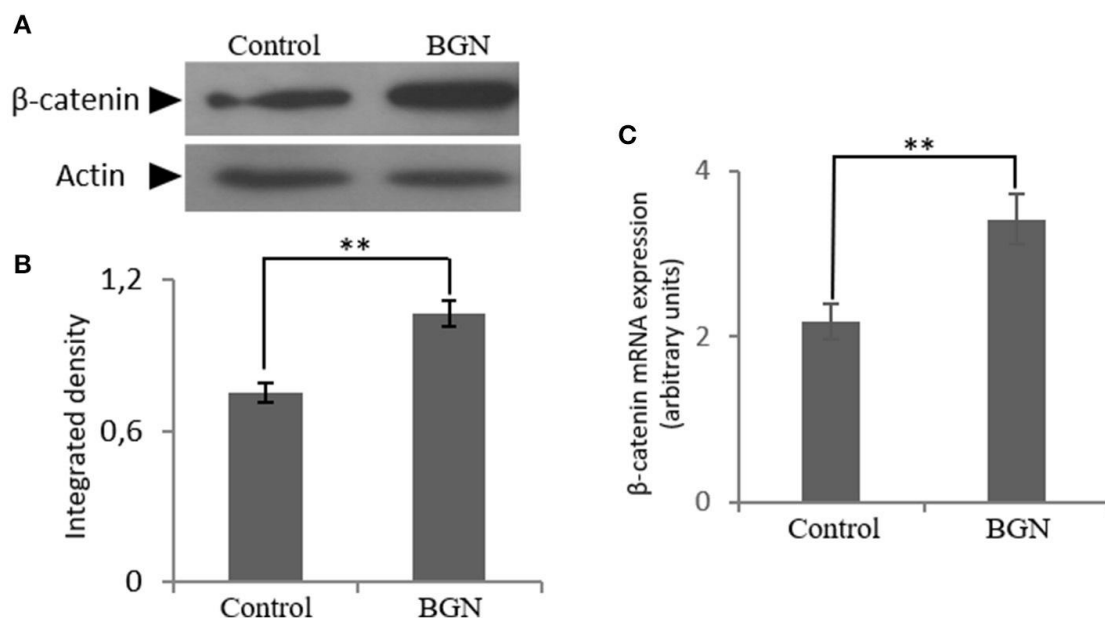
Εικόνα 4.5: Ο ρόλος του IGF-IR στον εξαρτώμενο από τον IGF-I πολλαπλασιασμό των MG63 – ρόλος της διγλυκάνης (A) Δράση του IGF αναστολέα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των MG63 κυττάρων. Τα MG63 κύτταρα αποκολλήθηκαν και στρώθηκαν (3500 κύτταρα/οπή) σε πιάτα καλλιέργειας 96-οπών. Κύτταρα που επωάστηκαν με 0% θρεπτικού απουσία ορού (control), 10ng/ml IGF-I (IGF-I), 1μM IGF-I αναστολέα (InhIGF-I) και 10ng/ml IGF-I + 1μM IGF-I αναστολέα (IGF-I+ InhIGF-I), μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας CyQUANT. (B) Δράση του siBGN στην ενεργοποίηση του IGF-IR. Η έκφραση του συνολικού IGF-IR (IGF-IR) και του φωσφορυλιωμένου IGF-IR (pIGF-IR) σε κύτταρα με θρεπτικό απουσία ορού (control) και σε κύτταρα επιμολυσμένα είτε με siRNAs (short interfering RNAs) εναντίον της διγλυκάνης (siBGN) ή siRNAs αρνητικού ελέγχου της επιμόλυνσης (siScr) αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western. (C) Ανάλυση των ενεργοποιημένων IGF-IR επιπέδων πρωτεΐνης (pIGF-IR/IGF-IR) ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα ακτίνης. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης παρουσιάζονται. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Μέσες τιμές ± S.E.M. αποτυπωμένες. Στατιστική σημασία: ** $p \leq 0.001$, **= $p \leq 0.01$ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

4.4 Ο ρόλος της διγλυκάνης στην ρύθμιση του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού (β-κατενίνη)

Για την περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο δρα η διγλυκάνη στο οστεοσάρκωμα, θελήσαμε να μελετήσουμε πιθανά μόρια αλληλεπίδρασης. Η διγλυκάνη έχει αποδειχτεί ότι ρυθμίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη με δύο τρόπους,

είτε με την μεσολάβησή της στην πρόσδεση παραγόντων ή με την ρύθμιση κατάντι σηματοδοτικών μορίων (Berrendsen et al., 2011, Xu et al., 2013, Tahir et al., 2013, Fernandes et al., 2017). Έμμεσες αλληλεπιδράσεις της β-κατενίνης με τον IGF-IR υποδοχέα και με άλλα μέλη του σηματοδοτικού μονοπατιού του IGF-I έχουν δημοσιευτεί (Xu et al., 2013, Tahir et al., 2013, Fernandes et al., 2017). Για την μελέτη της δράσης της διγλυκάνης στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος, η έκφραση της β-κατενίνης αναλύθηκε μετά από επώαση των κυττάρων με διγλυκάνη για 48 ώρες. Τα πρωτεϊνικά (ανοσοαποτύπωση κατά Western) καθώς και τα mRNA (PCR πραγματικού χρόνου) επίπεδα της β-κατενίνης αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά ($p \leq 0.01$) με την προσθήκη της διγλυκάνης (Εικόνα 4.6). Η αύξηση αυτή της πρωτεΐνης συμφωνεί με παλιότερη δημοσιευμένη μελέτη σε ανθρώπινους οστεοβλάστες (Berrendsen et al., 2011).

Εικόνα 4.6

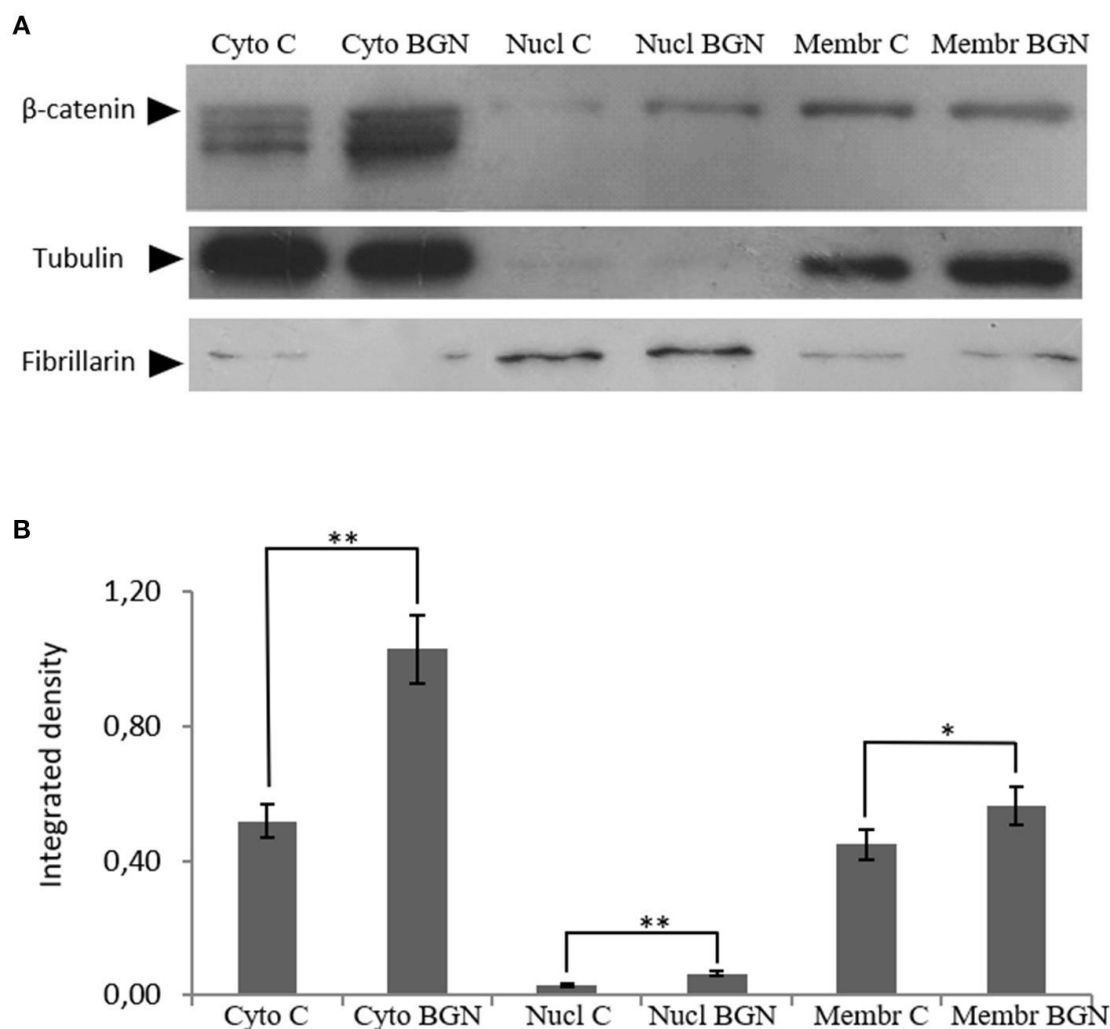


Εικόνα 4.6: Δράση της διγλυκάνης στα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της β-κατενίνης. (A) Η έκφραση της β-κατενίνης αναλύθηκε σε κύτταρα με 0% θρεπτικό απουσία ορού (control) και σε

κύτταρα με προσθήκη διγλυκάνης (BGN; 10μg/ml) με την χρήση ανοσοαποτόπωσης κατά Western. (B) Ανάλυση της πρωτεϊνικής μπάντας της β-κατενίνης έγινε ως προς την αντίστοιχη πρωτεΐνη της ακτίνης. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτόπωσης παρουσιάζονται. (C) Τα mRNA επίπεδα της β-κατενίνης σε MG63 κύτταρα και μετά από επώαση με διγλυκάνη (BGN) για 48 ώρες προσδιορίστηκαν με PCR-πραγματικού χρόνου και με ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο της β-κατενίνης ως προς την έκφραση του GAPDH. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Μέσες τιμές ± S.E.M. αποτυπωμένες. Στατιστική σημασία: ** = $p \leq 0.01$ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

Η β-κατενίνη έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που ακολουθούν μετά την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt και που επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Gonzalez-Moles et al., 2014, Aktary et al., 2016, Shang et al., 2017). Η δράση αυτή της β-κατενίνης έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδρασή της με πολλαπλά πρωτεϊνικά μόρια σε διαφορετικά τμήματα του κυττάρου, όπως η κυτταρική μεμβράνη, το κυτταρόπλασμα και ο πυρήνας. Επομένως, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του εντοπισμού της β-κατενίνης στα διαφορετικά τμήματα των MG63 κυττάρων μετά την εξωγενή προσθήκη διγλυκάνης για 48 ώρες. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4.7 η β-κατενίνη βρέθηκε να αυξάνεται στατιστικά σημαντικά στο κυτταρόπλασμα (CytoCvs. CytoB; $p \leq 0.01$), στον πυρήνα (NuclCvs. NuclB; $p \leq 0.01$) όπως και στην μεμβράνη (MembrCvs. MembrB; $p \leq 0.05$) των κυττάρων επωασμένα με την διγλυκάνη σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Άρα, η διγλυκάνη μεταβάλλει τα επίπεδα πρωτεΐνης της β-κατενίνης αλλά και τον εντοπισμό της στα MG63 κύτταρα του οστεοσαρκώματος.

Εικόνα 4.7



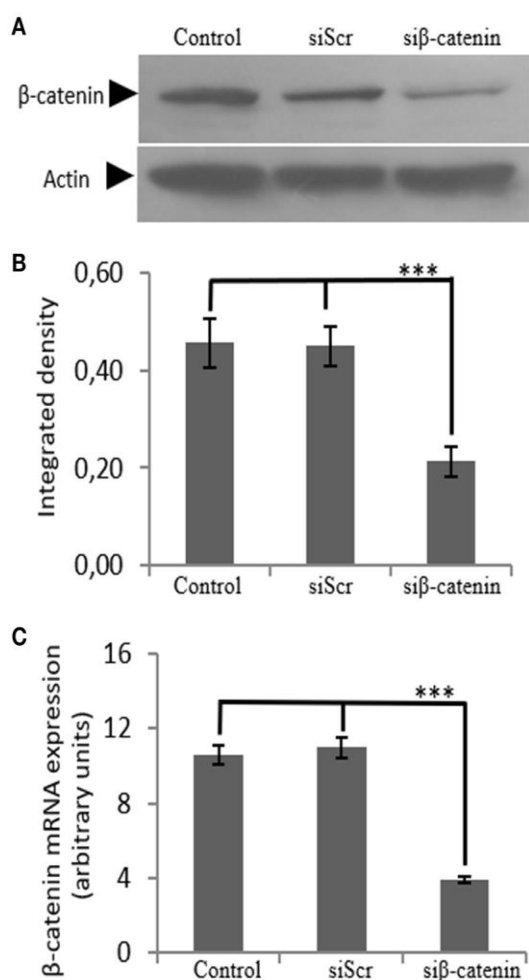
Εικόνα 4.7: Δράση της διγλυκόνης στην έκφραση της β-κατενίνης στα διαφορετικά κυτταρικά τμήματα των MG63. (A) Η έκφραση της β-κατενίνης αναλύθηκε στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων με επόαση σε 0% θρεπτικό απουσία ορού (CytoC) και σε κύτταρα με επόαση σε διγλυκόνη 10μg/ml (CytoBGN), καθώς και στον πυρήνα των κυττάρων αυτών (NuclC; NuclBGN) και στις μεμβράνες (MembrC; MembrBGN) αντίστοιχα, με ανοσοαποτύπωση κατάWestern. (B) Για την καθαρότητα των δειγμάτων απομόνωσης χρησιμοποιήθηκε η έκφραση τουμπουλίνης (tubulin) και fibrillarlin, για το κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα αντίστοιχα. Ίσες ποσότητες συνολικής πρωτεΐνης από κάθε κυτταρικό τμήμα φορτώθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης παρουσιάζονται. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο

τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Μέσες τιμές \pm S.E.M. αποτυπωμένες. Στατιστική σημασία: **= $p \leq 0.01$, * = $p \leq 0.05$ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

4.5 Η δράση της β -κατενίνης στην σηματοδότηση του IGF-1R στο οστεοσάρκωμα

Με σκοπό την μελέτη του ρόλου της β -κατενίνης στην εξαρτώμενη από την διγλυκάνη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του IGF-1R υποδοχέα, στα MG63 κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της παρεμβολής του RNA. MG63 κύτταρα επιμολύνθηκαν με siRNAs εναντίον της β -κατενίνης (si β -catenin) για 48 ώρες και η έκφρασή της σε mRNA και πρωτεϊνικό επίπεδο αναλύθηκε με την χρήση PCR-πραγματικού χρόνου και ανοσοαποτύπωση κατά Western blot, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης της β -κατενίνης σε πρωτεϊνικό ($p \leq 0.001$) και σε mRNA επίπεδο ($p \leq 0.001$, Εικόνα 4.8).

Εικόνα 4.8

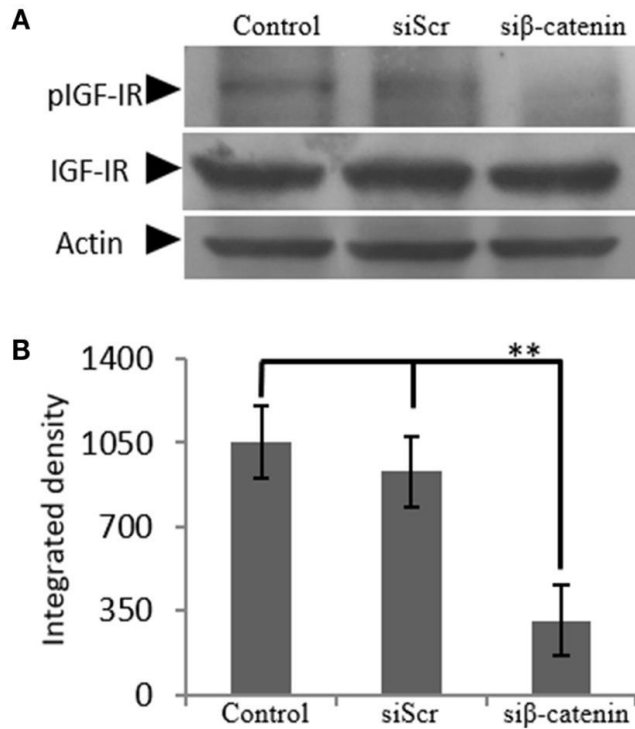


Εικόνα 4.8: Επιμόλυνση με siRNA-ειδικά για την β-κατενίνη. (A) Η έκφραση της β-κατενίνης αναλύθηκε σε κύτταρα με 0% θρεπτικό απουσία ορού (control) και σε κύτταρα επιμολυσμένα είτε με siRNAs εναντίον της β-κατενίνης (siβ-catenin) ή με scrambled siRNAs αρνητικού ελέγχου (siScr, με ανοσοαποτύπωση κατά Western. (B) Η ανάλυση της πρωτεΐνης της β-κατενίνης έγινε ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της ακτίνης. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης παρουσιάζονται. (C) Τα επίπεδα mRNA της β-κατενίνης μετρήθηκαν στα MG63 κύτταρα επωασμένα με θρεπτικό απουσία ορού (control), στα κύτταρα με siRNAs εναντίον της β-κατενίνης (siβ-catenin) ή με scrambled siRNAs αρνητικού ελέγχου (siScr), με αντίδραση PCR-πραγματικού χρόνου και με ειδικούς εκκινήτες για το γονίδιο της β-κατενίνης ως προς την έκφραση του GAPDH. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Μέσες τιμές ± S.E.M. αποτυπωμένες. Στατιστική σημασία: *** = $p \leq 0.001$ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

Τα ελλιπή σε β-κατενίνη κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθεί η πιθανή δράση του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνη στην ενεργοποίηση του IGF-IR υποδοχέα. Έτσι, αναλύθηκε η φωσφορυλίωση του IGF-IR υποδοχέα με την χρήση ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε πρωτεϊνικά δείγματα κυττάρων σε επώαση με 0% FBS θρεπτικό (C), σε κύτταρα ελλιπή σε διγλυκάνη (siβ-catenin) και σε κύτταρα ελέγχου της επιμόλυνσης scrambled siRNAs (siScr). Τα αποτελέσματα έδειξαν μια στατιστικά σημαντική μείωση στην φωσφορυλίωση του υπό μελέτη IGF-IR υποδοχέα ($p \leq 0.01$) στα κύτταρα με ελλιπή έκφραση β-κατενίνης όπως φαίνεται στην εικόνα 4.9 αποδεικνύοντας την

ρύθμιση του μονοπατιού Wnt/ β -κατενίνη από την διγλυκάνη μέσω της ενεργοποίησης του IGF-IR υποδοχέα στα MG63 κύτταρα του οστεοσαρκώματος.

Εικόνα 4.9

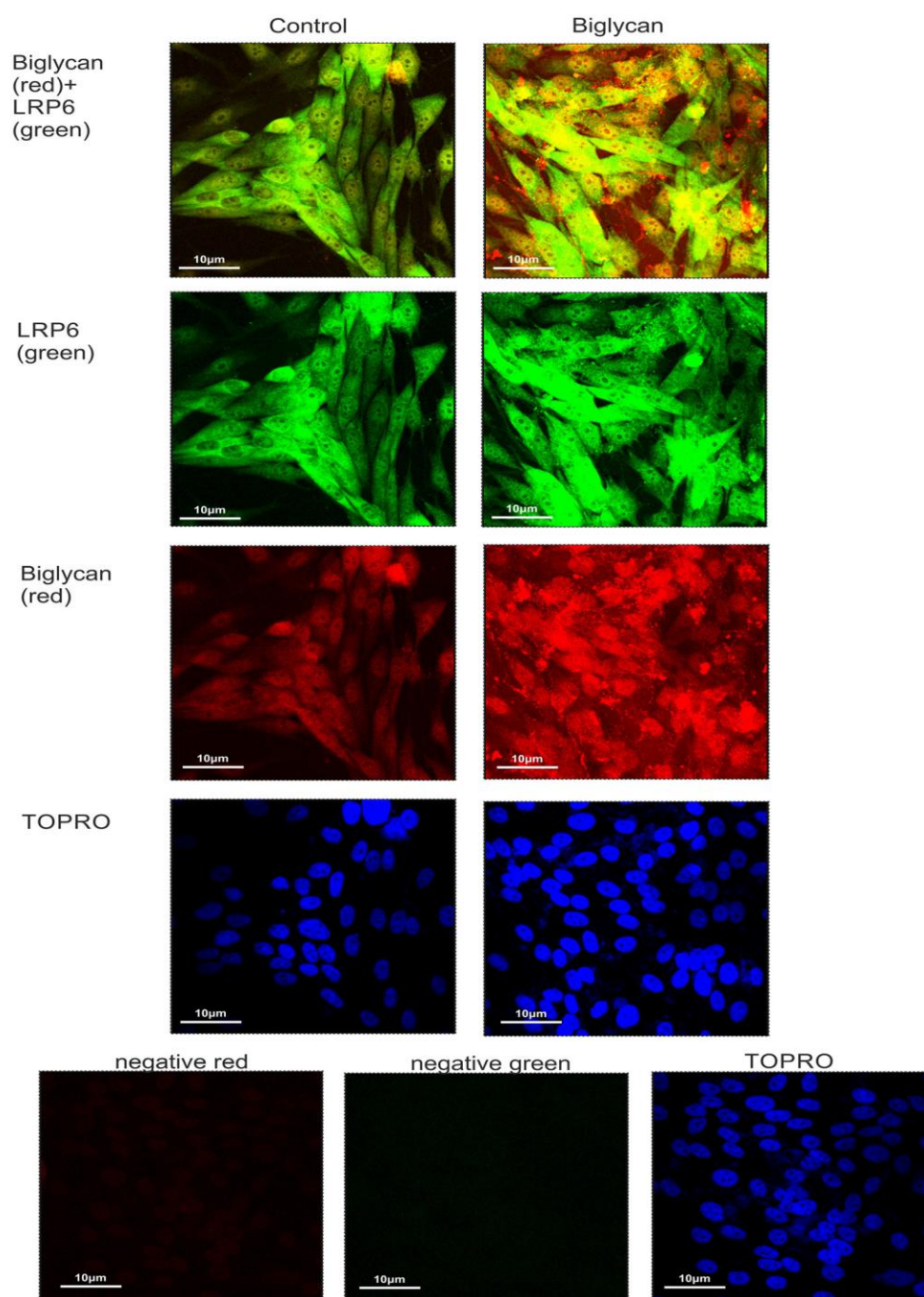


Εικόνα 4.9: Δράση του *siβ*-κατενίνης στην ενεργοποίηση του IGF-IR υποδοχέα. (A) Η έκφραση της συνολική πρωτεΐνης του IGF-IR (IGF-IR) του φωσφορυλιωμένου IGF-IR (pIGF-IR) μελετήθηκε σε κύτταρα με θρεπτικό απουσία ορού (control) και σε κύτταρα επιμολεσμένα με *rsiRNAs* (*shortinterferingRNAs*) εναντίον της β -κατενίνης (*siβ-catenin*) ή *scrambled siRNAs* αρνητικού έλεγχου (*siScr*), με την χρήση ανοσοαποτύπωσης κατά Western. (B) Η ανάλυση του ενεργοποιημένου IGF-IR (pIGF-IR/IGF-IR) έγινε ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα ακτίνης. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης παρουσιάζονται. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Μέσες τιμές \pm S.E.M. αποτυπωμένες. Στατιστική σημασία: **= $p \leq 0.01$ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

4.6 Συν-εντοπισμός της Διγλυκάνης με τον LRP6 υποδοχέα

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η διγλυκάνη επηρεάζει την επαγόμενη από το μονοπάτι Wnt, β-κατενίνη/Tcell-ειδική μεταγραφική δράση, σε οστεοβλάστες, μέσω της αλληλεπίδρασής της με τον LRP6 υποδοχέα (Berrendsen et al., 2011). Έτσι, μελετήθηκε κατά πόσον, στο μοντέλο οστεοσαρκώματος της μελέτης αυτής, η διγλυκάνη αλληλοεπιδρά με τον LRP6 υποδοχέα. Πειράματα ανοσοφθορισμού έδωσαν μια ευρύ έκφραση του υποδοχέα LRP6 (πράσινο χρώση) και παρουσία της διγλυκάνης στην μεμβράνη των κυττάρων (κόκκινη χρώση) με μέτρια χρώση συν-εντοπισμού (LRP6 + διγλυκάνη, Εικόνα 4.10). Μετά την επώαση των κυττάρων με διγλυκάνη παρατηρείται μια σημαντική αύξηση της πορτοκαλή χρώσης (συν-εντοπισμός), αρά και αύξηση του συν-εντοπισμού της διγλυκάνης με τον LRP6 υποδοχέα (Εικόνα 4.10). Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η διγλυκάνη, ανάλογα με την συγκέντρωσή της στα κύτταρα MG63, συν-εντοπίζεται με τον LRP6 υποδοχέα. Συμπερασματικά, η διγλυκάνη μέσω της αλληλεπίδρασής της συμμετέχει στην ενεργοποίηση του υποδοχέα LRP6 και αποτρέπει την αποδόμηση της β-κατενίνης στα κύτταρα αυτά.

Εικόνα 4.10



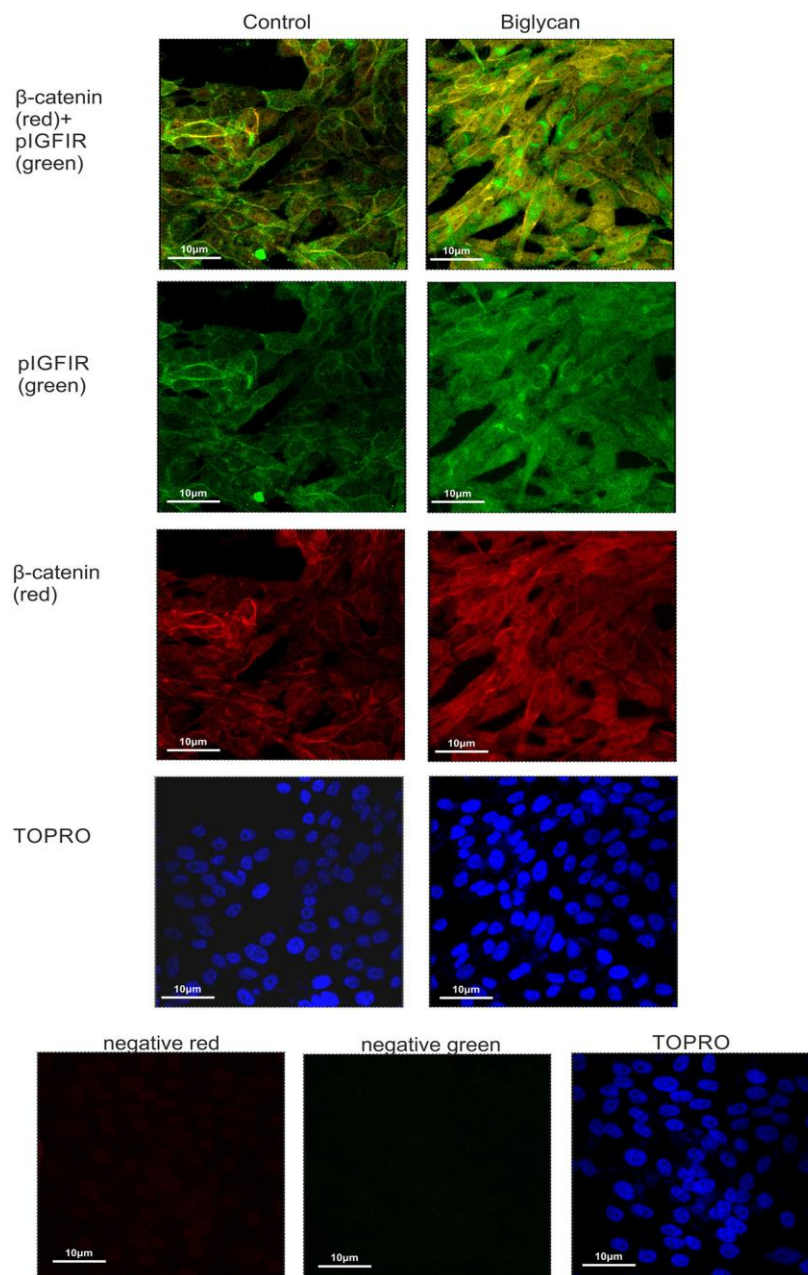
Εικόνα 4.10: Συν-εντοπισμός της διγλυκάνης (Biglycan) και του LRP6 υποδοχέα στα MG63 κύτταρα με την χρήση ανοσοφθορισμού. Χρώση διγλυκάνης (κόκκινο, anti-mouse AlexaFluor 555) και χρώση LRP6 (πράσινο, anti-rabbit AlexaFluor 488) των κυττάρων και οι αντίστοιχες χρώσεις πυρήνων τους (μπλέ, χρωστική TO-PRO-3) αναλύθηκαν μετά από καλλιέργεια 48 ωρών σε θρεπτικό απουσία ορού (control) ή με την προσθήκη διγλυκάνης (Biglycan, 10µg/ml). Στα δείγματα αρνητικού ελέγχου, δεν έγινε επώαση με πρώτο αντίσωμα. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν

με μικροσκόπιο συνεστίασης (*confocal microscopy*) και οι εικόνες φωτογραφήθηκαν με μεγέθυνση $\times 40$.

4.7 Αλληλεπίδραση μεταξύ β -κατενίνης και IGF-R σηματοδότησης

Η κυτταροπλασματική β -κατενίνη δημιουργεί σύμπλοκο κοντά στην κυτταρική μεμβράνη με τα μέλη της οικογένειας των κατχερίνων (*cadherins*) (Valenta et al., 2012). Υποθέσαμε ότι η β -κατενίνη μπορεί να αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα IGF-IR και να διευκολύνει την σηματοδότησή του. Με την χρήση αντισώματων β -κατενίνης (πράσινη χρώση) και β -IGF-IR (κόκκινη χρώση) σε MG-63 κύτταρα αποδείχτηκε ο συν-εντοπισμός των δύο αυτών μορίων (Εικόνα 4.11). Η χρώση του συν-εντοπισμού ήταν αυξημένη στα MG-63 κύτταρα που είχαν επωαστεί με εξωγενή διγλυκάνη (Εικόνα 4.11).

Εικόνα 4.11



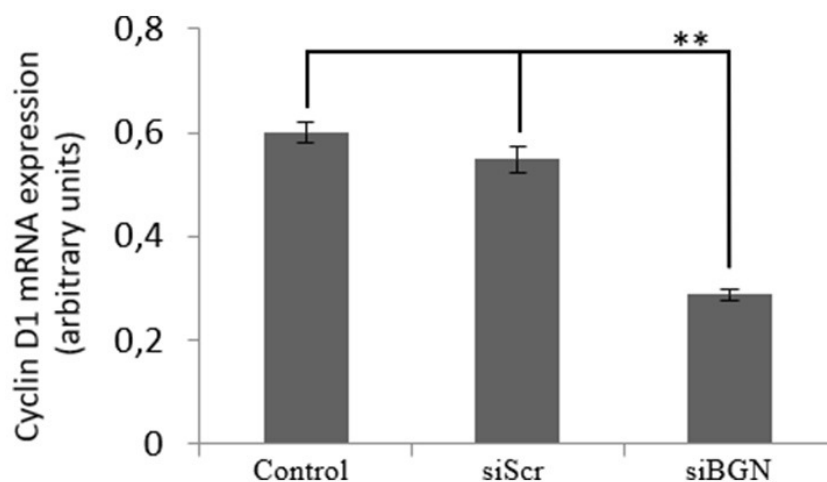
Εικόνα 4.11: Συν-εντοπισμός της β-κατενίνης (β -catenin) και του pIGF-IR υποδοχέα στα MG63 κύτταρα με την χρήση ανοσοφθορισμού. Χρώση β-κατενίνης (κόκκινο, anti-mouse AlexaFluor 555) και χρώση pIGF-IR (πράσινο, anti-rabbit AlexaFluor 488) των κυττάρων και οι αντίστοιχες χρώσεις πυρήνων τους (μπλέ, χρωστική TO-PRO-3) αναλύθηκαν μετά από καλλιέργεια 48 ωρών σε θρεπτικό απουσία ορού (control) ή με την προσθήκη διγλυκάνης (Biglycan, 10μg/ml). Στα δείγματα αρνητικού ελέγχου, δεν έγινε επώαση με πρώτο αντίσωμα. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν

με μικροσκόπιο συνεστίασης (*confocal microscopy*) και οι εικόνες φωτογραφήθηκαν με μεγέθυνση $\times 40$.

4.8 Αύξηση του κανονικού (*canonical*) σηματοδοτικού μονοπατιού της β -κατενίνης από την διγλυκάνη στα MG63 κύτταρα

Η Wnt επαγόμενη μεταγραφή μέσω των β -κατενίνη-T-cell factor (TCF)/ Lymphoid enhancer-binding factor (Lef) μεταφραστικών παραγόντων, έχει χαρακτηριστεί ως το κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι wnt/ β -κατενίνης. Για να μελετήσουμε τις μεταβολές του μονοπατιού αυτού από την διγλυκάνη ελέγξαμε την έκφραση κατάντι μορίου-στόχου της β -κατενίνης, την κυκλίνη D1 (Testu et al., 1999, Shtutman et al., 1999). Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.12 η έκφραση mRNA της κυκλίνης D1 μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ($p \leq 0.01$) στα κύτταρα ελλιπή σε διγλυκάνη, αποδεικνύοντας ότι η διγλυκάνη επηρεάζει και τα δύο κανονικά και μη κανονικά μονοπάτια της β -κατενίνης (*canonical* και *non-canonical*) στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος.

Εικόνα 4.12



Εικόνα 4.12: Δράση της διγλυκάνης στην έκφραση της κυκλίνης D1. Τα mRNA επίπεδα της κυκλίνης D1 (*cyclin D1*) μελετήθηκαν στα MG63 κύτταρα με επώαση θρεπτικού απουσία ορού (*control*) και σε κύτταρα επιμολυσμένα με *siRNAs* (*short interfering RNAs*) εναντίον της

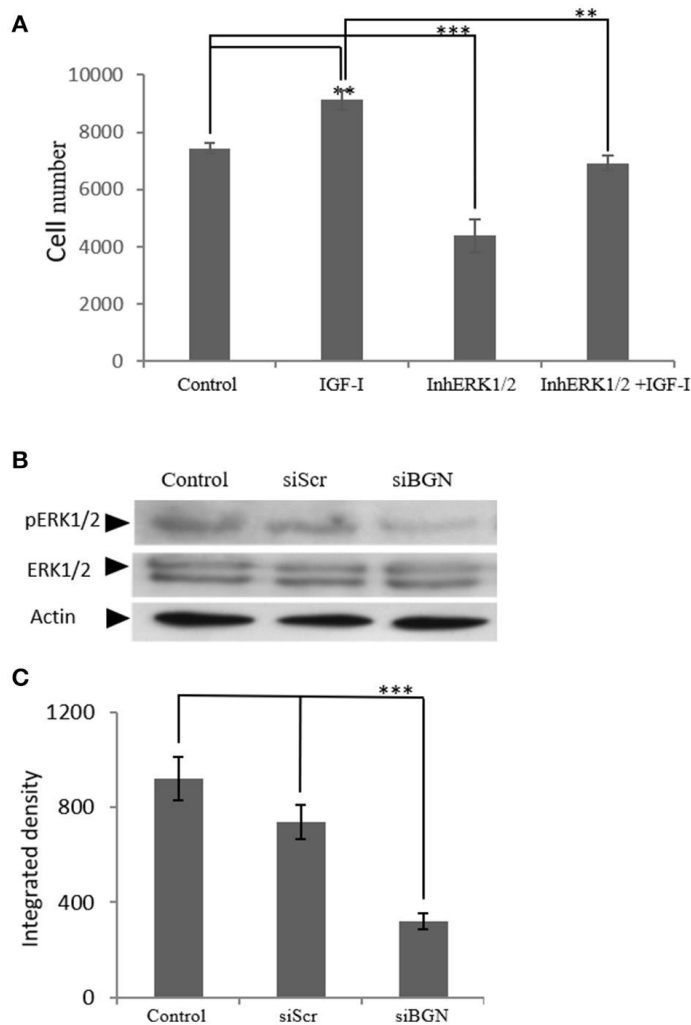
διγλυκάνης (siBGN) ή με *or scrambled siRNAs* αρνητικού ελέγχου (siScr) με την χρήση PCR πραγματικού χρόνου και ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο της διγλυκάνης και αναλύθηκαν ως προς την έκφραση του γονιδίου GAPDH. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων εις τριπλούν. Μέσες τιμές \pm S.E.M. αποτυπωμένες. Στατιστική σημασία: *** = $p \leq 0.01$ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

4.9 Ο ρόλος του ERK1/2 στην επαγόμενη από την διγλυκάνη σηματοδότηση του IGF-I

Το σύμπλοκο IGF-I/IGF-IR είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί πολλαπλά κατάντι σηματοδοτικά μονοπάτια που μεταβάλλουν κυτταρικές λειτουργίες, όπως το μονοπάτι των MAP κινασών (Werner et al., 2016, Satyamoorthy et al., 2001). Έτσι, ο ρόλος του ERK1/2, γνωστό μέλος του μονοπατιού των MAP κινασών, μελετήθηκε κατά την δράση των IGF-I/διγλυκάνης στην ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος. Χρησιμοποιήθηκε αναστολέας του ERK1/2 σε κύτταρα MG63 επωασμένα με ή χωρίς τον αυξητικό παράγοντα IGF-I (10 ng/mL) και παρουσιάστηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση στον βασικό αλλά και στον επαγόμενο από τον IGF-I πολλαπλασιασμό ($p \leq 0.01$ και $p \leq 0.001$ αντίστοιχα, εικόνα 4.13A). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την συμμετοχή του ERK στην βασική αλλά και στην επαγόμενη από τον IGF-I ανάπτυξη των MG-63 κυττάρων του οστεοσαρκώματος. Στη συνέχεια μελετήσαμε την δράση της διγλυκάνης στην ενεργοποίηση του ERK1/2. Έγινε ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων κυττάρων ελέγχου, κυττάρων ελλιπή σε διγλυκάνη (siBGN) και κυττάρων ελέγχου της επιμόλυνσης siRNAs (siScr) για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης του φωσφορυλιωμένου ERK1/2. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4.13B,C η ενεργοποίηση του ERK1/2 μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ($p \leq 0.001$) στα κύτταρα ελλιπή σε διγλυκάνη (siBGN). Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι ο ERK1/2 είναι ένας κατάντι

διαμεσολαβητής του σηματοδοτικού μονοπατιού IGF-IR/διγλυκάνης που ρυθμίζει των πολλαπλασιασμό των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

Εικόνα 4.13



Εικόνα 4.13: Ο ρόλος του ERK1/2 στον πολλαπλασιασμό των MG63 κυττάρων και η δράση της έκφρασης της διγλυκάνης στην ενεργοποίηση του. (A) Τα MG63 κύτταρα αποκολλήθηκαν και στρώθηκαν (3500 κύτταρα/οπή) σε πιάτα καλλιέργειας 96-οπών. Τα κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό απουσία ορού (control), με 10ng/ml IGF-I (IGF-I), με 5μM ERK1/2 αναστολέα (InhERK1/2) και με 10ng/ml IGF-I + 5μM ERK1/2 αναστολέα (IGF-I+InhERK1/2), και ο αριθμός των κυττάρων μετρήθηκε με CyQUANT. (B) Η πρωτεϊνική έκφραση του συνολικού ERK1/2 (ERK1/2) και του φωσφορυλιωμένου ERK1/2 (pERK1/2) των κυττάρων αναλύθηκε σε κύτταρα με θρεπτικό απουσία ορού (control) και σε κύτταρα επιμολυσμένα είτε με siRNAs εναντίον της biglycan (siBGN) ή με scrambled siRNAs αρνητικού ελέγχου (siScr) με ανοσοαποτύπωση κατά Western. (C) Η ανάλυση του ενεργοποιημένου ERK1/2 (pERK1/2/ERK1/2) κανονικοποιήθηκε με τα αντίστοιχα δείγματα για την έκφραση της ακτίνης. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Μέσες τιμές ± S.E.M. αποτυπωμένες. Στατιστική σημασία: *** = $p \leq 0.001$, ** = $p \leq 0.01$ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

5. Συζήτηση

5.1 Η λουμικάνη ρυθμίζει την ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων του οστεοσαρκώματος μεταβάλλοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β2

Για να επηρεάσει την κυτταρική προσκόλληση η λουμικάνη μπορεί να αλληλεπιδράσει με ειδικούς υποδοχείς προσκόλλησης στην κυτταρική μεμβράνη ή εναλλακτικά να ρυθμίσει τη δραστηριότητα μορίων του εξωκυττάριου χώρου. Τα κύτταρα του οστεοσαρκώματος αποδείχτηκε ότι εκκρίνουν την πρωτεογλυκάνη λουμικάνη (με μοριακό βάρος 60–70 kDa) που έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την ανάπτυξη και την κινητικότητα αυτών των κυττάρων (Nikitovic et al., 2008). Στην παρούσα διατριβή αποδείχτηκε ότι η λουμικάνη εμποδίζει την κυτταρική προσκόλληση του οστεοσαρκώματος μέσω της ρύθμισης της κατάντι σηματοδότησης του υποδοχέα του TGF-β2.

Σε προηγούμενες μελέτες φάνηκε ότι οι ισομορφές του TGF-β ενεργοποιούν την προσκολλητική ικανότητα των οστεοβλαστών (Lai et al., 2000), κι αυτό πιθανώς σχετίζεται με το βασικό ρόλο τους στην ογκογένεση του οστεοσαρκώματος (Franchi et al., 1998). Τα κύτταρα Saos 2 είναι γνωστό ότι εκκρίνουν τις τρεις ισομορφές TGF-β1, TGF-β2 και TGF-β3 κι επομένως καθιστούν εφικτούς τους αυτοκρινείς τρόπους δράσης τους (Gassling et al., 2009). Εξακριβώθηκε ότι ο TGF-β2 είναι η κύρια ισομορφή που εκφράζεται στα κύτταρα αυτά. Η καταστολή του ενδογενούς TGF-β2 εμπόδισε σημαντικά την προσκόλληση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος Saos 2 ενώ ο εξωγενής TGF-β2 ενίσχυσε σημαντικά την προσκόλληση αυτών των κυττάρων. Ωστόσο, τα ανεπαρκή σε λουμικάνη κύτταρα Saos 2 είχαν αυξημένη προσκολλητική ικανότητα. Τα κύτταρα Saos 2 που

επιμολύνθηκαν με siRNA-λουμικάνης δεν έδειξαν αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης στην ινονεκτίνη (FN) συγκριτικά με τα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με κωδικοποιημένο siRNA κατά την μείωση του ενδογενούς TGF-β2. Συμπερασματικά, η αντιστρόφως ανάλογη σχέση ανάμεσα στην έκφραση της λουμικάνης και την προσκόλληση των κυττάρων Saos 2 εξαρτάται από τη σηματοδότηση του ενεργού TGF-β2. Επιπλέον, η σημαντική αύξηση της ενεργοποίησης του Smad 2 που παρουσιάστηκε στα κύτταρα ελλιπή σε λουμικάνη ακυρώθηκε με την παρουσία του ειδικού αντισώματος για τον TGF-β2 αποδεικνύοντας ότι η λουμικάνη είναι ρυθμιστής της κατάντι σηματοδότησης των TGF-β2/Smad 2. Καθώς η έκφραση της λουμικάνης σε κύτταρα Saos 2 φάνηκε σε προηγούμενη μελέτη ότι εμποδίζεται από τον TGF-β2 (Nikitovic et al., 2008), αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός αλληλένδετου μηχανισμού δράσης ανάμεσα στην έκφραση της λουμικάνης και την ενεργοποίηση του TGF-β2. Ένα άλλο μέλος της οικογένειας των μικρών πλούσιων σε λευκίνη πρωτεογλυκάνων είναι η nephrocan που βρέθηκε ότι ρυθμίζει αρνητικά την φωσφορυλίωση της Smad 3 στα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων υποδεικνύοντας ότι μπορεί να λειτουργεί ως ενδογενής αναστολέας των σηματοδοτικών μονπατιών του TGF-β2 και του Smad 3 (Mochidaetal., 2006). Η ντεκορίνη, προσδένεται στον TGF-β κι έτσι εμποδίζει τη βιοδραστηριότητά του και αποτελεί έναν άμεσο ή έμμεσο αρνητικό ρυθμιστή της σύνθεσης του TGF-β (Ständer et al., 1998 και 1999). Αντιθέτως, τα ανεπαρκή σε βήτα-γλυκάνες κύτταρα έχουν μειωμένη ανταπόκριση στον TGF-β (Young et al., 2002) κι αυτό υπογραμμίζει τον κρίσιμο ρόλο των μελών της οικογένειας των πρωτεογλυκάνων SLRP στον έλεγχο της σηματοδότησης της οικογένειας των υποδοχέων TGF-β (Chenetal., 2004; Ohtaetal., 2004; Kizawaetal., 2005).

Καθώς τα δεδομένα δείχνουν ότι η επίδραση του TGF-β2 στην προσκόλληση των κυττάρων Saos 2 εξαρτάται από την FN, υποθέτουμε ότι ο TGF-β2 ρυθμίζει την προσκόλληση του οστεοσαρκώματος εν μέρει μέσω της έκφρασης των ιντεγκρίνων β1 που είναι οι κύριοι προσδέτες της FN (Huetal., 1995; Chengetal., 2000). Φάνηκε σε προηγούμενες μελέτες ότι η οδός του TGF-β ρυθμίζει την έκφραση της ιντεγκρίνης των κυττάρων που είναι παρόμοια με τους οστεοβλάστες (Nestietal., 2002; Laietal., 2000). Συγκεκριμένα, ο TGF-β1 βρέθηκε ότι αυξάνει την έκφραση της ανβ5 ενισχύοντας τη μεταγραφή του γονιδίου της υποενότητας β5 σε κυτταρικές γραμμές οστεοβλαστών ποντικών μέσω ενός μηχανισμού που απαιτεί τις πρωτεΐνες Sp1/Sp3 και Smad. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της ιντεγκρίνης α5β1 είχαν ως αποτέλεσμα την αυξημένη προσκόλληση των οστεοβλαστών των ποντικών που επώαστηκαν με τον TGF-β (Laietal., 2000). Σε αυτήν τη μελέτη, ο TGF-β2 ενεργοποίησε την έκφραση της ιντεγκρίνης β1. Καθώς η αυξημένη έκφραση της ιντεγκρίνης β1 των ελλιπή σε λουμική κυττάρων Saos 2 ακυρώθηκε με την παρουσία του ειδικού αντισώματος εναντίον του TGF-β2, συνεπάγεται ότι η λουμική ρυθμίζει τα επίπεδα της ιντεγκρίνης β1 μέσω της αναστολής της ενεργοποίησης του ενδογενούς TGF-β2. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση της ιντεγκρίνης β1 σχετίζεται με τη δράση της pFAK (Yaoetal., 2007). Η FAK είναι ένα κατάντι μόριο σηματοδότησης της ιντεγκρίνης β1 και η απενεργοποίηση της FAK σχετίζεται αρνητικά με την οστεοβλαστική διαφοροποίηση (Tamuraetal., 2001). Πολύ ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι η καταστολή του ενδογενούς TGF-β2 σχετίζεται επίσης με τα μειωμένα επίπεδα ενεργοποίησης της pFAK ενώ ο εξωγενής TGF-β2 ενίσχυσε την φωσφορυλίωση της pFAK στην τυροσίνη Y397. Τα ελλιπή σε λουμική κύτταρα είχαν αυξημένη ενεργοποίηση της FAK Y397 δείχνοντας ότι η έκφραση της

λουμικάνης είναι αντιστρόφως ανάλογη με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της FAK. Επιπλέον, τα ανεπαρκή σε λουμικάνη κύτταρα Saos 2 παρουσίασαν μειωμένη προσκόλληση σε υπόστρωμα FN συγκριτικά με κύτταρα ελέγχου επιβεβαιώνοντας επομένως τον βασικό ρόλο της FAK στην προσκόλληση των οστεοβλαστών (Nakayamadaetal., 2003). Αυτό συνάδει με προηγούμενα ευρήματα που δείχνουν ότι η προσθήκη του TGF-β1 σε κύτταρα MC3T3-E1 αύξησε την έκφραση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης και είχε ως αποτέλεσμα την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση και την κυτταρική επιμήκυνση που συνοδεύτηκε από αύξηση στην περιοχή του άνευ κυττάρων υποστρώματος (Karsdaletal., 2001). Επομένως, αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η αρνητική ρύθμιση της δραστηριότητας του TGF-β2 από τη λουμικάνη δεν έχει μόνο έναν στόχο (την pSmad 2) αλλά και πολλαπλές επιδράσεις στην απενεργοποίηση κατάντι της pSmad 2. Προσφάτως, η σφαιρική επίδραση της αναστολής του TGF-β2 υποστηρίχθηκε ότι έχει ως αποτέλεσμα μία πιο εκτενή αναστολή αρκετών σημαντικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην παθογένεση του ηπατικού καρκινώματος, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης φωσφορυλίωσης της Smad 2, της FAK και της ιντεγκρίνης β1 και αυξημένα επίπεδα της έκφρασης της E καδχερίνης (Giannellietal., 2010; Fransveaetal., 2010).

Σε αυτό το σημείο, παραμένει ακόμα ασαφής ο τρόπος με τον οποίο η λουμικάνη εμποδίζει τη σηματοδότηση του TGF-β2. Ο ώριμος TGF-β εκκρίνεται συνδεδεμένος με επικουρικές πρωτεΐνες, ο διαχωρισμός του από αυτό το σύμπλεγμα είναι ένας κεντρικός ρυθμιστικός μηχανισμός της ενεργοποίησής του (Miyazonoetal., 1991; Rifkin, 2005). Καθώς η λουμικάνη είναι μία πρωτεΐνη που εκκρίνεται, η ανασταλτική της επίδραση είναι πιθανό να πραγματοποιείται μέσω της εξωκυτταρικής της αλληλεπίδρασης με: (α) τον ώριμο TGF-β για να εμποδίσει τη συγκόλληση του

συνδέτη στον υποδοχέα, (β) τους υποδοχείς TGF-β τύπου I και/ή τύπου II για να εμποδίσει τη συγκόλληση του ώριμου TGF-β με τους υποδοχείς του και (γ) το σύμπλεγμα του εκκρινόμενου TGF-β για να εμποδίσει τον διαχωρισμό του ώριμου TGF-β. Επομένως, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες πάνω στους μηχανισμούς με τους οποίους η λουμικάνη εμποδίζει την δράση του TGF-β.

5.2 Η διγλυκάνη ρυθμίζει την ανάπτυξη των κυττάρων MG63 οστεοσαρκώματος μέσω της σηματοδότησης LPR6/β-catenin/IGFR-IR

Η διγλυκάνη, μια σημαντική πρωτεογλυκάνη του εξωκυττάριου χώρου του οστού, έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση μεσεγχυματικών όγκων (Nikitovic et al., 2008, Subbarayan and Seliger 2018). Διαφορετικές δημοσιεύσεις περιγράφουν την σημασία της "πρωτεογλυκανικής υπογραφής" στην παθολογική έκβαση των ασθενών (Subbarayan and Seliger 2018) και συζητούν για την πιθανή χρήση τους ως βιοδείκτες ή θεραπευτικούς στόχους σε κάποιους τύπους καρκίνων (Brezillon et al., 2017, Nikitovic et al., 2018, Mytilinaiou et al., 2017, Hammond et al., 2014, Barbouri et al., 2014). Στην παρούσα διατριβή παρουσιάζουμε για πρώτη φορά την δράση της διγλυκάνης στην αύξηση του οστεοσαρκώματος, καθώς τα κύτταρα ελλιπή σε διγλυκάνη έδειξαν ότι έχουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού. Προηγούμενες μελέτες που ασχολήθηκαν με την ανάλυση των γονιδίων τα οποία ρυθμίζουν τις λειτουργίες πρώιμων οστεοβλαστών με καταστολή της διγλυκάνης (biglycan-null κύτταρα), με την χρήση microarray ολιγονουκλεϊκών οξέων, έδειξαν ότι η έλλειψη της διγλυκάνης είναι ικανή να μεταβάλει την έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζουν την φλεγμονή, την ανοσοαπόκριση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου (Chen et al., 2005). Επιπρόσθετα, δείκτες φτωχής ανταπόκρισης στην θεραπεία

(Ηυνος βαθμοί/II ανταπόκρισης αντιστοιχούν σε μικρή ή μη ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία) είναι κυρίως γονιδιακά παράγωγα που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση του μικρο-περιβάλλοντος και στην διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, συμπεριλαμβανομένης και της διγλυκάνης (Mintz et al., 2005). Στη συνέχεια διερευνήσαμε πιθανούς μεσολαβητές της δράσης της διγλυκάνης, που συμμετέχουν σε σημαντικές αναπτυξιακές διεργασίες όπως τοBMP, το μονοπάτι Wnt/b-catenin, το RUNX2, το μονοπάτι HIPPO/YAP ή το μονοπάτι του IGFIR που προσβάλλονται από το οστεοσάρκωμα κατά την ανάπτυξή του (Mortus et al., 2014). Ο αυξητικός παράγοντας IGF-I έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει θετικά στην επιβίωση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος και μειώνει την απόπτωσή τους (Schmid et al., 2017). Επίσης, ο υποδοχέας του, IGF-IR, υπερεκφράζεται σε δείγματα οστεοσαρκώματος όπως αποδείχτηκε από τους Liu et.al. (Liu et al., 2016). Οι γενετικοί πολυμορφισμοί του IGF-I γονιδίου έδειξαν ότι συνδέονται με την πιθανότητα ανάπτυξης και με την πρόγνωση του οστεοσαρκώματος (Mao et al., 2017). Εφόσον, στην παρούσα μελέτη, αποδείξαμε την αύξηση της έκφρασης της διγλυκάνης μέσω της κατάντι σηματοδότησης του IGF-IR υποδοχέα, διερευνήσαμε τον πιθανό ρόλο του ίδιου στην εξαρτώμενη από την διγλυκάνη ανάπτυξη των κυττάρων του οστεοσαρκώματος. Βάση των αποτελεσμάτων της διατριβής και σύμφωνα με παλιότερες μελέτες (Liu et al., 2016, Daqian et al., 2015), το σηματοδοτικό μονοπάτι του IGF-IR αποδείχτηκε ότι παίζει κύριο ρόλο στην ενδογενή ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MG63. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η εξαρτώμενη από το μονοπάτι IGF-I/IGF-IR ανάπτυξη ανεστάλη πλήρως στα κύτταρα με ελλιπή έκφραση διγλυκάνης. Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η ενεργοποίηση από ειδικό προσδέτη του IGF-IR ακολουθείτε από πρωτεοσωμική και λυσοσωμική αποδόμηση του ίδιου του IGF-IR - μηχανισμός από-

ευαισθητοποίησης του υποδοχέα (Vecchione et al., 2003). Επομένως, ενδογενείς μηχανισμοί που παρατείνουν την ενεργοποίηση του IGF-IR οδηγούν σε παρατεταμένη σηματοδότηση εξαρτώμενη από τον IGF-I και συμβάλουν στην εξέλιξη του καρκίνου. Υποθέσαμε ότι η κατάντι δράση της διγλυκάνης μπορεί να οδηγεί σε αυξημένη ενεργοποίηση του IGF-IR και παρατεταμένη ανάπτυξη των κυττάρων, οπότε διερευνήσαμε πιθανούς μεσολαβητές και πιο συγκεκριμένα το μονοπάτι των Wnt/ β -κατενίνης. Έχει παρατηρηθεί η έμμεση αλληλεπίδραση της β -κατενίνης με τον IGF-IR υποδοχέα και άλλα μέλη του σηματοδοτικού μονοπατιού του αυξητικού παράγοντα IGF-I. Για παράδειγμα ο μεταγραφικός παράγοντας β -κατενίνη /POU5F1/SOX2 μεσολαβεί στην σηματοδότηση του IGF-I υποδοχέα και προβλέπει την φτωχή πρόγνωση σε αδено-καρκινώματα του πνεύμονα, καθώς και το σηματοδοτικό μόριο Caveolin-1-LRP6 ενεργοποιεί την αερόβια γλυκόλυση στον καρκίνο του προστάτη (Xu et al., 2013, Tahir et al., 2013, Fernandes et al., 2017). Αντίθετα, έχει αποδειχτεί ότι η διγλυκάνη ρυθμίζει το μονοπάτι των Wnt/ β -κατενίνης σε οστεοβλαστικές κυτταρικές σειρές, είτε μεταβάλλοντας την δράση των μορίων πρόσδεσης ή ρυθμίζοντας τα κατάντι σηματοδοτικά μόρια (Berendsen et al., 2011). Μελετήσαμε την πιθανότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ του IGFIR και των σηματοδοτικών μορίων του μονοπατιού Wnt/ β -κατενίνης στον εξαρτώμενο από την διγλυκάνη πολλαπλασιασμό των κυττάρων του οστεοσαρκώματος. Στην παρούσα διατριβή στα ελλιπή σε β -κατενίνη MG63 κύτταρα του οστεοσαρκώματος αποδείχτηκε ότι καταστέλλεται η ενδογενής αλλά και η επαγόμενη από τον IGF-I ενεργοποίηση του IGF-IR και μειώνεται στατιστικά σημαντικά η ανάπτυξή τους. Επίσης, δείξαμε για πρώτη φορά ότι η επώαση των MG63 κυττάρων του οστεοσαρκώματος με εξωγενή διγλυκάνη αυξάνει την έκφραση της β -κατενίνης και μεσολαβεί στην συγκέντρωσή της στα κύτταρα καθώς και στον εντοπισμό της είτε

στο κυτταρόπλασμα ή στην κυτταρική μεμβράνη. Προηγούμενες μελέτες σε οστεοβλάστες ποντικών έδειξαν ότι η διγλυκάνη αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του κανονικού (canonical) μονοπατιού του Wnt, το Wnt3a και με τον Wnt συν-υποδοχέα LRP6. Ο αλληλοεντοπισμός τους αύξησε την κατάντι μεταγραφική δραστηριότητα, επαγόμενη από το Wnt, του παράγοντα β-κατενίνη/Tcell-specific factor (Berendsen et al., 2011). Για να διαλευκανθεί ο μηχανισμός δράσης της διγλυκάνης μελετήσαμε τον εντοπισμό της καθώς και τον εντοπισμό του LRP6 υποδοχέα στα MG63 κύτταρα με την χρήση ανοσοφθορισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διγλυκάνη συν-εντοπίζεται με τον LRP6 υποδοχέα και ο συν-εντοπισμός τους είναι εξαρτώμενος από την συγκέντρωση της διγλυκάνης στο κύτταρο. Η πρόσδεση της διγλυκάνης στους (LRP5/6) συν-υποδοχείς ορίζει τον βαθμό απενεργοποίησης της β-κατενίνης και του συμπλόκου αποδόμησής της καθώς και αυξάνει την συγκέντρωση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα. Στην συνέχεια η β-κατενίνη συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και είτε μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου και σχηματίζει ενεργό μεταγραφικό σύμπλοκο με τα μόρια της οικογένειας TCF/LEF, ή αλληλεπιδρά και σχηματίζει σύμπλοκα στην μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα (Clevers 2006). Η συγκέντρωση της κυτταροπλασματικής β-κατενίνης μεταβάλετε στον καρκίνο (Yamaguchi et al., 2012). Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης του Wnt μονοπατιού έχειδειχθεί ότι συμβάλει στην επιβίωση των οστεοβλαστών, καθώς παρουσιάζεται μείωση της απόπτωσης των οστεοβλαστών και των οστεοκυττάρων σε ποντίκια που δεν εκφράζουν τον αναστολέα του Wnt sFRP1 (soluble frizzled-related protein 1) (Bodine et al., 2004). Επιπρόσθετα, οι Wnt πρωτεΐνες, σε διαφορετική μελέτη, απέτρεψαν την απόπτωση των οστεοβλαστών και των οστεοκυττάρων μέσω ενός μηχανισμού που απαιτεί την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Src/ERK (Almeida et al., 2005). Επίσης, σε μοντέλο ποντικού για νευροεκφυλιστικές παθήσεις

βρέθηκαν αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα του IGF-1R και ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta/β-κατενίνης (Saraceno et al., 2018). Στην παρούσα μελέτη εμφανίστηκε μεγάλη αύξηση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα των MG63 κυττάρων, όπως και μια μέτρια επαγωγή της στην μεμβράνη και στον πυρήνα μετά από επώαση με εξωγενή διγλυκάνη. Επιπρόσθετα, πειράματα ανοσοφθορισμού συνέδεσαν την αύξηση του πολλαπλασιασμό των MG63 κυττάρων με τον συν-εντοπισμό της β-κατενίνης με τον IGF-1R στην μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των κυττάρων αυτών. Ο Aleksic et.al. έχουν περιγράψει σε ένα αριθμό βιοψιών χονδρώματος την παρουσία IGF-1R στην μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα που εμφανιζόταν πιο έντονα στους επανα-εμφανιζόμενους όγκους σε σχέση με τους πρωτοπαθείς (Aleksic et al., 2016). Επίσης, στα ίδια δείγματα ανακάλυψαν ετερογενείς πυρηνικούς IGF-1R υποδοχείς, οι οποίοι προσδίδουν ευαισθησία στην χρήση αναστολέων του IGF-1R (Aleksic et al., 2016). Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, δείχνουν πως η διγλυκάνη, μέσω της προσδεσής της με τον LRP6 υποδοχέα, απενεργοποιεί τον σχηματισμό του συμπλόκου αποδόμησης της β-κατενίνης, ενισχύοντας τον εντοπισμό της στο κυτταρόπλασμα και στην μεμβράνη. Η αυξημένη σε συγκέντρωση β-κατενίνη αλληλεπιδρά με τον IGF-1R, ενισχύοντας την έκφραση του pIGF-1R στα διαφορετικά τμήματα του κυττάρου. Επιπρόσθετα, το ERK1/2 βρέθηκε να είναι κατάντι μεσολαβητής του σηματοδοτικού άξονα διγλυκάνης/IGF1R/β-κατενίνης και ρυθμιστής της ανάπτυξης των MG63 κυττάρων. Παρόλα αυτά δεν αποκλείεται ο ERK1/2 να είναι κατάντι μεσολαβητής άλλων μεμβρανικών υποδοχέων, όπως των Wnt υποδοχέων (Palsgaard et al., 2012) ή να συμβάλλει στην διατήρηση της συγκέντρωσης της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα. Παρομοίως, άλλες μελέτες έχουν προτείνει την αλληλεπίδραση μεταξύ των

μονοπατιών β-κατενίνης/Wnt και ERK χωρίς να περιγράφουν τον ακριβή μηχανισμό δράσης (Conacci-Sorrell et al., 2003, Geosrgopoulos et al., 2004, Kouvidi et al., 2016). Σε κύτταρα NIH 3T3, έχει δειχθεί ότι οWNT3A επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της ενεργοποίησης των μονοπατιών ERK και Wnt/β-κατενίνης, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα δύο μονοπάτια μπορούν να αλληλεπιδρούν σε διαφορετικά επίπεδα (Yum et al., 2005). Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη, επιβεβαιώθηκε ότι η αυξημένη πυρηνική μετατόπιση της β-κατενίνης βοήθησε στην μεταγραφή γονιδίου στόχου, της κυκλίνης-D1, που είναι γνωστό ότι ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο (Nelson and Nusse 2004). Στα μειονεκτήματα της μελέτης μας μπορούμε να συμπεριλάβουμε, πρώτον, ότι χρησιμοποιήθηκε μόνο μια κυτταρική σειρά (MG63) και δεύτερον ότι δεν προσδιορίστηκαν αναλυτικά τα μέλη του συμπλόκου IGF-IR/β-κατενίνης κατά τον συν-εντοπισμό τους. Μελλοντικές έρευνες πάνω σε διαφορετικά *in vitro/in vivo* μοντέλα, μαζί με δεδομένα από δείγματα βιοψιών μπορούν να βοηθήσουν στην περιγραφή του μηχανισμού που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή.

5.3 Τελικά συμπεράσματα

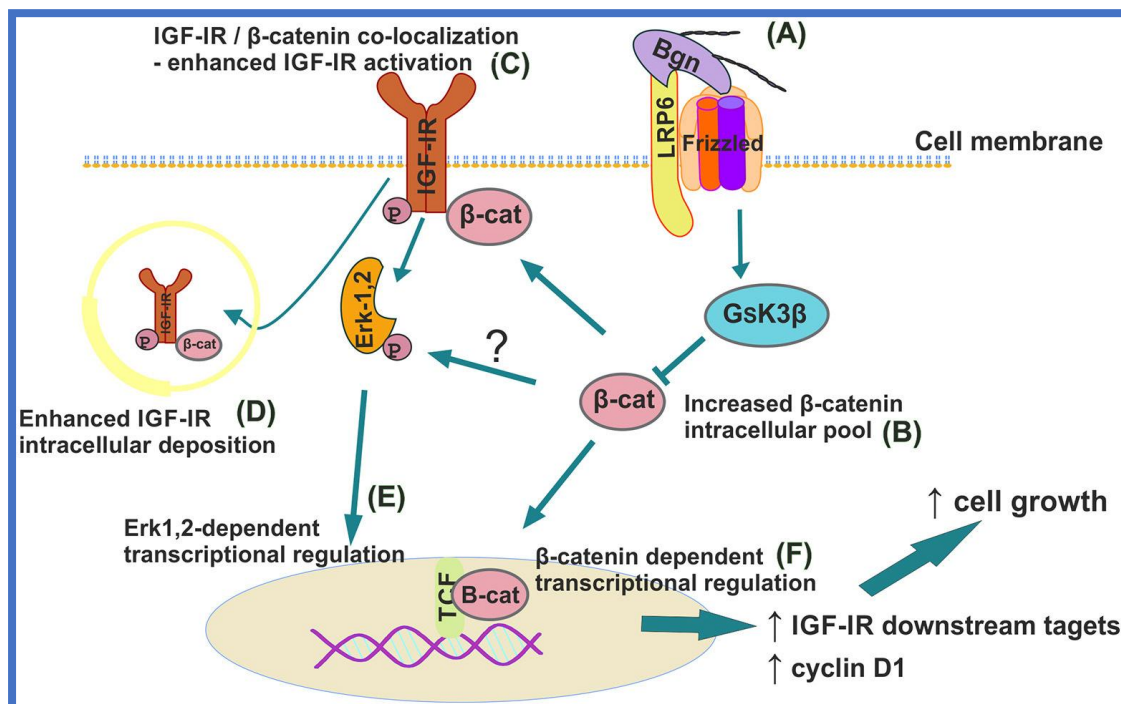
Στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρουσιάστηκε για πρώτη φορά:

1. η ύπαρξη ενός νέου *in and out* (εξωγενούς-ενδογενούς) κυκλώματος σηματοδότησης σε κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος. Πιο συγκεκριμένα η λουμικάνη, που εκκρίνεται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, φαίνεται να δρα ως ενδογενής αναστολέας της ενεργοποίησης του υποδοχέα TGF-β2. Το παραπάνω έχει ως αποτέλεσμα τη ρύθμιση κατάντι σηματοδοτικών μορίων, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης pSmad 2, της ιντεγκρίνης β1 και της πρωτεΐνης pFAK για την ρύθμιση της ικανότητας

προσκόλλησης των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

2. ένας καινούριος μηχανισμός δράσης της διγλυκάνης, μέσω των μορίων LRP6/ β -κατενίνης/IGF-IR, που επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος (Εικόνα 5.1). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα IGF-IR έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση/έκκριση της διγλυκάνης, η οποία σχηματίζει ένα αυτόνομο σηματοδοτικό βρόγχο, προερχόμενο από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, που ρυθμίζει την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος.

Εικόνα 5.1



Εικόνα 5.1: Σχηματική αναπαράσταση του προτεινόμενου κατάντι σηματοδοτικού μονοπατιού των διγλυκάνη/LRP6/IGF-IR στα MG63 κύτταρα του οστεοσαρκώματος. (A) Η εκκρινόμενη

στον εξωκυττάριο χώρο διγλυκάνη προσδέεται με τον LRP6 υποδοχέα και ενεργοποιεί το *frizzled* και αυτό στη συνέχεια ενεργοποιεί το GSK3β. (B) η συγκέντρωση της β-κατενίνης αυξάνεται στο κυτταρόπλασμα. (C) η β-κατενίνη συν-εντοπίζεται με τον IGF-IR υποδοχέα και αυξάνει την ενεργοποίησή/συγκέντρωσή του στην μεμβράνη και στον (D) πυρήνα. (E) ΟpIGF-IR ενεργοποιεί τον ERK1,2 και την κατάντι ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής. (F) Μέρος της κυτταροπλασματικής β-κατενίνης μετακινείται στον πυρήνα και μεταβάλλει την μεταγραφή γονιδίων στόχων της.(Aggelidakis et al., 2018)

6. References

- Λαμπίρης Η. Ορθοπαιδική και τραυματολογία (2003). Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης.
- Σκοπελίτου Α.Σ. Όγκοι οστών. Βασική Διαγνωστική Προσέγγιση. (2002). Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π.Χ.
- Χατζηπαύλου Α, Τζερμιαδιανός Μ. και Γαϊτάνης Ι. Ορθοπαιδική τραυματολογία III Όγκοι του μυοσκελετικού συστήματος. (2004). Ιατρικές εκδοσεις Πασχαλίδης Π.Χ.
- Abdel-Wahab, N., Wicks, S. J., Mason, R. M., and Chantry, A. (2002) Decorin suppresses transforming growth factor--induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human mesangial cells through a mechanism that involves Ca²⁺-dependent phosphorylation of Smad2 at serine 240. *Biochem. J.* 362, 643–649
- Aggelidakis J, Berdiaki A, Nikitovic D, Papoutsidakis A, Papachristou DJ, Tsatsakis AM, et al. (2018) Biglycan Regulates MG63 Osteosarcoma Cell Growth Through a LPR6/beta-Catenin/IGFR-IR Signaling Axis. *Frontiers in oncology.* 8:470.
- Aktary Z, Bertrand JU, Larue L. (2016) The WNT-less wonder: WNT-independent beta-catenin signaling. *Pigment Cell Melanoma Res.* 29:524–40.
- Aleksic T, Browning L, Woodward M, Phillips R, Page S, Henderson S, et al. (2016) Durable response of spinal chordoma to combined inhibition of IGF-1R and EGFR. *Front Oncol.* 6:98.
- Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S. (2005) Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem.* 280:41342–51.

- Amenta, A. R., Yilmaz, A., Bogdanovich, S., McKechnie, B. A., Abedi, M., Khurana, T. S., and Fallon, J. R. (2011) Biglycan recruits utrophin to the sarcolemma and counters dystrophic pathology in mdx mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 762–767
- Ameye, L., and Young, M. F. (2002) Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* 12, 107R–116R
- Ameye, L., Aria, D., Jepsen, K., Oldberg, A., Xu, T., and Young, M. F. (2002) Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis. *FASEB J.* 16, 673–680
- Baba H, Ishiwata T, Takashi E, Xu G, Asano G. Expression and localization of lumican in the ischemic and reperfused rat heart. *Japanese Circulation Journal* 2001;65:445–50.
- Babelova, A., Moreth, K., Tsalastra-Greul, W., Zeng-Brouwers, J., Eickelberg, O., Young, M. F., Bruckner, P., Pfeilschifter, J., Schaefer, R. M., Groñne, H. J., and Schaefer, L. (2009) Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via Toll-like and P2X receptors. *J. Biol. Chem.* 284, 24035–24048
- Bacci, G., Ferrari, S., Delepine, N., Bertoni, F., Picci, P., Mercuri, M., Bacchini, P., Brach del Prever, A., Tienghi, A., Comandone, A., and Campanacci, M. (1998) Predictive factors of histologic response to primary chemotherapy in osteosarcoma of the extremity: study of 272 patients preoperatively treated with high-dose methotrexate, doxorubicin, and cisplatin. *J. Clin. Oncol.* 16, 658–663
- Bacci, G., Longhi, A., Versari, M., Mercuri, M., Briccoli, A., and Picci, P. (2006) Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant

- chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. *Cancer* 106, 1154–1161
- Barbouri D, Afratis N, Gialeli C, Vynios DH, Theocharis AD, Karamanos NK. (2014) Syndecans as modulators and potential pharmacological targets in cancer progression. *Front Oncol.* 4:4.
 - Behzadi AH, Raza SI, Carrino JA, Kosmas C, Gholamrezanezhad A, Basques K, et al. (2018) Applications of PET/CT and PET/MR Imaging in Primary Bone Malignancies. *PET clinics.* 13(4):623-34.
 - Benayahu D, Shur I, Marom R, Meller I, Issakov J. (2001) Cellular and molecular properties associated with osteosarcoma cells. *J Cell Biochem.* 84:108–14.
 - Berendsen AD, Fisher LW, Kilts TM, Owens RT, Robey PG, Gutkind JS, et al. (2011) Modulation of canonical Wnt signaling by the extracellular matrix component biglycan. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:17022–7.
 - Bi, Y., Nielsen, K. L., Kilts, T. M., Yoon, A., Karsdal, M. A., Wimer, H. F., Greenfield, E. M., Heegaard, A. M., and Young, M. F. (2006) Biglycan deficiency increases osteoclast differentiation and activity due to defective osteoblasts. *Bone* 38, 778–786
 - Bi, Y., Stuelten, C. H., Kilts, T., Wadhwa, S., Iozzo, R. V., Robey, P. G., Chen, X. D., and Young, M. F. (2005) Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem.* 280, 30481–30489
 - Bianco, P., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D., and Robey, P. G. (1990) Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 38, 1549–1563

- Blobe GC, Liu X, Fang SJ, How T & Lodish HF. (2001) A novel mechanism for regulating transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC. *J Biol Chem.* 276:39608-17.
- Blochberger TC, Cornuet PK, Hassell JR. (1992) Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated. *Journal of Biological Chemistry* 267:20613–9.
- Bodine PV, Zhao W, Kharode YP, Bex FJ, Lambert AJ, Goad MB, et al. (2004) The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol.* 18:1222–37.
- Brezillon S, Untereiner V, Mohamed HT, Hodin J, Chatron-Colliet A, Maquart FX, et al. (2017) Probing glycosaminoglycan spectral signatures in live cells and their conditioned media by Raman microspectroscopy. *Analyst* 142:1333–41.
- Brezillon S, Zeltz C, Schneider L, Terryn C, Vuillermoz B, Ramont L, et al. (2009) Lumican inhibits B16F1 melanoma cell lung metastasis. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60 (Suppl. 4):15–22.
- Cai Y, Cai T, Chen Y. (2014) Wnt pathway in osteosarcoma, from oncogenic to therapeutic. *J Cell Biochem.* 115:625–31.
- Canale ST, Beaty JH. *Campbell's Operative orthopaedics.* (2008) 11th Edition, Volume 1. MOSBY Elsevier.
- Chakravarti S, Magnuson T, Lass LH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H. (1998) Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *Journal of Cell Biology* 141:1277–86.

- Chakravarti, S., Zhang, G., Chervoneva, I., Roberts, L., and Birk, D. E. (2006) Collagen fibril assembly during postnatal development and dysfunctional regulation in the lumican-deficient murine cornea. *Dev. Dyn.* 235, 2493–2506
- Chansky, H., Robbins, J. R., Cha, S., Raskind, W. H., Conrad, E. U., and Sandell, L. J. (1998) Expression of cartilage extracellular matrix and potential regulatory genes in a new human chondrosarcoma cell line. *J. Orthop. Res.* 16, 521–535
- Chen XD, Bian X, Teslovich TM, Stephan DA, Young MF. (2005) Dissection of the sets of genes that control the behavior of biglycan-deficient pre-osteoblasts using oligonucleotide microarrays. *Bone* 37:192–203.
- Chen XD, Fisher LW, Robey PG, Young MF. (2004) The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation. *FASEB Journal* 18:948–58.
- Chen, X. D., Allen, M. R., Bloomfield, S., Xu, T., and Young, M. (2003) Biglycan-deficient mice have delayed osteogenesis after marrow ablation. *Calcif. Tissue Int.* 72, 577–582
- Chen, X. D., Bian, X., Teslovich, T. M., Stephan, D. A., and Young, M. F. (2005) Dissection of the sets of genes that control the behavior of biglycan deficient pre-osteoblasts using oligonucleotide microarrays. *Bone* 37, 192–203
- Chen, X. D., Fisher, L. W., Robey, P. G., and Young, M. F. (2004) The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP4-induced osteoblast differentiation. *FASEB J.* 18, 948–958
- Cheng SL, Lai CF, Fausto A, Chellaiah M, Feng X, McHugh KP, et al. (2000) Regulation of alphaVbeta3 and alphaVbeta5 integrins by dexamethasone in normal human osteoblastic cells. *Journal of Cell Biochemistry* 77:265–76.

- Clevers H. (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469–80.
- Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev A. (2003) Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol.* 163:847–57.
- Corsi, A., Xu, T., Chen, X. D., Boyde, A., Liang, J., Mankani, M., Sommer, B., Iozzo, R. V., Eichstetter, I., Robey, P. G., Bianco, P., and Young, M. F. (2002) Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J. Bone Miner. Res.* 17, 1180–1189
- Couchman, J.R., and Pataki, C.A. (2012). An introduction to proteoglycans and their localization. *J Histochem Cytochem* 60, 885-897.
- Critchlow MA, Bland YS & Ashhurst DE. (1994) The effects of age on the response of rabbit periosteal osteoprogenitor cells to exogenous transforming growth factor-beta 2. *J Cell Sci.* 107:499-516.
- Csorda's, G., Santra, M., Reed, C. C., Eichstetter, I., McQuillan, D. J., Gross, D., Nugent, M. A., Hajno'czky, G., and Iozzo, R. V. (2000) Sustained downregulation of the epidermal growth factor receptor by decorin. A mechanism for controlling tumor growth in vivo. *J. Biol. Chem.* 275, 32879–32887
- D'Avis PY, Frazier CR, Shapiro JR, Fedarko NS. (1997) Age-related changes in effects of insulin-like growth factor I on human osteoblast-like cells. *Biochem J.* 324 (Pt 3):753–60.
- Danielson, K. G., Fazzio, A., Cohen, I., Cannizzaro, L. A., Eichstetter, I., and Iozzo, R. V. (1993) The human decorin gene: intron-exon organization, discovery of two

alternatively spliced exons in the 5-untranslated region, and mapping of the gene to chromosome 12q23. *Genomics* 15,46–60

- Daqian W, Chuandong W, Xinhua Q, Songtao A, Kerong D. (2015) Chimaphilin inhibits proliferation and induces apoptosis in multidrug resistant osteosarcoma cell lines through insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) signaling. *ChemBiol Interact.* 237:25–30.
- Datsis, G. A., Berdiaki, A., Nikitovic, D., Mytilineou, M., Katonis, P., Karamanos, N. K., and Tzanakakis G. N. (2011) Parathyroid hormone affects the fibroblast growth factor-proteoglycan signaling axis to regulate osteosarcoma cell migration. *FEBS J.* 278, 3782–3792
- Daughaday, W.H., and Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10, 68-91.
- De Luca, A., Santra, M., Baldi, A., Giordano, A., and Iozzo, R. V. (1996) Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* 271, 18961–18965
- Desnoyers, L., Arnott, D., and Pennica, D. (2001) WISP-1 binds to decorin and biglycan. *J. Biol. Chem.* 276, 47599–47607
- Dolhnikoff M, Morin J, Roughley PJ, Ludwig MS. (1998) Expression of lumican in human lungs. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 19:582–7.
- Douaiher, J., Succar, J., Lancerotto, L., Gurish, M.F., Orgill, D.P., Hamilton, M.J., Krilis, S.A., and Stevens, R.L. (2014). Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. *Adv Immunol* 122, 211-252.

- Fernandes JC, Rodrigues Alves APN, Machado-Neto JA, Scopim-Ribeiro R, Fenerich BA, da Silva FB, et al. (2017) IRS1/beta-catenin axis is activated and induces MYC expression in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Cell Biochem.* 118:1774–81.
- Ferrari, S., Bertoni, F., Mercuri, M., Picci, P., Giacomini, S., Longhi, A., and Bacci, G. (2001) Predictive factors of disease-free survival for non-metastatic osteosarcoma of the extremity: an analysis of 300 patients treated at the Rizzoli Institute. *Ann. Oncol.* 12, 1145–1150
- Fischgrund JS Orthopaedic Knowledge Update. (2008) American Academy of Orthopaedic Surgeons.
- Franchi A, Arganini L, Baroni G, Calzolari A, Capanna R, Campanacci D, et al. (1998) Expression of transforming growth factor beta isoforms in osteosarcoma variants: association of TGF beta 1 with high-grade osteosarcomas. *Journal of Pathology* 185:284–9.
- Franchi A, Arganini L, Baroni G, Calzolari A, Capanna R, Campanacci D, Caldora P, Masi L, Brandi ML & Zampi G. (1989) Expression of transforming growth factor beta isoforms in osteosarcoma variants: association of TGF beta 1 with high-grade osteosarcomas. *J Pathol.* 185:284-9.
- Fransvea E, Mazzocca A, Santamato A, Azzariti A, Antonaci S, Giannelli G. (2010) Kinase activation profile associated with TGF--dependent migration of HCC cells: a preclinical study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*
- Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 123, 4195-4200.
- Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., Goldfine, I.D., Belfiore, A., and Vigneri, R. (1999). Insulin receptor isoform A, a newly

recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 19, 3278-3288.

- Frysak, Zdenek, Jan Schovanek, Maurizio Iacobone, and David Karasek. (2015) “Insulin-like Growth Factors in a Clinical Setting: Review of IGF-I.” *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. <https://doi.org/10.5507/bp.2015.041>.
- Funderburgh JL, Funderburgh ML, Mann MM, Conrad GW. (1991) Arterial lumican. Properties of a corneal-type keratan sulphate proteoglycan from bovine aorta. *Journal of Biological Chemistry* 266:24773–7.
- Furlanetto, R.W., Harwell, S.E., and Frick, K.K. (1994). Insulin-like growth factor-I induces cyclin-D1 expression in MG63 human osteosarcoma cells in vitro. *Mol Endocrinol* 8, 510-517.
- Gandhi, N.S., and Mancera, R.L. (2008). The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des* 72, 455-482.
- Gassling VL, Ac, il Y, Springer IN, Hubert N, Wiltfang J. (2009) Platelet-rich plasma platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 108:48–55.
- Gebken J, Feydt A, Brinckmann J, Notbohm H, Müller PK & Bätge B. (1999) Ligand-induced downregulation of receptors for TGF-beta in human osteoblast-like cells from adult donors. *J Endocrinol*. 161:503-10.
- Geerkens, C., Vetter, U., Just, W., Fedarko, N. S., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D., Robey, P. G., Wõhrle, D., and Vogel, W. (1995) The X-chromosomal human biglycan gene BGN is subject to X inactivation but is transcribed like an X-Y homologous gene. *Hum. Genet.* 96, 44–52

- Georgopoulos NT, Kirkwood LA, Southgate J. (2014) A novel bidirectional positive feedback loop between Wnt-beta-catenin and EGFR-ERK plays a role in context-specific modulation of epithelial tissue regeneration. *J Cell Sci.* 127(Pt 13):2967–82.
- Giannelli G, Mazzocca A, Fransvea E, Lahn M, Antonaci S. Inhibiting (2010) TGF-signaling in hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Acta* .
- Goldoni, S., Humphries, A., Nystrom, A., Sattar, S., Owens, R. T., McQuillan, D. J., Ireton, K., and Iozzo, R. V. (2009) Decorin is a novel antagonistic ligand of the Met receptor. *J. Cell Biol.* 185, 743–754
- Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, Plaza-Campillo J, Scully C. (2014) Beta-catenin in oral cancer: an update on current knowledge. *Oral Oncol.* 50:818–24.
- Gori, F., Schipani, E., and Demay, M. B. (2001) Fibromodulin is expressed by both chondrocytes and osteoblasts during fetal bone development. *J. Cell. Biochem.* 82, 46–57
- Grainger, Stephanie, and Karl Willert. (2018) *Mechanisms of Wnt Signaling and Control.* Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine, March, e1422.
- Greenspan A, Jundt G. and Remagen W. (2007) *Differential Diagnosis in Orthopaedic Oncology.* 2nd Edition. Publication by Lippincott Williams & Wilkins, a wolters Kluwer business.
- Grover J, Chen XN, Korenberg JR, Roughley PJ. (1995) The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:21942–9.

- Gruber, H. E., Ingram, J., and Hanley, E. N., Jr. (2002) An improved staining method for intervertebral disc tissue. *Biotech. Histochem.* 77, 81–83 16. Egli, P. S.,
- Guidetti, G. F., Bartolini, B., Bernardi, B., Tira, M. E., Berndt, M. C., Balduini, C., and Torti, M. (2004) Binding of von Willebrand factor to the small proteoglycan decorin. *FEBS Lett.* 574, 95–100
- Hammond E, Khurana A, Shridhar V, Dredge K. (2014) The role of heparanase and sulfatases in the modification of heparan sulfate proteoglycans within the tumor microenvironment and opportunities for novel cancer therapeutics. *Front Oncol.* 4:195.
- Hansen MF, Seton M, Merchant A. (2006) Osteosarcoma in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res.* 21(Suppl. 2):P58–63.
- Hauben, E. I., Bielack, S., Grimer, R., Jundt, G., Reichardt, P., Sydes, M., Taminiu, A. H., and Hogendoorn, P. C. (2006) Clinico-histologic parameters of osteosarcoma patients with late relapse. *Eur. J. Cancer* 42, 460–466
- Hauben, E. I., Weeden, S., Pringle, J., Van Marck, E. A., and Hogendoorn, P. C. (2002) Does the histological subtype of high-grade central osteosarcoma influence the response to treatment with chemotherapy and does it affect overall survival? A study on 570 patients of two consecutive trials of the European Osteosarcoma Intergroup. *Eur. J. Cancer* 38, 1218–1225
- Hausser H, Gröning A, Hasilik A, Schönherr E & Kresse H. (1994) Selective inactivity of TGF-beta/decorin complexes. *FEBS Lett.* 353:243-5.
- Henry, S. P., Takanosu, M., Boyd, T. C., Mayne, P. M., Eberspaecher, H., Zhou, W., de Crombrughe, B., Hook, M., and Mayne, R. (2001) Expression pattern and gene characterization of asporin, a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *J. Biol. Chem.* 276, 12212–12221

- Herrmann, W., Hunziker, E. B., and Schenk, R. K. (1985) Matrix compartments in the growth plate of the proximal tibia of rats. *Anat. Rec.* 211, 246–257
- Herring JA Tachdjian's Pediatric Orthopaedics. 4th Edition Volume 1. (2008) Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
- Hildebrand, A., Romarís, M., Rasmussen, L. M., Heinegård, D., Twardzik, D. R., Border, W. A., and Ruoslahti, E. (1994) Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin, and fibromodulin with transforming growth factor. *Biochem. J.* 302, 527–534
- Hong IK, Jin YJ, Byun HJ, Jeoung DI, Kim YM, Lee H. (2006) Homophilic interactions of Tetraspanin CD151 up-regulate motility and matrix metalloproteinase-9 expression of human melanoma cells through adhesion-dependent c-Jun activation signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 281: 24279–92.
- Hu DD, Lin EC, Kovach NL, Hoyer JR, Smith JW. (1995) A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins alpha v beta 1 and alpha v beta 5. *Journal of Biological Chemistry* 270:26232–8.
- Huang, B., Zhao, J., Unkeless, J. C., Feng, Z. H., and Xiong, H. (2008) TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene* 27, 218–224
- Huvos, A. G. (1991) Bone Tumors: Diagnosis, Treatment, and Prognosis, W. B. Saunders, Philadelphia 78. Soöderstroöm, M., Boöbling, T., Ekfors, T., Nelimarkka, L., ro, H. T., and Vuorio, E. (2002) Molecular profiling of human chondrosarcomas for matrix production and cancer markers. *Int. J. Cancer* 100, 144–151
- Igwe, J. C., Gao, Q., Kizivat, T., Kao, W. W., and Kalajzic, I. (2011) Keratocan is expressed by osteoblasts and can modulate osteogenic differentiation. *Connect. Tissue Res.* 52, 401–407

- Iozzo RV, Murdoch AD. (1996) Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* 10:598–614. doi: 10.1096/fasebj.10.5. 8621059
- Iozzo, R. V. (1997) The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit. Rev. Biochem. Mol.Biol.* 32, 141–174
- Iozzo, R. V., and Murdoch, A. D. (1996) Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity. *FASEB J.* 10, 598–614
- Iozzo, R.V., and Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* 42, 11-55.
- Ishiwata T, Yamamoto T, Kawahara K, Kawamoto Y, Matsuda Y, Ishiwata S, et al. (2010) Enhanced expression of lumican inhibited the attachment and growth of human embryonic kidney 293 cells. *Experimental and Molecular Pathology* 88:363–70.
- Jaffe N, Carrasco H, Raymond K, Ayala A, Eftekhari F. (2002) Can cure in patients with osteosarcoma be achieved exclusively with chemotherapy and abrogation of surgery? *Cancer* 95:2202–10.
- Jarvelainen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T.N., and Penttinen, R. (2009). Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 61, 198-223.
- Kao WW. (2006) Ocular surface tissue morphogenesis in normal and disease states revealed by genetically modified mice. *Cornea* 25(Suppl. 1):S7–19.

- Karsdal MA, Fjording MS, Foged NT, Delaissé JM, Lochter A. (2001) Transforming growth factor-beta-induced osteoblast elongation regulates osteoclastic bone resorption through a p38 mitogen-activated protein kinase- and matrix metalloproteinase-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry* 276:39350–8.
- Kilts, T., Ameye, L., Syed-Picard, F., Ono, M., Berendsen, A. D., Oldberg, A., Heegaard, A. M., Bi, Y., and Young, M. F. (2009) Potential roles for the small leucine-rich proteoglycans biglycan and fibromodulin in ectopic ossification of tendon induced by exercise and in modulating rotarod performance. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 19, 536–546
- Kizawa, H., Kou, I., Iida, A., Sudo, A., Miyamoto, Y., Fukuda, A., Mabuchi, A., Kotani, A., Kawakami, A., Yamamoto, S., Uchida, A., Nakamura, K., Notoya, K., Nakamura, Y., and Ikegawa, S. (2005) An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat. Genet.* 37, 138–144
- Kooijman, R., Coppens, A., and Van den Keybus, C. (2006). Insulin-like growth factor-I augments interleukin-8 promoter activity through induction of activator protein-1 complex formation. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1957-1964.
- Kouvidi K, Berdiaki A, Tzardi M, Karousou E, Passi A, Nikitovic D, 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* 1860:814–24.
- Kresse, H., and Schön herr, E. (2001) Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J. Cell. Physiol.* 189, 266–274
- Kubista, B., Klingmueller, F., Bilban, M., Pfeiffer, M., Lass, R., Giurea, A., Funovics, P. T., Toma, C., Dominkus, M., Kotz, R., Thalhammer, T., Trieb, K., Zettl,

- T., and Singer, C. F. (2011) Microarray analysis identifies distinct gene expression profiles associated with histological subtype in human osteosarcoma. *Int. Orthop.* 35, 401–411
- Lai CF, Feng X, Nishimura R, Teitelbaum SL, Avioli LV, Ross FP, et al. (2000) Transforming growth factor-beta up-regulates the beta 5 integrin subunit expression via Sp1 and Smad signalling. *Journal of Biological Chemistry* 275:36400–6.
 - LeRoith, D., and Roberts, C.T., Jr. (2003). The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 195, 127-137.
 - LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., and Roberts, C.T., Jr. (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16, 143-163.
 - Leygue E, Snell L, Dotzlaw H, Hole K, Hiller-Hitchcock T, Roughley PJ, et al. (1998) Expression of lumican in human breast carcinoma. *Cancer Research* 58: 1348–52.
 - Lieberman JR. *AAOS Comprehensive Orthopaedic Review Volume 1.* (2009) American Academy of Orthopaedic Surgeons.
 - Liu Y, Zhu ST, Wang X, Deng J, Li WH, Zhang P, et al. (2016) MiR-100 inhibits osteosarcoma cell proliferation, migration, and invasion and enhances chemosensitivity by targeting IGFIR. *Technol Cancer Res Treat.* 15:NP40–8.
 - Loh, Kyle M., Renée van Amerongen, and Roel Nusse. (2016). “Generating Cellular Diversity and Spatial Form: Wnt Signaling and the Evolution of Multicellular Animals.” *Developmental Cell* 38 (6): 643–55.
 - MacDonald, Bryan T., Keiko Tamai, and Xi He. (2009). “Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases.” *Developmental Cell* 17 (1): 9–26.

- Mao J, Zhuang G, Chen Z. (2017) Genetic polymorphisms of insulin-like growth factor 1 are associated with osteosarcoma risk and prognosis. *Med Sci Monitor* 23:5892–8.
- Massagué J. (1992) Receptors for the TGF-beta family. *Cell*. 1992 69:1067-70.
- Matsuda Y, Yamamoto T, Kudo M, Kawahara K, Kawamoto M, Nakajima Y, et al. (2008) Expression and roles of lumican in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* 33:1177–85.
- McEwan PA, Scott PG, Bishop PN, Bella J. (2006) Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. *J Struct Biol*. 155:294–305.
- McEwan, P. A., Scott, P. G., Bishop, P. N., and Bella, J. (2006) Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. *J. Struct. Biol.* 155, 294–305
- Merline, R., Moreth, K., Beckmann, J., Nastase, M. V., Zeng-Brouwers, J., Tralhaõ, J. G., Lemarchand, P., Pfeilschifter, J., Schaefer, R. M., Iozzo, R. V., and Schaefer, L. (2011) Decorin deficiency in diabetic mice: aggravation of nephropathy due to overexpression of profibrotic factors, enhanced apoptosis, and mononuclear cell infiltration. *Sci. Signal.* 4, ra75
- Merline, R., Schaefer, R. M., and Schaefer, L. (2009) The matricellular functions of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs). *J. Cell Commun. Signal.* 3, 323–335
- Miao, D., Bai, X., Panda, D., McKee, M., Karaplis, A., and Goltzman, D. (2001) Osteomalacia in hyp mice is associated with abnormal phex expression and with altered bone matrix protein expression and deposition. *Endocrinology* 142, 926–939

- Miller M.D. 5th edition. Review ορθοπαιδικής. (2010) Συντονισμός-Επιμέλεια Ελληνικής έκδοσης Μπάμπης Γ.Χ. Ιατρικές εκδόσεις Κωνσταντάρας. 1^η ελληνική έκδοση.
- Mintz, M. B., Sowers, R., Brown, K. M., Hilmer, S. C., Mazza, B., Huvos, A. G., Meyers, P. A., Lafleur, B., McDonough, W. S., Henry, M. M., Ramsey, K. E., Antonescu, C. R., Chen, W., Healey, J. H., Daluski, A., Berens, M. E., Macdonald, T., Gorlick, R., and Stephan, D. A. (2005) An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma. *Cancer Res.* 65, 1748–1754
- Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH. (1991) A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO Journal* 10:1091–101.
- Mochida Y, Parisuthiman D, Kaku M, Hanai J, Sukhatme VP, Yamauchi M. (2006) Nephrocan, a novel member of the small leucine-rich repeat protein family, is an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling. *Journal of Biological Chemistry* 281:36044–51.
- Mochida, Y., Parisuthiman, D., and Yamauchi, M. (2006) Biglycan is a positive modulator of BMP2-induced osteoblast differentiation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 585, 101–113
- Mortus JR, Zhang Y, Hughes DP. (2014) Developmental pathways hijacked by osteosarcoma. *Adv Exp Med Biol.* 804:93–118.
- Moscatello, D. K., Santra, M., Mann, D. M., McQuillan, D. J., Wong, A. J., and Iozzo, R. V. (1998) Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J. Clin. Invest.* 101, 406–412

- Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I & Rifkin DB. (1997) Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int.* 51:1376-82.
- Mytilinaiou M, Nikitovic D, Berdiaki A, Kostouras A, Papoutsidakis A, Tsatsakis AM, et al. (2017) Emerging roles of syndecan 2 in epithelial and mesenchymal cancer progression. *IUBMB Life* 69:824–33.
- Naito Z. (2005) The role of small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family in pathological lesions and cancer cell growth. *Journal of Nippon Medical School* 72:137–45.
- Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Tamura M, Tanaka Y. (2003) Beta1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on osteoblasts and osteoclast maturation. *Journal of Biological Chemistry* 278:45368–74.
- Neame, P. J., Sommarin, Y., Boynton, R. E., and Heinegård, D. (1994) The structure of a 38-kDa leucine-rich protein (chondroadherin) isolated from bovine cartilage. *J. Biol. Chem.* 269, 21547–21554
- Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. (2015) Decoding the matrix: instructive roles of proteoglycan receptors. *Biochemistry* 54:4583–98.
- Nelson WJ, Nusse R. (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303:1483–7.
- Nesti LJ, Caterson EJ, Wang M, Chang R, Chapovsky F, Hoek JB, et al. (2002) TGF-beta1 calcium signaling increases alpha5 integrin expression in osteoblasts. *Journal of Orthopaedic Research* 20:1042–9.

- Nielsen, K. L., Allen, M. R., Bloomfield, S. A., Andersen, T. L., Chen, X. D., Poulsen, H. S., Young, M. F., and Heegaard, A. M. (2003) Biglycan deficiency interferes with ovariectomy-induced bone loss. *J. Bone Miner. Res.* 18, 2152–2158
- Nikitovic D, Aggelidakis J, Young MF, Iozzo RV, Karamanos NK, Tzanakakis GN. (2012) The biology of small leucine-rich proteoglycans in bone pathophysiology. *The Journal of biological chemistry.* 287(41):33926-33.
- Nikitovic D, Berdiaki A, Spyridaki I, Krasanakis T, Tsatsakis A, Tzanakakis GN. (2018) Proteoglycans-biomarkers and targets in cancer therapy. *Front Endocrinol.* 9:69.
- Nikitovic D, Berdiaki A, Zafiropoulos A, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, et al. Lumican expression is positively correlated with the differentiation and negatively with the growth of human osteosarcoma cells. *FEBS Journal* 2008;275:350–61.
- Nikitovic D, Berdiaki K, Chalkiadaki G, Karamanos N, Tzanakakis G. (2008) The role of SLRP-proteoglycans in osteosarcoma pathogenesis. *Connect Tissue Res.* 49:235–8.
- Nikitovic D, Chalkiadaki G, Berdiaki A, Aggelidakis J, Katonis P, Karamanos NK, et al. (2011) Lumican regulates osteosarcoma cell adhesion by modulating TGFbeta2 activity. *Int J Biochem Cell Biol.* 43:928–35.
- Nikitovic D, Kavasi RM, Berdiaki A, Papachristou DJ, Tsiaoussis J, Spandidos DA, et al. (2016) Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide regulate osteosarcoma cell functions: focus on the extracellular matrix (Review). *Oncol Rep.* 36:1787–92.
- Nikitovic D, Tsatsakis AM, Karamanos NK, Tzanakakis GN. (2003) The effects of genistein on the synthesis and distribution of glycosaminoglycans/proteoglycans by

two osteosarcoma cell lines depends on tyrosine kinase and the estrogen receptor density. *Anticancer Res.* 23:459–64.

- Nikitovic, D., Berdiaki, A., Zafiropoulos, A., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N. K., and Tzanakakis, G. N. (2008) Lumican expression is positively correlated with the differentiation and negatively with the growth of human osteosarcoma cells. *FEBS J.* 275, 350–361
- Nikitovic, D., Berdiaki, K., Chalkiadaki, G., Karamanos, N., Tzanakakis, G. (2008) The role of SLRP proteoglycans in osteosarcoma pathogenesis. *Connect. Tissue Res.* 49, 235–238
- Nikitovic, D., Chalkiadaki, G., Berdiaki, A., Aggelidakis, J., Katonis, P., Karamanos, N. K., and Tzanakakis, G. N. (2011) Lumican regulates osteosarcoma cell adhesion by modulating TGF-2 activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 928–935
- Nili, N., Cheema, A. N., Giordano, F. J., Barolet, A. W., Babaei, S., Hickey, R., Eskandarian, M. R., Smeets, M., Butany, J., Pasterkamp, G., and Strauss, B. H. (2003) Decorin inhibition of PDGF-stimulated vascular smooth muscle cell function: potential mechanism for inhibition of intimal hyperplasia after balloon angioplasty. *Am. J. Pathol.* 163, 869–878
- Noda M & Camilliere JJ. (1989) In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology.* 124:2991-4.
- Nuka, S., Zhou, W., Henry, S. P., Gendron, C. M., Schultz, J. B., Shinomura, T., Johnson, J., Wang, Y., Keene, D. R., Ramírez-Solis, R., Behringer, R. R., Young, M. F., and Höök, M. (2010) Phenotypic characterization of epiphycan- deficient and epiphycan/biglycan double-deficient mice. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 88–96.

- Ohta K, Lupo G, Kuriyama S, Keynes R, Holt CE, Harris WA, et al. (2004) Tsukushi functions as an organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin. *Developmental Cell* 7:347–58.
- Ohta, K., Kuriyama, S., Okafuji, T., Gejima, R., Ohnuma, S., and Tanaka, H. (2006) Tsukushi cooperates with VG1 to induce primitive streak and Hensen's node formation in the chick embryo. *Development* 133, 3777–3786
- Oldberg, A., Kalamajski, S., Salnikow, A. V., Stuhr, L., Mørgelin, M., Reed, R. K., Heldin, N. E., and Rubin, K. (2007) Collagen-binding proteoglycan fibromodulin can determine stroma matrix structure and fluid balance in experimental carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13966–13971.
- Ottaviani G, Jaffe N. (2009) The etiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res.* 152:15–32.
- Palsgaard J, Emanuelli B, Winnay JN, Sumara G, Karsenty G, Kahn CR. (2012) Cross-talk between insulin and Wnt signaling in preadipocytes: role of Wnt co-receptor low density lipoprotein receptor-related protein-5 (LRP5). *J Biol Chem.* 287:12016–26.
- Pandini, G., Frasca, F., Mineo, R., Sciacca, L., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2002). Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem* 277, 39684-39695.
- Papatheodorou, L. K., Malizos, K. N., Poultsides, L. A., Hantes, M. E., Grafanaki, K., Giannouli, S., Ioannou, M. G., Koukoulis, G. K., Protopappas, V. C., Fotiadis, D. I., and Stathopoulos, C. (2009) Effect of transosseous application of low-intensity ultrasound at the tendon graft-bone interface healing: gene expression and histological analysis in rabbits. *Ultrasound Med. Biol.* 35, 576–584

- Parisuthiman, D., Mochida, Y., Duarte, W. R., and Yamauchi, M. (2005) Biglycan modulates osteoblast differentiation and matrix mineralization. *J. Bone Miner. Res.* 20, 1878–1886
- Parkinson, T. (2008) The future of Toll-like receptor therapeutics. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 10, 21–31
- Pickup, M.W., Mouw, J.K., and Weaver, V.M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* 15, 1243-1253.
- Pietraszek-Gremplewicz K, Karamanou K, Niang A, Dauchez M, Belloy N, Maquart FX, et al. (2017) Small leucine-rich proteoglycans and matrix metalloproteinase-14: key partners? *Matrix Biol.*
- Pirskanen A, Jaaskelainen T, Maenpaa PH. (1993) Insulin-like growth factor-1 modulates steroid hormone effects on osteocalcin synthesis in human MG-63 osteosarcoma cells. *Eur J Biochem.* 218:883–91.
- Pusch, C. M., Zeitz, C., Brandau, O., Pesch, K., Achatz, H., Feil, S., Scharfe, C., Maurer, J., Jacobi, F. K., Pinckers, A., Andreasson, S., Hardcastle, A., Wissinger, B., Berger, W., and Meindl, A. (2000) The complete form of X-linked congenital stationary night blindness is caused by mutations in a gene encoding a leucine-rich repeat protein. *Nat. Genet.* 26, 324–327
- Qie, Shuo, and J. Alan Diehl. (2016) “Cyclin D1, Cancer Progression, and Opportunities in Cancer Treatment.” *Journal of Molecular Medicine* 94 (12): 1313–26.
- Qin H, Ishiwata T, Asano G. (1999) Effects of the extracellular matrix on lumican expression in rat aortic smooth muscle cells in vitro. *Journal of Pathology* 195:604–8.

- Raouf A, Ganss B, McMahon C, Vary C, Roughley PJ, Seth A. (2002) Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix. *Matrix Biology* 4:361–7.
- Raouf, A., Ganss, B., McMahon, C., Vary, C., Roughley, P. J., and Seth, A. (2002) Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix. *Matrix Biol.* 21, 361–367
- Reed, C. C., and Iozzo, R. V. (2002) The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj. J.* 19, 249–255
- Reed, C. C., Gaudie, J., and Iozzo, R. V. (2002) Suppression of tumorigenicity by adenovirus-mediated gene transfer of decorin. *Oncogene* 21, 3688–3695
- Rifkin DB. (2005) Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *Journal of Biological Chemistry* 280:7409–12.
- Riquelme, C., Larrain, J., Schonherr, E., Henriquez, J. P., Kresse, H., and Brandan, E. (2001) Antisense inhibition of decorin expression in myoblasts decreases cell responsiveness to transforming growth factor-b and accelerates skeletal muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* 276, 3589–3596
- Rucci, N., Rufo, A., Alamanou, M., Capulli, M., Del Fattore, A., Ahrman, E., Capece, D., Iansante, V., Zazzeroni, F., Alesse, E., Heinegård, D., and Teti, A. (2009) The glycosaminoglycan-binding domain of PRELP acts as a cell type-specific NF-B inhibitor that impairs osteoclastogenesis. *J. Cell Biol.* 187, 669–683
- Saika S, Shiraishi A, Liu CY, Funderburgh JL, Kao CW, Converse RL, et al. (2000) Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing. *Journal of Biological Chemistry* 275:2607–12.

- Sanders, E. J., Walter, M. A., Parker, E., Aramburo, C., and Harvey, S. (2003) Opticin binds retinal growth hormone in the embryonic vitreous. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 5404–5409
- Santra, M., Mann, D. M., Mercer, E. W., Skorski, T., Calabretta, B., and Iozzo, R. V. (1997) Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J. Clin. Invest.* 100, 149–157
- Saraceno GE, Bellini MJ, Garcia-Segura LM, Capani F. (2018) Estradiol activates PI3K/Akt/GSK3 pathway under chronic neurodegenerative conditions triggered by perinatal asphyxia. *Front Pharmacol.* 9:335.
- Satyamoorthy K, LiG, Vaidya B, PatelD, HerlynM. (2001) Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways. *Cancer Res.* 61:7318–24.
- Schaefer L, Grone HJ, Raslik I, Robenek H, Ugorcakova J, Budny S, et al. (2000) Small proteoglycans of normal adult human kidney: distinct expression patterns of decorin, biglycan, fibromodulin, and lumican. *Kidney International* 58: 1557–68.
- Schaefer L, Tredup C, Gubbiotti MA, Iozzo RV. (2017) Proteoglycan neofunctions: regulation of inflammation and autophagy in cancer biology. *FEBS J.* 284:10–26.
- Schaefer, L., and Iozzo, R. V. (2008) Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J. Biol. Chem.* 283, 21305–23109
- Schaefer, L., and Schaefer, R.M. (2010). Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res* 339, 237-246.

- Schaefer, L., Babelova, A., Kiss, E., Hausser, H. J., Baliova, M., Krzyzankova, M., Marsche, G., Young, M. F., Mihalik, D., Goette, M., Malle, E., Schaefer, R. M., and Groner H. J. (2005) The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J. Clin. Invest.* 115, 2223–2233
- Schaefer, L., Raslik, I., Groner, H. J., Schonherr, E., Macakova, K., Ugorcakova, J., Budny, S., Schaefer, R. M., and Kresse, H. (2001) Small proteoglycans in human diabetic nephropathy: discrepancy between glomerular expression and protein accumulation of decorin, biglycan, lumican, and fibromodulin. *FASEB J.* 15, 559–561
- Schmid C, Ghirlanda C, Niessen M. (2017) Prevention of tumour cell apoptosis associated with sustained protein kinase B phosphorylation is more sensitive to regulation by insulin signalling than stimulation of proliferation and extracellular signal-regulated kinase. *Mol Cell Biochem.* 432:41–54.
- Schonherr, E., Broszat, M., Brandan, E., Bruckner, P., and Kresse, H. (1998) Decorin core protein fragment Leu-155–Val-260 interacts with TGF- β but does not compete for decorin binding to type I collagen. *Arch. Biochem. Biophys.* 355, 241–248
- Schonherr, E., Sunderkotter, C., Iozzo, R. V., and Schaefer, L. (2005) Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system. *J. Biol.Chem.* 280, 15767–15772
- Schulz, A., Loreth, B., Battmann, A., Knoblauch, B., Stahl, U., Pollex, U., and Bohle, R. M. (1998) Bone matrix production in osteosarcoma. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 82, 44–53
- Shang S, Hua F, Hu ZW. (2017) The regulation of beta-catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget* (8:33972–89).

- Shimizu-Hirota, R., Sasamura, H., Kuroda, M., Kobayashi, E., and Saruta, T. (2004) Functional characterization of podocan, a member of a new class in the small leucine-rich repeat protein family. *FEBS Lett.* 563, 69–74
- Schaefer, L., and Schaefer, R. M. (2010) Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *Cell Tissue Res.* 339, 37–46
- Shintani, K., Matsumine, A., Kusuzaki, K., Morikawa, J., Matsubara, T., Wakabayashi, T., Araki, K., Satonaka, H., Wakabayashi, H., Iino, T., and Uchida, A. (2008) Decorin suppresses lung metastases of murine osteosarcoma. *Oncol. Rep.* 19, 1533–1539
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D’Amico M, Pestell R, et al. (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:5522–7.
- Siegel PM, Massagué J. (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 3:807-21.
- Singh, K., Masuda K, Thonar, E. J., An, H. S., Cs-Szabo, G. (2009) Age related changes in the extracellular matrix of nucleus pulposus and annulus fibrosus of human intervertebral disc. *Spine* 34, 10–16
- Ständer M, Naumann U, Dumitrescu L, Heneka M, Löschmann P, Gulbins E, et al. (1998) Decorin gene transfer-mediated suppression of TGF-beta synthesis abrogates experimental malignant glioma growth in vivo. *Gene Therapy* 5:1187–94.
- Ständer M, Naumann U, Wick W, Weller M. (1999) Transforming growth factor-beta and p-21: multiple molecular targets of decorin-mediated suppression of neoplastic growth. *Cell Tissue Research* 296:221–7.
- Stoller D.W. (2008) *Atlas of Orthopaedics and Sports Medicine.* Publication by Lippincott Williams & Wilkins, a wolters Kluwer business.

- Stoller D.W. (2007) *Magnetic Resonance Imaging in Orthopaedics and Sports Medicine*. 3rd Edition. Volume 2. Publication by Lippincott Williams & Wilkins, a wolters Kluwer business.
- Strauss, L. G., Dimitrakopoulou-Strauss, A., Koczan, D., Bernd, L., Haberkorn, U., Ewerbeck, V., and Thiesen, H. (2004) 18F-FDG kinetics and gene expression in giant cell tumors. *J. Nucl. Med.* 45, 1528–1535
- Subbarayan K, Seliger B. (2018) Tumor-dependent effects of proteoglycans and various glycosaminoglycan synthesizing enzymes and sulfotransferases on patients' outcome. *Curr Cancer Drug Targets*.
- Sztrolovics R, Alini M, Mort JS, Roughley PJ. (1999) Age related changes in fibromodulin and lumican in human intervertebral discs. *Spine* 24:1765–71.
- Tahir SA, Yang G, Goltsov A, Song KD, Ren C, Wang J, et al. (2013) Caveolin-1-LRP6 signaling module stimulates aerobic glycolysis in prostate cancer. *Cancer Res.* 73:1900–11.
- Takeuchi, Y., Kodama, Y., and Matsumoto, T. (1994) Bone matrix decorin binds transforming growth factor- and enhances its bioactivity. *J. Biol. Chem.* 269, 32634–32638
- Tamura Y, Takeuchi Y, Suzawa M, Fukumoto S, Kato M, Miyazono K, et al. (2001) Focal adhesion kinase activity is required for bone morphogenetic protein—Smad1 signaling and osteoblastic differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *Journal of Bone Mineral Research* 16:1772–9.
- Troup S, Njue C, Kliewer EV, Parisien M, Roskelley C, Chakravarti S, et al. (2003) Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. *Clinical Cancer Research* 9:207–14.

- Tufvesson, E., and Westergren-Thorsson, G. (2002) Tumor necrosis factor - interacts with biglycan and decorin. *FEBS Lett.* 530, 124–128
- Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of betacatenin. *EMBO J.* (2012) 31:2714–36. doi: 10.1038/emboj.2012.150 34. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* (1999) 398:422–6.
- Vanderploeg, E. J., Wilson, C. G., Imler, S. M., Ling, C. H., and Levenston, M. E. (2012) Regional variations in the distribution and colocalization of extracellular matrix proteins in the juvenile bovine meniscus. *J. Anat.* 221,174–186
- Vecchione A, Marchese A, Henry P, Rotin D, Morrione A. (2003) The Grb10/Nedd4 complex regulates ligand-induced ubiquitination and stability of the insulin-like growth factor I receptor. *Mol Cell Biol.* 23:3363–72.
- Vij, N., Roberts, L., Joyce, S., and Chakravarti, S. (2004) Lumican suppresses cell proliferation and aids Fas-Fas ligand-mediated apoptosis: implications in the cornea. *Exp. Eye Res.* 78, 957–971
- Waddington, R. J., Roberts, H. C., Sugars, R. V., and Schönher, E. (2003) Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *Eur. Cell Mater.* 6, 12–21
- Wang, X., Harimoto, K., Xie, S., Cheng, H., Liu, J., and Wang, Z. (2010) Matrix protein biglycan induces osteoblast differentiation through extracellular signal-regulated kinase and Smad pathways. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 1891–1897
- Werner H, Sarfstein R, LeRoith D, Bruchim I. (2016) Insulin-like growth factor 1 signaling axis meets p53 genome protection pathways. *Front Oncol.* 6:159.

- Wiesel S.W. Operative techniques in Orthopaedic Surgery Volume 2. (2011) Publication by Lippincott Williams & Wilkins, a wolters Kluwer business.
- Xie D, Zheng GZ, Xie P, Zhang QH, Lin FX, Chang B, et al. (2017) Antitumor activity of resveratrol against human osteosarcoma cells: a key role of Cx43 and Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Oncotarget* 8:111419–32.
- Xu C, Xie D, Yu SC, Yang XJ, He LR, Yang J, et al. (2013) Beta-catenin/POU5F1/SOX2 transcription factor complex mediates IGF-I receptor signaling and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 73:3181–9.
- Xu, T., Bianco, P., Fisher, L. W., Longenecker, G., Smith, E., Goldstein, S., Bonadio, J., Boskey, A., Heegaard, A. M., Sommer, B., Satomura, K., Dominguez, P., Zhao, C., Kulkarni, A. B., Robey, P. G., and Young, M. F. (1998) Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosislike phenotype in mice. *Nat. Genet.* 20, 78–82
- Yamaguchi H, Hsu JL, Hung MC. (2012) Regulation of ubiquitination-mediated protein degradation by survival kinases in cancer. *Front Oncol.* 2:15.
- Yang X, Wang L, Wang Q, Li L, Fu Y, Sun J. (2018) MiR-183 inhibits osteosarcoma cell growth and invasion by regulating LRP6-Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 496:1197–203.
- Yao KE, Tan J, Ye P, Wang K, Xu W, ShenTu X, et al. (2007) Integrin beta1-mediated signaling is involved in transforming growth factor-beta2-promoted migration in human lens epithelial cells. *Molecular Vision* 13:1769–76.
- Yoshioka, N., Inoue, H., Nakanishi, K., Oka, K., Yutsudo, M., Yamashita, A., Hakura, A., and Nojima, H. (2000) Isolation of transformation suppressor genes by

cDNA subtraction: lumican suppresses transformation induced by v-src and v-K-ras.

J. Virol. 74, 1008–1013

- Young MF, Bi Y, Ameye L, Chen XD. (2002) Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases. *Glycoconjugate Journal* 19:257–62.
- Young, A. A., Smith, M. M., Smith, S. M., Cake, M. A., Ghosh, P., Read, R. A., Melrose, J., Sonnabend, D. H., Roughley, P. J., and Little C. B. (2005) Regional assessment of articular cartilage gene expression and small proteoglycan metabolism in an animal model of osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 7, R852–R86143.
- Young, M. F., Bi, Y., Ameye, L., and Chen, X. D. (2002) Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases. *Glycoconj. J.* 19, 257–26252.
- Yu Y, Harris RI, Yang JL, Anderson HC, Walsh WR. (2004) Differential expression of osteogenic factors associated with osteoinductivity of human osteosarcoma cell lines. *Journal of Biomedical Material Research A* 70:122–8.
- Yun MS, Kim SE, Jeon SH, Lee JS, Choi KY. Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation. *J Cell Sci.* (2005) 118(Pt 2):313–22.
- Zafiropoulos, A., Nikitovic, D., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N. K., and Tzanakakis, G. N. (2008) Decorin-induced growth inhibition is overcome through protracted expression and activation of epidermal growth factor receptors in osteosarcoma cells. *Mol. Cancer Res.* 6, 785–794
- Zeltz C, Brézillon S, Käpylä J, Eble JA, Bobichon H, Terryn C, et al. (2010) Lumican inhibits cell migration through $\alpha 21$ integrin. *Experimental Cell Research* 316:2922–31.
- Zhang, G., Ezura, Y., Chervoneva, I., Robinson, P. S., Beason, D. P., Carine, E. T., Soslowsky, L. J., Iozzo, R. V., and Birk, D. E. (2006) Decorin regulates assembly of

collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development. *J. Cell. Biochem.* 98, 1436–1449

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΙΩΑΝΝΗΣ ΑΓΓΕΛΙΔΑΚΗΣ ΤΟΥ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ
ΓΕΝΝΗΣΗ: 25/06/1971
ΟΙΚ. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: ΕΓΓΑΜΟΣ ΜΕ ΤΡΙΑ ΠΑΙΔΙΑ
Δ/ΣΗ ΜΟΝΙΜΗΣ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ ΚΟΡΑΚΑ 129 ΜΟΙΡΕΣ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ
ΤΗΛΕΦΩΝΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ: ΟΙΚΙΑ 2892500068
ΙΑΤΡΕΙΟ 2892022204
ΚΙΝ.- 6945756559
E-MAIL : giannis.aggelidakis@yahoo.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ:

- 1989** Απολυτήριο Λυκείου Μοιρών Ηρακλείου
- 1998** Δίπλωμα Ιατρικής Σχολής Παν/μίου ΝΙΣ, ΓΙΟΥΚΟΣΛΑΒΙΑΣ .
Διπλωματική εργασία : Η Ψυχολογική Υποστήριξη σε Άτομα Τρίτης Ηλικίας
(Έδρα Κοινωνικής Ιατρικής, Παν. Νις, επιβλέπων καθ. κ Β. DURIC'
- 2002** Ισοτιμία με Ελληνικό πτυχίο Ιατρικής απο το ΔΙΚΑΤΣΑ (Αρ Πράξης: 10-194/2002)
Αθήνα 22 Ιουνίου 2002
- 2010-2011** Παρακολούθηση Μεταπτυχιακών μαθημάτων του προγράμματος
Μεταπτυχιακών σπουδών Δημόσια Υγεία & Διοίκηση Υπηρεσιών Υγείας, 1.
Διατροφή & Ασφάλεια Τροφίμων (υπευθ. Καθ. Α. Καφάτος), 2. Ειδικά θέματα
Επιδημιολογίας & Οργάνωση Υπηρεσιών Υγείας (υπευθ. Αναπλ. Καθ. Ν.
Τζανάκης)
- 2011** Έναρξη εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής στο ΠΑ.Γ.Ν.Η, 16/02/2011
- 2014-2015** Επιμόρφωση, «Διαγνωστικές και Θεραπευτικές προσεγγίσεις του 21^{ου} αιώνα
στην αναλυτική, εγκληματολογική και περιβαλλοντική Τοξολογία», Ηράκλειο Κρήτης
- 2016** Αποκτηση τίτλου Βελονισμού Μυοσκελετικού για επαγγελματίες Υγείας, 20 Ιουλίου
2016, (εκπαίδευση ενός έτους, 260 ώρες), υπευθ. Καθ. Ι. Buratinos.

ΓΝΩΣΗ ΞΕΝΩΝ ΓΛΩΣΣΩΝ: Αγγλικά (επίπεδο Β2),
Σερβοκροατικά

ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ /ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ / ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

1. **14/8/2002 έως 14/11/2002** Τρίμηνη θητεία – εκπαίδευση για την εκπλήρωση υπηρεσίας υπαίθρου στα τμήματα: Παθολογία, Καρδιολογία, Χειρουργική στο ΒΕΝΙΖΕΛΕΙΟ - ΠΑΝΑΝΕΙΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ (Αρ. Απόφασης: Υ 10γ/οικ 74097/25/7/2002)
2. **14/11/2002 έως 14/11/2003** Αγροτικός Ιατρός και Ελεγκτής Ιατρός του δημοσίου στο ΚΕΝΤΡΟ ΥΓΕΙΑΣ ΜΟΙΡΩΝ (Αρ. Απόφασης: Υ 10γ/οικ 74097/25/7/2002)
3. **18/05/2004 έως 12/08/2004:** Παρακολούθηση των εργασιών του χειρουργικού τμήματος με άμισθη συμμετοχή ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΡΕΘΥΜΝΟΥ (Αρ. Απόφασης ΣΔ : 338/28-7-04)
4. **12/08/2004 εως 11/05/2005:** Έναρξη χρόνου χειρουργικής για την ειδικότητα Ορθοπαιδικής (9μηνη άσκηση στην Χειρουργική Κλινική – δ/ντης Κρ. Δασκαλάκης από ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΡΕΘΥΜΝΟΥ (Αρ. Απόφασης: Υ 10δ/66993/5-8-04)
5. **12/05/2005 έως 05/06/2006** έμμισθος υπεράριθμος ειδικευόμενος στην Ορθοπαιδική κλινική (2 εξάμηνα) : – δ/ντής Δ.Π. Μιχαηλίδης. ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΡΕΘΥΜΝΟΥ Πράξη Διοικητή 302 (Αρ. Απόφασης: Ν2606/98 ΦΕΚ.89/Α/98)
6. **9/06/2006 έως 08/12/2007** ειδικευόμενος Ορθοπαιδικής ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΡΕΘΥΜΝΟΥ : (Αρ. Απόφασης: Υ 10δ/65156/31-5-06)
7. **08/12/2007 έως 09/04/2007** έμμισθος υπεράριθμος ειδικευόμενος στην Ορθοπαιδική κλινική Γ.Ν. ΡΕΘΥΜΝΟΥ
8. **01/05/2008 έως 03/06/2008:** Παρακολούθηση των εργασιών του ορθοπεδικού τμήματος με άμισθη συμμετοχή στο ΠΑ.Γ.Ν.Η.
9. **03/06/2008** ειδικευόμενος Ορθοπαιδικής ΠΑ.Γ.Ν.Η (συνέχεια ειδικότητας)
10. **26/01/2012** ΤΙΤΛΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗΣ
11. **03/03/2012** ΕΝΑΡΞΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ ΩΣ ΙΔΙΩΤΗΣ ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΟΣ ΙΑΤΡΟΣ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ:

1. Injury Extra 40 (2009)178-181 Reconstruction of the heel shape and volume using V.A.C.: An innovative method

(*O.Castana,G.Rembelos,G.Anagiotos,J.Aggelidakis,O.Kiskira,D.Alexakis*)

2. JBJS 2009 Journal Of Bone and Joint Surgery

181 comparison of one-stage and two stage bilateral total knee arthroplasties for osteoarthritis (S.Likoudis, I.Koutroumpas, G.Tzoanos, I. Aggelidakis, K. Balalis)

3. JPES 2012 Journal Of Physical Education and Sport

Biomechanical Evaluation of the Push-Up Exercise of the Upper Extremities from Various Starting Points TOPALIDOU ANASTASIA, DAFOPOULOU GEORGINA, KLERKOU EIRINI-EROFILI, AGGELIDAKIS JOHN, BEKRIS EVAGGELOS, SOTIROPOULOS ARISTOMENIS

4. The biology of small leucine-rich proteoglycans in bone pathophysiology.

Nikitovic D, Aggelidakis J, Young MF, Iozzo RV, Karamanos NK, Tzanakakis GN, *J Biol. Chem.* 2012 Oct.5

5. Limb Salvage After Gas Gangrene: A Case Report and Review of the literature,

Aggelidakis J, Lasithiotakis K, Topalidou A, Koutroumbas J, Kouvidis G, Katonis P, *World J. Emerg. Surg.* 2011 Aug.17

6. Lumican regulates osteosarcoma cell adhesion by modulating TGF β 2 activity,

Nikitovic D, Chalkiadaki G, Berdiaki A, Aggelidakis J, Katonis P, Karamanos NK, Tzanakakis GN, *Int. J Biochem Cell Biol.* 2011 Mar. 21

7. Biglycan through a LRP6/ β -catenin/IGF-IR signaling axis regulates MG63

osteosarcoma cell growth, *Frontiers in Oncology*, Original Research, John Aggelidakis, Aikaterini Berdiaki, Dragana Nikitovic, Antonis Papoutsidakis, Dionysis Papachristou, Aristidis M Tsatsakis, George N Tzanakakis, *Front Oncol* 2018 Oct 23

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ-ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ:

1. Τραύμα από τροχαία ατυχήματα: Η αντιμετώπιση σε Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Παρασκάκης Στ., Αγγελιδάκης Ι., Σπυριδάκης Κ., Δασκαλάκης Κρ.

Προφ. Ανακοίνωση στο 3ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Τραύματος και Επείγουσας Χειρουργικής, Αθήνα, 25-27 Φεβρ.2005

2. Λαπαροσκοπική αντιμετώπιση συγγενών κύστεων ήπατος.

Δασκαλάκης Κρ., Αγγελιδάκης Ι., Δασκαλάκη Δεσπ., Καραβιτάκης Μάρκος., Μυριοκεφαλιτάκη Ε., Παρασκάκης Στ.

Προφ. Ανακοίνωση στο 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροσκοπικής Χειρουργικής.

Ιωάννινα, 19-22 Μαΐου 2005

3. Διαγνωστική και Θεραπευτική Προσέγγιση στα Τραύματα Άκρας Χειρός: Εμπειρία από 387 περιπτώσεις

Δασκαλογιαννάκης Ε, Αγγελιδάκης Ι, Τζιβγούλης Σ, Ανδρεαδάκης Α, Μιχαηλίδης Δ

Προφ. Ανακοίνωση στο 13ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο με Διεθνή Συμμετοχή και 21 μόρια συνεχιζόμενης εκπαίδευσης. Ηράκλειο 9-12 Νοεμ 2006

4. Η Χειρουργική Αντιμετώπιση των Καταγμάτων Μετακαρπίων και Φαλάγγων Ακρας Χειρός, Δασκαλογιαννάκης Ε., Τσιβγούλης Σ., Αγγελιδάκης Ι. Ανδρεαδάκης Α., Μιχαηλίδης Δ., Ανακοινώθηκε στο 13ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο με Διεθνή Συμμετοχή και 21 μόρια συνεχιζόμενης εκπαίδευσης. Ηράκλειο 9-12 Νοεμ 2006

5. ΓΕΝΙΚΗ Η΄ ΠΕΡΙΟΧΙΚΗ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑ ΓΙΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΙΣΧΙΟΥ-ΕΝΑ ΑΜΦΙΛΕΓΟΜΕΝΟ ΖΗΤΗΜΑ.

Κωστάκη Μ., Διαμαντάκη Ε., Αγγελιδάκης Ι., Τσιβγούλης Σ., Βροντάκη Ε., Πολίτη Κ. Ανακοινώθηκε στο 17ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΟΛΟΓΙΑΣ στις 9-13 Μαΐου 2007 Αθήνα, Athens Hilton

6. Η θέση της πρωτοβάθμιας φροντίδας υγείας στην πρόληψη των καταγμάτων ισχίου. Σ. Καστρινάκης, Μ. Κουρτζέλη, Ε. Δασκαλογιαννάκης, Ι. Αγγελιδάκης, Γ. Δάτσης, Α. Ανδρεαδάκης, Δ. Μιχαηλίδης. Ορθοπαιδική Κλινική Γενικό Νοσοκομείο Ρεθύμνου. Ανακοινώθηκε στο 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Προληπτικής Ιατρικής Αθήνα, 24-26 Ιαν 2008 στην Αίγλη Ζαπείου. και 15 μόρια συνεχιζόμενης εκπαίδευσης.

7. Η ΑΜΕΣΗ ΧΡΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΑΥΤΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ ΜΕΡΙΚΟΥ ΠΑΧΟΥΣ ΣΤΑ ΕΛΛΕΙΜΑΤΑ ΑΚΡΑΣ ΧΕΙΡΟΣ. Αγγελιδάκης Ι., Δασκαλογιαννάκης Ε., Τσιβγούλης Σ., Κουρτσέλη Μ., Ανδρεαδάκης Α., Μιχαηλίδης ΔΠ (Ορθοπαιδική Κλινική Ρεθύμνου). **Αναρτημένη ανακοίνωση** στο 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Επούλωσης Τραυμάτων και Ελκών, στις 15-17 Μαρτίου 2007.

8. ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΟΣ ΑΚΡΩΤΗΡΙΑΣΜΟΣ ΚΝΗΜΗΣ. ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΚΟΛΟΒΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΑΝΑΣΤΡΟΦΟ ΚΡΗΜΝΟ ΓΑΣΤΡΟΚΝΗΜΙΟΥ ΚΑΙ ΚΑΛΥΨΗ ΜΕ ΔΕΡΜΑΤΙΚΑ ΑΥΤΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ ΜΕΡΙΚΟΥ ΠΑΧΟΥΣ. Δασκαλογιαννάκης Ε., Αγγελιδάκης Ι., Τσιβγούλης Σ., Μπαλαμάτσης Ζ., Κουρτσέλη Μ., Ανδρεαδάκης Α., Μιχαηλίδης ΔΠ. (Ορθοπαιδική Κλινική Ρεθύμνου). **Αναρτημένη ανακοίνωση** στο 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Επούλωσης Τραυμάτων και Ελκών, στις 15-17 Μαρτίου 2007.

9. Η ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΓΚΑΥΜΑΤΟΣ ΣΕ ΝΕΥΡΟΠΑΘΗΤΙΚΟ ΔΙΑΒΗΤΙΚΟ ΠΟΔΙ ΚΑΙ Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΔΙΑΣΩΣΗ ΑΥΤΟΥ. Καστανά Ο., Αναγιωτός Γ., Ρέμπτελος Γ., Αγγελιδάκης Ι., Κισκήρα Ο., Αποστόλου Χρ., Αλεξάκης Δ. **Ελεύθερη Ανακοίνωση** στο 4^ο Πανελλήνιο συνέδριο επούλωσης τραυμάτων και ελκών Αθήνα 2-4 Απριλ 2009.

10. ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΠΤΕΡΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ V.A.C., Αλεξάκης Δ., Ρέμπελος Γ., Κισκήρα Ο., Αγγελιδάκης Ι., Κωνσταντόπουλος Δ., Γιαννακίδου Μ., Καστανά Ο. **Ελεύθερη Ανακοίνωση** στο 4^ο πανελλήνιο συνέδριο επούλωσης τραυμάτων και ελκών Αθίνα 2-4 Απρίλ 2009.

11. ΧΡΗΣΗ ΞΕΝΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΧΟΡΙΟΥ ΓΙΑ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΙΣΤΙΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΑΤΩΝ. Καστανά Ο., Αγγελιδάκης Ι., Αλεξάκης Δ.
Τμήμα Πλαστικής και Επανορθωτικής Χειρουργικής, Γ.Ν.Α<<ο Ευαγγελισμός >> **Αναρτημένη ανακοίνωση** στο 11ο Πανελλήνιο Πολυθεματικό Συνέδριο στο Ηράκλειο της Κρήτης 1-3 Μαΐου 2009.

12. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ V.A.C ΓΙΑ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΙΣΤΙΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΑΤΩΝ. Αγγελιδάκης Ι., Καστανά Ο., Αλεξάκης Δ.
Τμήμα Πλαστικής και Επανορθωτικής Χειρουργικής, Γ.Ν.Α<<ο Ευαγγελισμός >> **Αναρτημένη ανακοίνωση** στο 11ο Πανελλήνιο Πολυθεματικό Συνέδριο στο Ηράκλειο της Κρήτης 1-3 Μαΐου 2009.

13. Η ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΕΛΛΕΙΜΑΤΩΝ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΤΩ ΑΚΡΩΝ-ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΣΤΗΝ ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΤΟΥ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ. Αγγελιδάκης Ι., Καστανά Ο., Δημούτσος., Αλεξάκης Δ., Τμήμα Πλαστικής και Επανορθωτικής Χειρουργικής, Γ.Ν.Α<<ο Ευαγγελισμός >> **Αναρτημένη ανακοίνωση** στο 11ο Πανελλήνιο Πολυθεματικό Συνέδριο στο Ηράκλειο της Κρήτης 1-3 Μαΐου 2009.

14. Η ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΡΟΦΟΥ ΔΕΡΜΟΠΕΡΙΤΟΝΑΙΚΟΥ ΚΡΗΜΝΟΥ ΤΗΣ ΓΑΣΤΡΟΚΝΗΜΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΛΛΕΙΜΑΤΩΝ ΜΕΣΟΥ ΚΑΙ ΚΑΤΩ ΤΡΙΤΗΜΟΡΙΟΥ ΚΝΗΜΗΣ. Αλεξάκης Δ., Αγγελιδάκης Ι., Καστανά Ο.
Τμήμα Πλαστικής και Επανορθωτικής Χειρουργικής, Γ.Ν.Α<<ο Ευαγγελισμός >> **Αναρτημένη ανακοίνωση** στο 11ο Πανελλήνιο Πολυθεματικό Συνέδριο στο Ηράκλειο της Κρήτης 1-3 Μαΐου 2009.

15. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΡΘΡΟΠΛΑΣΤΙΚΗΣ ΓΟΝΑΤΟΣ ΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΕ ΕΝΑ ΚΑΙ ΔΥΟ ΧΡΟΝΟΥΣ.
(Σ.Λυκούδης, Ι.Κουτρομπας, Γ.Τζοάνος, Ι.Αγγελιδάκης, Κ.Μπαλαλής, Π.Κατώνης

Προφορική ανακοίνωση στο 65ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο 7-10 Οκτ 2009

16. ΚΥΦΟΠΛΑΣΤΙΚΗ ΜΙΑ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ ΣΠΟΝΔΥΛΙΚΗΣ ΣΤΗΛΗΣ. (Σ.Λυκούδης, Ν.Μανιδάκης, Ι.Αγγελιδάκης, Θ.Τοσουνίδης, Ν.Πάσκου,

Π.Κατώνης, **Προφορική ανακοίνωση** στο 65ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο 7-10 Οκτ 2009

17. ΑΡΘΡΟΣΚΟΠΗΣΗ ΓΟΝΑΤΟΣ ΜΕ ΤΟΠΙΚΗ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑ :ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΜΠΕΙΡΙΑΣ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

(Γ.Τζοάνος,Γ.Κουβίδης,Ι.Κουτρούμπας,Ι.Αγγελιδάκης,Π.Κατώνης.

Προφορική ανακοίνωση 29^ο Ετήσιο Συνέδριο Ο.Τ.Ε.ΜΑ.Θ Αλεξανδρούπολη 7-10 Απριλ2010

18. Posterior decompression and fusion for the management of cervical spondylotic myelopathy affecting multiple levels, (Manidakis Nikolaos,Kakavelakis Kyriakos,Georgioy

Nikiforos,Aggelidakis Ioannis,Hatzipavlis Georgios,Katonis Pavlos **Προφορική ανακοίνωση**

World Spine V & World Spine 2010 . Hands On Course Santorini 7-9 May 2010

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ -ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ- ΗΜΕΡΙΔΩΝ:

1998 Σεμινάριο «Health impacts of waste management policies», Trans European Environmental Educational (TREEE) και Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, 12 – 14 Νοεμ Κως

2003 13^ο Παγκρήτιο Πανεπιστημιακό Παιδιατρικό Συμπόσιο στο ΠΑ.ΓΝΗ, Ηράκλειο Κρήτης στις 16 / 03 / 2003. (Πρόγραμμα συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης (8 μόρια).

2003 Ημερίδα “ΙΑΤΡΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΗΜΕΡΑ : ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ” στο Γ. Ν. Η. _BENIZELEIO – ΠΑΝΑΝΕΙΟ_, τμήμα Υπολογιστικής Τομογραφίας, 10 Μαΐου στο Ηράκλειο.

2003 8^ο Πανελλήνιο Πολυθεματικό Συνέδριο Κρήτης, που οργανώθηκε από την Χειρουργική Ορθοπεδική & Τραυματολογική Εταιρεία Κρήτης, 23-25 Μαΐου στα Χανιά

2003 13^ο Συμπόσιο Καρδιολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Κρήτης, με θέμα “ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΑ”, στο Ηράκλειο Κρήτης,4-6 Ιουλίου.

2003 Σεμινάριο με θέμα _BREAST DISEASES & PRIMARY HEALTH CARE: WHO CAN DO WHAT, WHEN AND HOW, που οργανώθηκε από το Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χειρουργικής Ογκολογίας στις 4-5 Οκτ στο Ηράκλειο, Κρήτης

2004 2^ο Σεμινάριο Χειρουργικής Ανατομικής Χεριού με πρακτική άσκηση ως :

παρατηρητής ,στις 28-31 Οκτωβρίου στο Μέτσοβο

- 2004** *1st Pancretan Conference on Psychiatric Reform in Greece:Current Devopments and Future Perspectivs in Mental Helth*, 8-9 Μαΐου στο Ηράκλειο Κρήτης
- 2004** Ημερίδας με θέμα<<ΤΑ ΡΕΥΜΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΠΡΑΞΗ>>, 22 Μαΐου στο Ηράκλειο Κρήτης
- 2005** 3ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Τραύματος & Επείγουσας Ιατρικής, 25-27 Φεβρουαρίου στην Αθήνα.
- 2005** 1ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο με θεμα:<<Οι Διαταραχές της Οξεοβασικής Ισορροπίας και των ηλεκτρολυτών στις 26 Φεβρουαρίου στην Αθήνα
- 2005** 9ο Πολυθεματικό Ορθοπαιδικό Συνέδριο της χειρουργικής Ορθοπαιδικής Τραυματολογικής Εταιρίας Κρήτης στις 17-19 Ιουνίου στην Αγία Πελαγία Κρήτης.
- 2005** 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Επούλωση Τραυμάτων και Ελκών,(15 μόρια), *συνεχιζόμενης εκπαίδευσης* και συμμετοχή σε 3 κλινικά φροντιστήρια:
- 1.ΝΕΚΡΩΤΙΚΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΕΣ (23/09/2005)
 - 2.ΕΓΚΑΥΜΑ ,(24/09/2005)
 - 3.ΔΙΑΒΗΤΙΚΟ ΠΟΔΙ (24/09/2005)
 - 4.Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΣΤΗΝ ΕΠΟΥΛΩΣΗ (25/09/2005)
- Αθήνα Ευγενίδιο Ίδρυμα.
- 2006** Ημερίδα με θέμα : «Συνήθη παιδωτολαρυγγολογικά προβλήματα– Παράλυση του Προσωπικού Νεύρου» από την Ω Ρ Λ κλινική Ρεθύμνου, 11 Μαρτίου στο Ρέθυμνο.
- 2006** Ημερίδα με θέμα: «ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ» που διοργάνωσε: Η Ελληνική Εταιρεία Λοιμώξεων με 4 μόρια συνεχιζόμενης εκπαίδευσης στις 18 Μαρτίου 2006
- 2006** 8th INTERNATIONAL CONGRESS OF SPORTS MEDICINE ASSOCIATION, GREECE & 5th GREEK –CYPRIOT SPORTS MEDICINE CONGRESS, 12-14 Μαΐου και παρακολούθηση του Εφαρμοσμένου Φροντιστηρίου με Πρακτική Άσκηση με θέμα «Περιδέσεις σε Αθλητικές Κακώσεις», 11 Μαΐου.
- 2006** « Μετεκπαιδευτικό Ορθοπαιδικό Σεμινάριο Κρήτης» με Διεθνή Συμμετοχή (15 μόρια), συνεχιζόμενη εκπαίδευση, 9-11 Ιουνίου, Αγ Πελαγία Ηρακλείου Κρήτης
- 2006** 13ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο με 21 μόρια συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης, 9-12 Νοέμβριο στο Ηράκλειο Κρήτης

- 2007** 14^ο Διαπανεπιστημιακό Σεμινάριο Οστεοσύνθεσης με πρακτική άσκηση, 2–4 Μαρτίου στη Χερσόνησο Ηρακλείου
- 2008** Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών “Διφασική αντιμετώπιση Οστεοπόρωσης” , 23-24 Φεβ 2007 “Σαμαριά” Χανίων.
- 2007** 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Επούλωσης Τραυμάτων και Ελκών και συμμετοχή σε Κλινικά φροντιστήρια α)“ΦΡΟΝΤΙΔΑ ΔΙΑΒΗΤΙΚΟΥ ΠΟΔΙΟΥ” β)ΚΑΤ’ΟΙΚΟΝ ΝΟΣΗΛΕΙΑ ΚΑΤΑΚΛΙΣΕΩΝ” που πραγματοποιήθηκε, 15-17 Μαρτίου 2007
- 2007** 9^ο Instructional Course of the European Foot and Ankle Society Eugenides Foundation ,Athens,Greece 22nd-23 June 2007
- 2008** 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Προληπτικής Ιατρικής, 24-26 Ιαν 2008 με 15 (C.M.C)
- 2009** 9^ο Διεθνές Συνέδριο Αθλητιατρικής Εταιρίας Ελλάδος &7^ο Ελλαδο-Κυπριακό Αθλητιατρικό Συνέδριο, 27-30 Μαρτίου 2008.
- 2010** Περιφεριακό Μετεκπεδευτικό Ορθοπαιδικό Σεμινάριο Κρήτης στο Φόδελε, 22-25 Μάη
- 2008** European Spine Review & Cadaver Hands – On Course, (59.5 Total credits), το οποίο πραγματοποιήθηκε στις 25/07/2008 – 01/08/2008 στη Χερσόνησο.
- 2007** 14ο ΠΑΓΚΡΗΤΙΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ 29 Οκτ-1Νοε 2008 Γεωργιούπολη Κρήτης (24 μόρια)
- 2008** 6ο ΕΤΗΣΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΙΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΡΑΥΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ, 28-30 Νοεμβρίου στον Πειραιά
- 2009** Ημερίδα με θέμα 1.Βλαστοκυτταρα στην οδοντιατρική,2.Οστεονέκρωση γνάθου ως επιπλοκή των διφωσφονικών . Ρέθυμνο 5 Δεκ 2009.
- 2009** 15^ο Διαπανεπιστημιακο Σεμινάριο Οστεοσύνθεσης με πρακτική άσκηση στο Βόλο (19-21 Μαρτίου) με 14 μόρια.
- 2009** 4^ο πανελλήνιο συνέδριο επούλωσης τραυμάτων και ελκών στην Αθήνα 2-4 Απριλίου
- 2009** 11^ο Πανελλήνιο Πολυθεματικό Συνέδριο 1-3 Μαΐου στο Ηράκλειο Κρήτης.
- 2009** 35ο Συμπόσιο Σπονδυλικής Στήλης <<Ν.Γιαννέστρας-Π.Σμυρνής>> στον Πλαταμώνα με πρακτική άσκηση(workshop) σε Πτώματικά παρασκευάσματα.11-14 ΙΟΥΝ 2009
- 2009** 65^ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο με 24 μόρια Θεσσαλονίκη 7-10 Οκτ 2009

- 2009** 10^o European Congress of trauma and Emergency Surgery Treatment of thoracolumbar fractures with kyphoplasty and minimal invasive spinal stabilization (Dritan Pasku, Artan Bano, Kalliopi Alpantaki, Savvas Likoudis, **Ioannis Aggelidakis**, Pavlos Katonis.)
- 2010** Σεμινάριο Πολυδιάστατη Αντιμετώπιση Σαρκωμάτων και Κακοήθους Μελανώματος, Βυτίνα Αρκαδίας 12-13 Μαρτ 2010, (9 μόρια CME)
- 2010** 29^o Ετήσιο Συνέδριο Ο.Τ.Ε.ΜΑ.Θ Αλεξανδρούπολη 7-10 Απριλ 2010
- 2011** 16ο Κοινό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Επανορθωτικής Μικροχειρουργικής & Ελληνικής Εταιρίας Χειρουργικής Χεριού & Άνω Άκρου
- 2010** 66^o Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο, Αθήνα 13-16 Οκτ 2010, (24 μόρια)
- 2011** Ημερίδα "Όγκοι Μυοσκελετικού Συστήματος. Διάγνωση-Θεραπευτική Διακίνηση Ασθενούς-Προβλήματα", που συνδιοργανώνει η Γ' Ορθοπαιδική Κλινική ΑΠΘ και το Ακτινοδιαγνωστικό Εργαστήριο του Γ.Ν. Θεσσαλονίκης "Παπαγεωργίου" στο Αμφιθέατρο του Γ.Ν. Θεσσαλονίκης "Παπαγεωργίου" στις 12/02/2011.
- 2016** Σεμινάριο Χειρουργικής Άνω Άκρου: Αρθροπλαστική Ωμου – Αγκώνα σε πτωματικά παρασκευάσματα (Με πρακτική άσκηση & Live Surgery), 20-22 Οκτωβρίου 2016
- 2016** 2nd MBE Conference, (XXVth FECTS Meeting), Matrix Biology Europe, Αθήνα, 11-14 Ιουνίου, 2016
- 2016** Ημερίδα ΟΣΤΕΟΠΟΡΟΣΗΣ, 9 Απριλίου 2016, Ηράκλειο Κρήτης, (6 μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Απεικόνισης του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου)
- 2016** 1^o Κλινικό Φρονηστήριο Ακτινολογίας Μυοσκελετικού, 8-10 Ιουλίου 2016, Ηράκλειο Κρήτης
- 2016** 72^o Συνέδριο Ορθοπεδικής Χειρουργικής & Τραυματολογίας, 12-15 Οκτωβρίου 2016, Αθήνα, (23 μόρια)
- 2016** 2nd Course on Upper Limb Surgery: Shoulder-Elbow Arthroplasty on Frozen Cadavers (Hands on & Live Surgery), _ Hands on Workshop, _Shoulder Ultrasound Hands on Workshop, 20-22 Οκτωβρίου 2016, Θεσσαλονίκη, (16 μόρια)
- 2017** 9ο Ετήσιο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συμπόσιο ΕΠΕΜΥ, 2-5 Ιουνίου 2017, Ρόδος
- 2017** 1st Course on Upper Limb Surgery: Shoulder-Elbow Arthroscopy on Frozen Cadavers (Hands on & Live Surgery), _Hands on Workshop, 19-21 Οκτωβρίου 2017, (20 μόρια)

- 2018** 12^ο Συνέδριο Αθλητιατρικής Εταιρείας Ελλάδος, Θεσσαλονίκη, 16-18 Μαρτίου 2018, (22 μόρια)
- 2018** 74^ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Ορθοπαιδικής & Τραυματολογίας, 10-13 Οκτωβρίου 2018, Αθήνα, (30 μόρια)
- 2019** “Μεταβολικά νοσήματα των οστών-Βιβλιογραφική ενημέρωση” 29-31 Μαρτίου Αράχωβα
- 2019** “Νεότερες Εξελίξεις στην Αντιμετώπιση του Ορθοπαιδικού Τραύματος” 12-13 Απριλίου Ηράκλειο
- 2019** 11^{ου} Ετήσιου Πανελληνίου Επιστημονικού Συνεδρίου ΕΠΕΜΥ με θέμα «Κλινικά Διλήμματα στις μυοσκελετικές Παθήσεις» 18-21 Απριλίου Κέρκυρα

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ:

1. Μέλος οργανωτικής επιτροπής του Περιφερειακού Μετεκπαιδευτικού Ορθοπαιδικού Σεμιναρίου Κρήτης που έλαβε μέρος στο Φόδελε Κρήτης , 22-25 Μαΐου 2008.
Υπό την αιγίδα του Κολλεγίου Ελλήνων Ορθοπαιδικών Χειρουργών
2. Συμμετοχή ως ομιλήτης σε στρογγυλή τράπεζα με θέμα: <<Selection criteria of allotransplantation >> Πρόεδρος Κος Σουκάκος Ιωάννινα, 26-29 Αυγ 2010
16ο Κοινό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επανορθωτικής Μικροχειρουργικής & Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Χεριού & Άνω Άκρου.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΑΛΛΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ:

1. Συμμετοχή σε εκπαιδευτικό πρόγραμμα 35 ωρών ΑΥΤΟΜΑΤΙΣΜΟΣ&ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΓΡΑΦΕΙΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ Η/Υ Πιστοποιητικό : COREL LEVEL (18/04/2005)
2. Συμμετοχή στις δραστηριότητες<< ΟΛΥΜΠΙΑΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ>> Αθήνα 2004 (04/2003)
3. Συμμετοχή σε πρόγραμμα εκπαίδευσης στη Βασική Υποστήριξη της Ζωής (**B.L.S**) Στα πρότυπα του ευρωπαϊκού συμβουλίου αναζωογόνησης(E.R.C) Θεσσαλονίκη 11/05/2006
4. Συμμετοχή σε εφαρμοσμένο φροντιστήριο με πρακτική άσκηση α) Καρδιοαναπνευστική Αναζωογόνηση(ΚΑΡΠΑ)-Α'Βοηθειες –Μεταφορά και Ακίνητοποίηση Τραυματία. β)Επιδέσεις-Νάρθηκες –Περιδέσεις ,Αντιμετώπιση Εξαρθρημάτων-Καταγμάτων στα

πλαίσια του 9^{ου} Διεθνούς συνεδρίου της αθλητιατρικής εταιρίας Ελλάδος & 7^{ου} Ελλαδο-Κυπριακού Αθλητιατρικού Συνεδρίου στις 27 Μαρ 2008

5. CERTIFICATE SPORTS MEDICINE UNDER THE AUSPICES OF THE 10 C MEDICAL COMMISSION AND OLYMPIC SOLIDARITY στις 28-29 Μαρτίου 2008
6. CERTIFICATE **ATLS** (Advanced Trauma Life Support 19-20 Ιουνίου 2010 με 19 μόρια.
7. Παρακολούθηση των εργασιών του Εντατικού εκπαιδευτικού διημέρου του Κολλεγίου Ελλήνων Ορθοπαιδικών Χειρουργών στις 19-20 Νοεμβρίου 2010 στην Αθήνα.
8. Παρακολούθηση Επιστημονικού Σεμιναρίου με πρακτική άσκηση με θέμα: "Εφαρμογές του Taylor Spatial Frame " 17-18 Δεκ 2010 Λάρισα.

ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ- ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ:

1. ΒΡΑΒΕΙΟ Ι. ΙΩΑΝΝΟΒΙΤΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΙΑΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΕΛΚΩΝ η εργασία με τίτλο : ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΠΤΕΡΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ V.A.C Αλεξιάκης Δ., Ρέμπελος Γ., Κισκήρα Ο., **Αγγελιδάκης Ι.**, Κωνσταντόπουλος Δ., Γιαννακίδου Μ., Καστανά Ο.

2. ΒΡΑΒΕΙΟ Ι. ΙΩΑΝΝΟΒΙΤΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΙΑΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΕΛΚΩΝ η εργασία με τίτλο : Η ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΓΚΑΥΜΑΤΟΣ ΣΕ ΝΕΥΡΟΠΑΘΗΤΙΚΟ ΔΙΑΒΗΤΙΚΟ ΠΟΔΙ ΚΑΙ Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΔΙΑΣΩΣΗ ΑΥΤΟΥ.

Καστανά Ο., Αναγιωτός Γ., Ρέμπελος Γ., **Αγγελιδάκης Ι.**, Κισκήρα Ο., Αποστόλου Χρ., Αλεξιάκης Δ. Στα πλαίσια του 4^{ου} πανελληνίου συνεδρίου επούλωσης τραυμάτων και ελκών ύψους 500 ΕΥΡΩ για κάθε εργασία.

ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ:

1. 2002-2003 Εκπαίδευση των Δοκίμων Εθελοντών Σαμαρειτών (Τμήμα Μοιρών) στην Ανατομία, Παθολογία και στις πρώτες Βοήθειες
2. 2004-2005 Ομιλητής στα πλαίσια Μετεκπαιδευτικών μαθημάτων της Χειρουργικής κλινικής με θέμα: α) Οξύ κοιλιακό άλγος. Διαφορική διάγνωση.
3. 02/10/2006-04/02/2007 Εκπαιδευτής σε Ι.Ε.Κ Δημοσίου στο Ρέθυμνο για (6μηνο) στο μάθημα Διατροφή –διαιτολογία. Τμήμα : Ειδικών εφαρμογών Αισθητικής

4. Συμμετοχή ως εκπαιδευτής_στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα προπτυχιακών μαθημάτων με θέμα Μυοσκελετικό σύστημα που διδάσκεται στους φοιτητές 7^{ου} εξαμήνου κατά το τρίμηνο Νοεμβριος 2008 –Ιανουάριος 2009 στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης (Διδάσκων Αν.Καθ. Κοντάκης. Γ)

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΙΕΣ:

1. Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Τραύματος και Επείγουσας Ιατρικής, από 25/02/2005
2. Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Επούλωσης Τραυμάτων και Ελκών, από 23/09/2005
3. Μέλος της Αθλητιατρικής Εταιρίας Ελλάδος., από 11/05/2006
4. Έκτακτο Μέλος της Ελληνικής Εταιρίας Χειρουργικής Ορθοπαιδικής και Τραυματολογίας (ΕΕΧΟΤ) από 01/01/2009



Biglycan Regulates MG63 Osteosarcoma Cell Growth Through a LRP6/ β -Catenin/IGFR-IR Signaling Axis

John Aggelidakis¹, Aikaterini Berdiaki¹, Dragana Nikitovic^{1*}, Antonis Papoutsidakis¹, Dionysios J. Papachristou², Aristidis M. Tsatsakis³ and George N. Tzanakakis¹

¹ Laboratory of Anatomy-Histology-Embryology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece, ² Unit of Bone and Soft Tissue Studies, Laboratory of Anatomy-Histology-Embryology, School of Medicine, University of Patras, Patras, Greece, ³ Laboratory of Toxicology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece

OPEN ACCESS

Edited by:

Daniel Christian Hoessli,
University of Karachi, Pakistan

Reviewed by:

Daniele Vergara,
University of Salento, Italy
Monica Neagu,
Institutul National Victor Babes,
Romania
Massimo Libra,
Università degli Studi di Catania, Italy

*Correspondence:

Dragana Nikitovic
nikitovic@uoc.gr

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 12 August 2018

Accepted: 04 October 2018

Published: 23 October 2018

Citation:

Aggelidakis J, Berdiaki A, Nikitovic D, Papoutsidakis A, Papachristou DJ, Tsatsakis AM and Tzanakakis GN (2018) Biglycan Regulates MG63 Osteosarcoma Cell Growth Through a LRP6/ β -Catenin/IGFR-IR Signaling Axis. *Front. Oncol.* 8:470. doi: 10.3389/fonc.2018.00470

Biglycan, a small leucine rich proteoglycan (SLRP), is an important participant in bone homeostasis and development as well as in bone pathology. In the present study biglycan was identified as a positive regulator of MG63 osteosarcoma cell growth ($p \leq 0.001$). IGF-I was shown to increase biglycan expression ($p \leq 0.01$), whereas biglycan-deficiency attenuated significantly both basal and IGF-I induced cell proliferation of MG63 cells ($p \leq 0.001$; $p \leq 0.01$, respectively). These effects were executed through the IGF-IR receptor whose activation was strongly attenuated ($p \leq 0.01$) in biglycan-deficient MG63 cells. Biglycan, previously shown to regulate Wnt/ β -catenin pathway, was demonstrated to induce a significant increase in β -catenin protein expression evident at cytoplasmic ($p \leq 0.01$), membrane ($p \leq 0.01$), and nucleus fractions in MG63 cells ($p \leq 0.05$). As demonstrated by immunofluorescence, increase in β -catenin expression is attributed to co-localization of biglycan with the Wnt co-receptor low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) resulting in attenuated β -catenin degradation. Furthermore, applying anti- β -catenin and anti-pIGF-IR antibodies to MG-63 cells demonstrated a cytoplasmic and to the membrane interaction between these molecules that increased upon exogenous biglycan treatment. In parallel, the downregulation of biglycan significantly inhibited both basal and IGF-I-dependent ERK1/2 activation, ($p \leq 0.001$). In summary, we report a novel mechanism where biglycan through a LRP6/ β -catenin/IGF-IR signaling axis enhances osteosarcoma cell growth.

Keywords: osteosarcoma growth, biglycan, small leucine rich proteoglycans, IGF-IR, β -catenin, extracellular matrix

INTRODUCTION

The small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) are a family of proteoglycans (PGs) characterized by a relatively small protein core (36–42 kDa), containing a number of leucine-rich repeats and able to undergo post-translational modifications, notably substitution with various types of glycosaminoglycan side chains (1, 2). The PGs secreted to the extracellular matrix can be found at multiple locations, have a high level of conservation and are expressed at crucial points in embryogenesis and tissue homeostasis, which is indicative of their importance. The SLRP gene

family now counts 18 genes classified into five distinct subfamilies which is based on their chromosomal organization and functional similarities (3).

Biglycan is a canonical class I SLRP member containing two chondroitin or dermatan sulfate side chains which are covalently bound to attachment sites at the N-terminal (4). Recently, novel roles in cancer biology including regulation of proliferation, apoptosis, migration, motility, inflammation as well as autophagy have been attributed to biglycan (5, 6). The effects of biglycan have likewise been implicated in the pathogenesis of osteosarcoma, primary malignant tumor of the bone (7, 8). The highest incidence of this tumor has been reported in children and young adults between the ages of 10 and 30 (9, 10) with a significant 30–40% of patients still exhibiting relapses and adverse outcome despite major advances in the treatment of this cancer (10, 11). An important characteristic of osteosarcoma is its heterogeneity and ability to produce abundant non-mineralized ECM–osteoid, mainly consisting of collagen type I, glycoproteins, and proteoglycans (PGs)/GAGs (12, 13). Specifically, biglycan has been identified as a product involved in resistance to chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma (14). Furthermore, we have previously shown that parathyroid hormone (PTH) fragment, PTH(1-34), and fibroblast growth factor-2 (FGF-2), through a novel cooperative mechanism of action, modulate the extracellular matrix content of biglycan to regulate osteosarcoma cell migration (15, 16). Key downstream mediators of biglycan have been correlated to osteosarcoma development and prognosis. Thus, it was recently demonstrated that the attenuation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6)-Wnt/ β -catenin signaling pathway through microRNA-183 (miR-183) inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion (17). Wnt pathway is suggested as one of key pathways in osteosarcoma pathogenesis (18). Moreover, the Wnt/ β -catenin pathway is a therapeutic target in osteosarcoma as its suppression through resveratrol action elicits anti-tumor effects (19). Other SLRP have likewise been shown to affect various osteosarcoma cell functions including proliferation, migration or adhesion (20–22). In the present work, taking into account the importance of biglycan and its downstream mediators in the functional regulation of osteoblastic lineage cells, we examined the effect of biglycan on osteosarcoma cell growth as well as the putative mechanisms involved. Our findings revealed that biglycan through an LRP6/ β -catenin/IGF-IR signaling axis positively regulates MG63 osteosarcoma cell growth.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Recombinant human biglycan (2667-CM) and IGF-I (insulin-like growth factor I; 291-G1) were obtained from R&D Diagnostics. Selective inhibitor of ERK1/2 (Cell Signaling Technology; U016) and allosteric inhibitor of IGF-IR (Sigma-Aldrich; AG1024) were used in this study. Primary antibodies from Santa Cruz Biotechnology used, anti-biglycan (sc100857; mouse monoclonal; 1/100 dilution), anti- β catenin (sc7963; mouse monoclonal; 1/300 dilution and 1/50 for immunofluorescence

experiments), anti-IGF-IR total (sc81464; mouse monoclonal; 1/100 dilution), anti-pERK1/2 (sc136521; mouse monoclonal; 1/100 dilution) and anti-fibrillar collagen (sc374022; 1/100 dilution). In addition, anti-actin (Millipore MAB1501; mouse monoclonal; 1/2,500 dilution), anti-ERK total (Thermo scientific MA5-15343; mouse monoclonal; 1/500 dilution), anti-pIGF-IR (Thermo scientific PA5-37602; polyclonal rabbit; 1/500 dilution for western blot and 1/50 for immunofluorescence experiments), anti-tubulin (Sigma-Aldrich T4026; monoclonal mouse; 1/1,000 dilution) and anti-LRP6 (Elabscience E-AB17347; rabbit polyclonal; 1/50 dilution) were utilized. Secondary-HRP antibodies anti-rabbit (AP182PR); and anti-mouse (AP192PM) were used in a 1/3,000 dilution and obtained from Millipore.

Cell Culture

In this study, MG63 (ATCC[®] CRL1427[™]) human osteosarcoma cell line of moderately differentiated fibroblastoid-type cells and high metastatic capacity was utilized. Cells were grown in DMEM (Biochrom AG; F0455) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen 10500-064; heat inactivated), glutamine (4 mM; Biosera XCT1715), gentamycin (Invitrogen; 15710-049) and penicillin/streptomycin (100 units/ml; Biosera LMA4118). Before addition of treatments (biglycan 10 μ g/ml or IGF-I 10 ng/ml), cells were cultured in serum free medium for 24 h at 37°C and 5%CO₂. Inhibitors, when used (ERK inhibitor or IGF-IR inhibitor), were added 1 h before growth factor treatment.

Proliferation Assay

Growing cells from non-confluent cultures were harvested and seeded in black 96-well plates (Corning; 3603) at a density of 3,500 cells per well in 200 μ l of DMEM (10% FBS). The cell density number was chosen from optimization experiments (data not shown). The cells were allowed to rest overnight. If necessary, transfection with siRNAs was performed in a serum-free medium without antibiotics for 6 h. This was then replaced with fresh medium (0% FBS) with antibiotics. Treatments were added for the next 48 h at 37°C and 5% CO₂ in 0% FBS. The cells were then lysed and their number was calculated using the CyQUANT fluorometric assay (Thermo Scientific; C7026) according to the manufacturer's instructions. Fluorescence was measured in a Fluorometer (Biotek) using the proposed excitation (485 nm) and emission filters (528 nm). A separate standard curve was used to convert fluorescence units to cell numbers. All experiments were performed in triplicate.

Transfection With siRNA

For transfection experiments, the cells were plated in serum and antibiotic free medium in either 96 well plates (4,000 cells/well), or 24-well plates (80,000 cells/well) or T25 flasks (1:8 dilution of a 90% confluent T75 flask). Short interfering RNA specific for biglycan (siBGN) [Invitrogen; stealth siRNAs HSS184531, S328618; optimized for MG63 cells by (15)] or β -catenin (sib-cat) (sc29209; Santa Cruz Biotechnology), and RNAi negative control (siScr) (Invitrogen; medium GC content negative control). To provide optimal transfection, siRNA and Lipofectamine 2000 (Invitrogen; 11668-027) were diluted in

Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen; 31985-070). After 5 min of incubation, diluted Lipofectamine 2000 was mixed with diluted siRNA (2 μ M) for 20 min at room temperature to allow siRNA-liposome complexes to form and added to cell layers. Transfection was allowed to take place during 6 h when the medium was replaced with fresh serum-free medium containing antibiotics and the incubation period continued for 48 h. Cells were then harvested and mRNA or protein was extracted. When necessary, treatments were performed during 24 h after the initial 48 h transfection period. All transfection experiments were repeated at least three times and performed in triplicates.

RNA Isolation and Real-Time PCR

Total ribonucleic acid isolation was performed using TRIzol (Invitrogen; 15596026), according to the manufacturer's instructions. One microgram of total RNA was added for cDNA synthesis using the TAKARA (RR037A) RT cDNA synthesis kit. For semi-quantification of the genes of interest, real-time reactions were performed in an Mx300P cyclor using the Universal qPCR kit (KAPA Biosystems; KK4602) in a total volume of 20 μ L. PCR conditions for amplification and primers used are listed in **Table 1**. Standard curves were run in each optimized assay, which produced a linear plot of threshold cycle (Ct) against log (dilution). The amount of each target was quantified based on the concentration of the standard curve and was presented as arbitrary units. GAPDH was utilized as a housekeeping control gene

Western Blot

Total protein secreted into the serum-free culture medium was concentrated using Amicon Ultra 15 mL (UFC901024; 10 kDa cutoff) centrifugal concentrator tubes. The initial volume of 3 mL serum-free medium collected from culture, to isolate secreted proteins, was concentrated to final volume of 500 μ L whereas, harvested cells were lysed with RIPA solution (50 mM Tris-HCl, 1% NP-40, 0.25% Na-Deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA with protease and phosphatase inhibitors). Equal amounts of protein, either cell extracts or secreted, were subjected to SDS-PAGE using 8% polyacrylamide gels under reducing conditions. Separated protein bands were transferred to nitrocellulose membranes in 10 mM (pH 11), containing 10%

methanol. Membranes were blocked overnight at 4°C with PBS containing 0.1% Tween-20 (PBS-Tween) and 5% (w/v) low-fat milk powder. The membranes were incubated for 1 h at room temperature (RT) with primary antibody in PBS containing 0.1% Tween-20 (PBS-Tween) and 1% (w/v) low-fat milk powder. The immune complexes were detected after incubation with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody diluted (1:3,000) in PBS-Tween, 2% low-fat milk, using the LumiSensor Chemiluminescent HRP substrate kit (Genscript; L00221V500), according to the manufacturer's instructions. Protein expression of Actin was used to correct for the amount of each sample analyzed.

Nuclear and Cytoplasmic Extract Separation

Treated cells in T25 flasks were detached using trypsin-EDTA (Biosera; LMT1706), deactivated with PBS and centrifuged at 1,100 rpm for 5 min. Supernatants were discarded and the pellets resuspended in 250 μ L of ice cold PBS supplemented with protease and phosphatase inhibitors. After centrifugation at 1,100 rpm for 5 min at 4°C the pellets were resuspended in 200 μ L of 5x CPV NP-40 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5% NP-40 with protease and phosphatase inhibitors). Tubes were incubated on a rotating platform at 4°C for 10 min and centrifuged strictly at 1,000 rpm for 5 min at 4°C. The supernatants (cytoplasmic protein fractions) were kept at -80°C. The pellets were resuspended in 100 μ L of RIPA solution (50 mM Tris-HCl, 1% NP-40, 0.25% Na-Deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA with protease and phosphatase inhibitors), vortexed and incubated for 60 min on a rotator at 4°C. Samples were centrifuged to pellet insoluble fraction at 13,000 rpm for 30 min at 4°C and after the supernatants (nucleus protein fractions) were kept at -80°C as well as the pellets (membrane fractions).

Immunofluorescence

MG63 cells were seeded on round coverslips placed in 24-well plates, at a concentration of 50,000 cells/well and incubated in complete medium for 24 h. After a 24-h serum starvation, treatments were added and the cells incubated for 48 h at 37°C and 5% CO₂. The cells were fixed with 5% formaldehyde and 2% sucrose in PBS for 10 min at RT. After three washes with PBS supplemented with 1% FBS, the permeabilizing agent Triton X-100 was added for 10 min and then washed before the addition of primary antibody for 1 h at RT. Coverslips not incubated with the primary antibody were utilized as negative controls. The coverslips were washed again and incubated for 1 h, in the dark at RT, with anti-mouse Alexa 555 (Thermo Scientific; A21422) or Alexa Fluor 488 (Molecular Probes; A21206). TO-PRO-3 iodide (Molecular Probes; T3605) diluted 1:1,000 in de-ionized H₂O was applied for 10 min to stain nuclei. The coverslips were then placed onto slides using glycerol as a mountant and visualized using confocal microscopy.

Statistical Analysis

The statistical significance was evaluated by student's *t*-test, or ANOVA analysis of variance with Tukey's post-test, using GraphPad Prism (version 4.0) software.

TABLE 1 | Real-time PCR primers and amplification conditions.

Primers	Sequences
GAPDH	Forward: 5'-GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA-3' Reverse: 5'-GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CAC T-3'
β -catenin	Forward: 5'-TTC TGG TGC CAC TAC CAC AGC-3' Reverse: 5'-TGC ATG CCC TCA TCT AAT GTC-3'
Cyclin	Forward: 5'-CTC CAC CTC ACC CCC TAA AT-3' Reverse: 5'-AGA GCC CAA AAG CCA TCC-3'
Biglycan	Forward: 5'-TCT GAA GTC TGT GCC CAA-3' Reverse: 5'-TCT GAG ATG CGC AGG TA-3'
Thermal conditions	94°C for 15 min; 40 cycles at 94°C for 20 s; 55°C for 30 s; 72°C for 30 s; 72°C for 10 min

RESULTS

The Role of Biglycan on IGF-I Stimulated MG63 Cell Proliferation

We have previously shown that biglycan is a potent modulator of osteosarcoma cells' migration (15). In this study we wanted

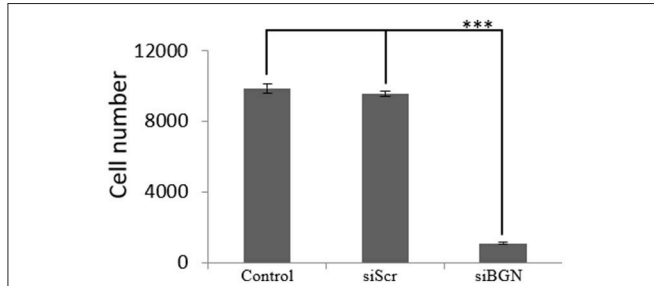


FIGURE 1 | Effect of siBGN on MG63 cell proliferation. MG63 cells were harvested and seeded (3,500 cells/well) on 96-well plates and transfection with siRNAs (short interfering RNAs) was performed. Cells, in each well, were incubated in serum-free medium and transfected with either siRNAs against biglycan (siBGN) or scrambled siRNAs (siScr), used as negative control. Cells were counted after a 48 h incubation period, using fluorometric CyQUANT assay kit. Results represent the average of three separate experiments. Means \pm S.E.M were plotted; statistical significance: *** $p \leq 0.001$ compared with the respective control samples.

to investigate its' possible role on osteosarcoma cell growth. Therefore, we used siRNAs specific for the biglycan gene (siBGN) achieving a significant downregulation of biglycan expression at both protein and mRNA biglycan levels, as previously shown (15). The growth ability of biglycan-deficient and control siScr cells was evaluated using the CyQUANT fluorometric assay (20). This approach demonstrated a strong attenuation of biglycan deficient cell growth as compared to control ($p \leq 0.001$; **Figure 1**).

IGF-I Modulation of Biglycan Expression

In order to identify possible partners/mediators of biglycan action we screened the effect of key regulators of osteosarcoma growth on biglycan expression. This approach identified IGF-I as a regulator of biglycan expression. Indeed, upon treating MG63 with IGF-I (10 ng/mL) for 48 h and performing western blot analysis to supernatant and cell extract, a statistically significant increase of secreted biglycan ($p \leq 0.01$), was demonstrated (**Figure 2**). Utilization of antibody specific for actin on secreted proteins excluded a contamination by cytoskeletal proteins (data not shown). Biglycan mRNA levels were also significantly ($p \leq 0.01$) upregulated, as shown by real-time PCR analysis (**Figure 2D**). These data are well in accord with previous reports where IGF-I has been shown to regulate the expression of biglycan in human osteoblast-like cells (23).

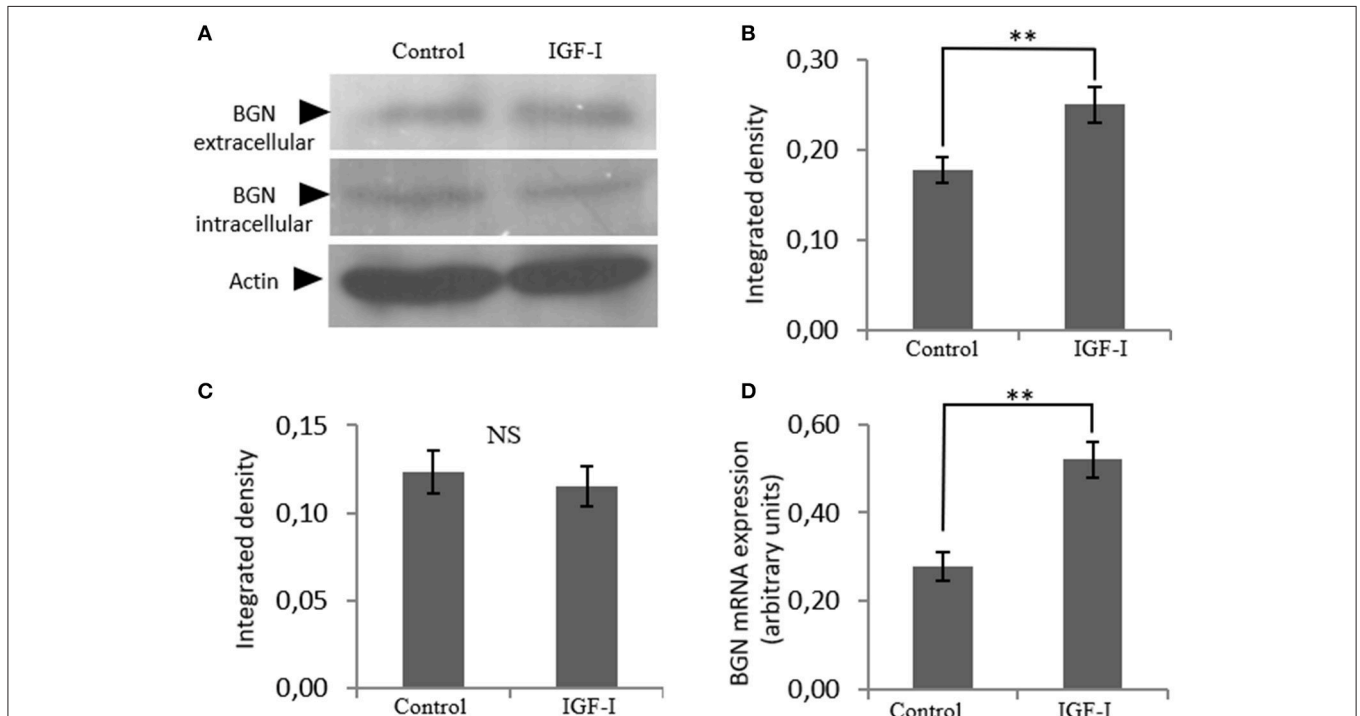


FIGURE 2 | Effect of IGF-I on biglycan expression at the mRNA and protein level. **(A)** Expression of extracellular and intracellular Biglycan (BGN) levels of cells treated with serum-free medium (control) and cells treated with IGF-I (10 ng/ml) was determined by Western blot analysis. Densitometric analysis of the extracellular BGN protein band (100 KDa glycosylated proteoglycan) **(B)** and of the intracellular BGN protein band (45 KDa protein core band) **(C)** were normalized against actin and plotted. Representative blots are presented. **(D)** Biglycan mRNA levels in MG63 cells treated with IGF-I (10 ng/ml) during 48 h were determined by real time PCR using primers specific for the BGN gene and normalized against GAPDH. Results represent the average of three separate experiments. Means \pm S.E.M were plotted; statistical significance: ** $p \leq 0.01$ compared with the respective control samples.

Due to the fact that, IGF-I/IGF-IR is a key signaling pathway of bone anabolic processes and established in early reports to regulate osteosarcoma cell proliferation (24) we wanted to verify its putative action on MG63 cell growth and assess possible connection to biglycan effects. Treating osteosarcoma cells with IGF-I (10 ng/ml) induced a significant increase in cell proliferation ($p \leq 0.01$; **Figure 3**). To estimate an interaction between biglycan and IGF-I signaling we treated biglycan-deficient cells (siBGN) as well as cells transfected with control scramble siRNAs (siScr) with IGF-I (10 ng/mL) for 48 h and measured their proliferation rate. IGF-I-induced increase in cell proliferation ($p \leq 0.01$) was abolished in biglycan-deficient cells ($p \leq 0.001$; **Figure 3**). Therefore, biglycan was shown to modulate significantly both basal and IGF-I induced cell proliferation of MG63 cells, suggesting an interplay between biglycan and IGF-I signaling in the regulation of osteosarcoma growth.

Role of IGF-IR on IGF-I-Dependent MG63 Cell Proliferation—Effect of Biglycan

Next, we examined the mechanisms involved in IGF-I-dependent growth, taking into account the fact that the IGF-IR receptor is the key IGF-I downstream mediator (25) as well as the confirmation of IGF-IR activation shown in our control experiments (**Supplementary Figure 1**). For this purpose MG63 cells were treated with 1 μ M of specific IGF-IR inhibitor (AG1024) for 48 h, with or without the presence of IGF-I (10 ng/ml). The AG1024 concentration used was chosen after initial optimization experiments that were performed using a range of different concentrations (data not shown). Fluorometric cell growth assay demonstrated that this strategy resulted in a statistically significant decrease of both basal and IGF-I-induced proliferation ($p \leq 0.001$; $p \leq 0.01$, respectively; **Figure 4A**). These results, therefore, suggest that IGF-IR mediates both basal and exogenous IGF-I-dependent growth of MG63 osteosarcoma cells.

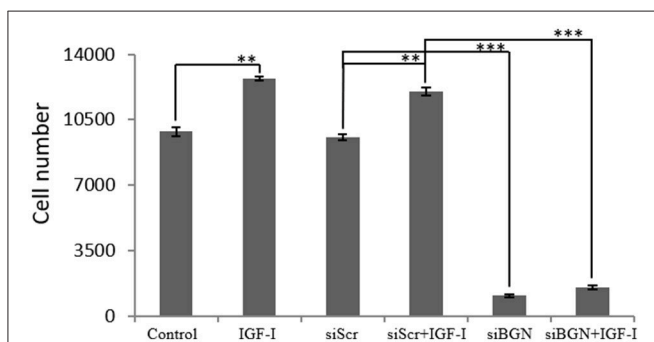
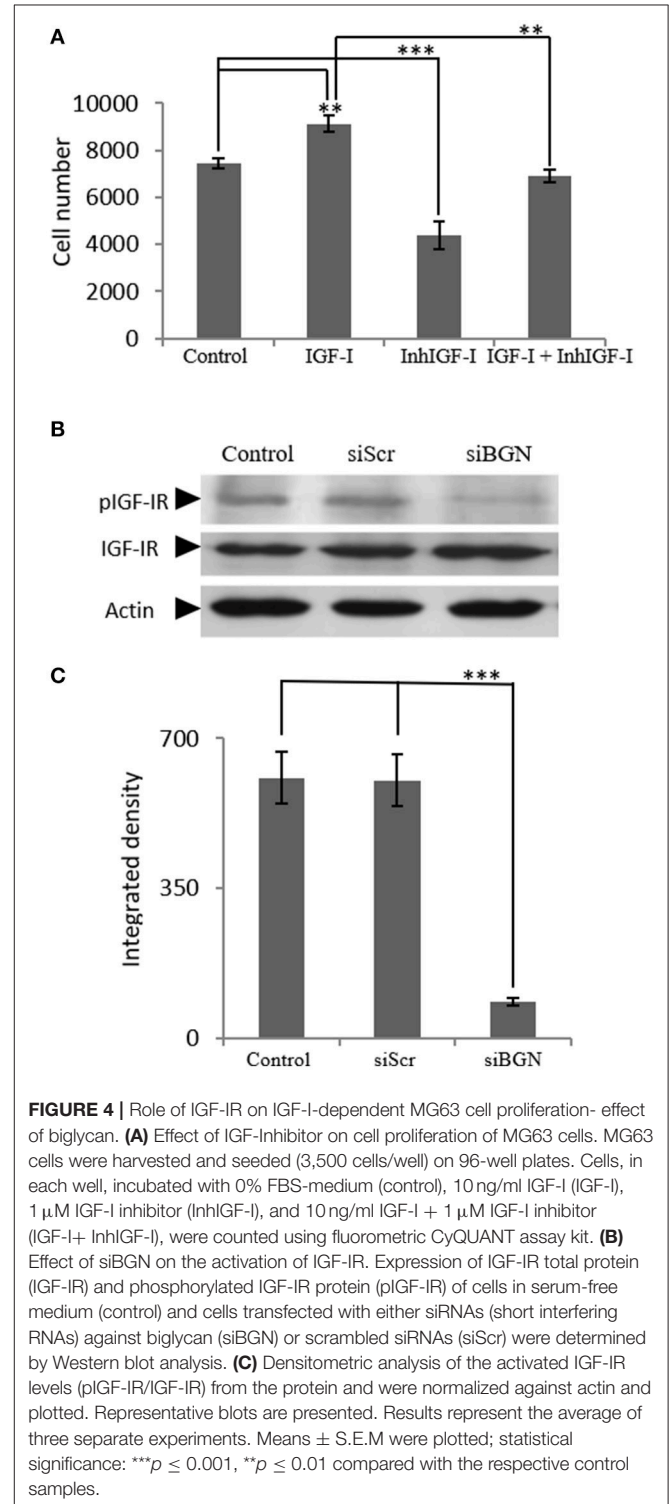


FIGURE 3 | Effect of IGF-I on cell proliferation of MG63 cells. MG63 cells were harvested and seeded (3,500 cells/well) on 96-well plates and transfection with siRNAs was performed. Cells, in each well, incubated with 0% FBS-medium (control), cells incubated with 10 ng/ml IGF-I (IGF-I) and cells transfected with either siRNAs against biglycan (siBGN) or scrambled siRNAs (siScr) with or without IGF-I addition, were counted using fluorometric CyQUANT assay kit. Results represent the average of three separate experiments. Means \pm S.E.M were plotted; statistical significance: *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$ compared with the respective control samples.

Of note, these data highlight the importance of endogenous IGF-IR signaling in the regulation of MG-63 cell growth (**Figure 4A**).

In order to investigate the direct effects of biglycan on IGF-IR downstream signaling, the activation of IGF-IR was studied. To this end, cell extracts of siBGN and control siScr



cells, were probed with antibodies against IGF-IR and pIGF-IR. As presented in **Figures 4B,C**, the activation of IGF-IR was strongly attenuated ($p \leq 0.01$) in biglycan-deficient MG63 cells (**Figures 4B,C**).

Biglycan Mediated Changes in the Wnt Pathway (β -Catenin)

Next, to further define the mechanism of biglycan action, we turned to the identification of putative co-operation partners. Biglycan has been suggested to regulate Wnt/ β -catenin pathway by either mediating ligand effects or modulating downstream signaling molecules (26–29). Indirect interactions of β -catenin with IGF-IR receptor and other members of the IGF-I signaling pathway have also been reported (27–29). In order to investigate the effect of biglycan on the Wnt pathway in osteosarcoma cells, β -catenin expression was studied after incubation of the cells with biglycan for 48 h. Both protein (Western blot) and mRNA (Real time PCR) analysis showed a statistically significant increase ($p \leq 0.01$) in β -catenin protein expression after the addition of biglycan (**Figure 5**). This increase in β -catenin protein expression is well in correlation with a previous report in normal human osteoblasts (26).

β -catenin is known to regulate gene expression following Wnt pathway activation which affects cell proliferation (30–32). The above functions of β -catenin derive from its interplay with several proteins in different compartments e.g., the cell membrane, the cytoplasm and the nucleus. Therefore, β -catenin localization was investigated at the different compartments of MG63 cells after treatment with biglycan during 48 h. As presented in **Figure 6** a significant increase in the expression of β -catenin to the cytoplasm (Cyto C vs. CytoB; $p \leq 0.01$); to the nucleus (NuclC vs. NuclB; $p \leq 0.01$) as well as to the membrane (MembrC vs.

MembrB; $p \leq 0.05$) was demonstrated in biglycan treated cells as compared to control. Therefore, biglycan regulates the protein expression and localization of β -catenin in MG63 osteosarcoma cells.

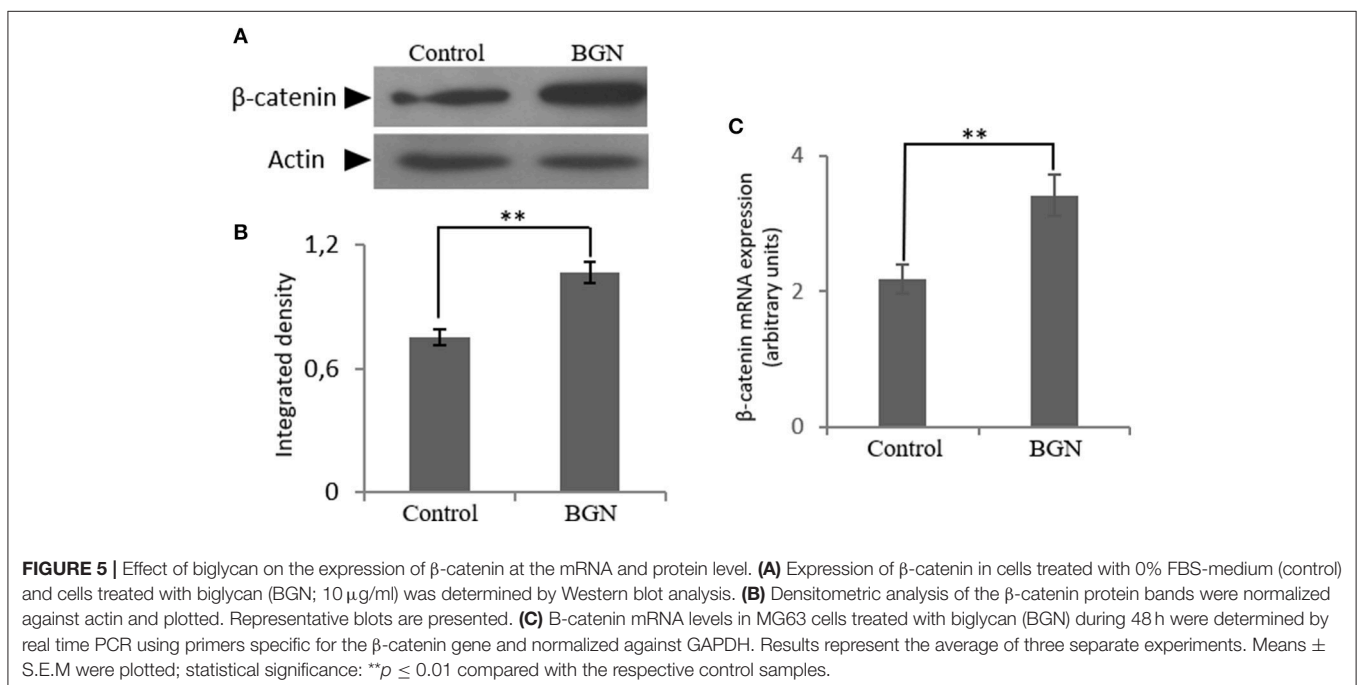
Role of β -Catenin in Osteosarcoma IGF-1R Signaling

In order to investigate the role of β -catenin in the biglycan regulated IGF-IR signaling of MG63 cells, RNA interference methodology was utilized. MG63 cells were transfected with siRNAs against β -catenin (si β -catenin) for 48 h and mRNA and protein expression of β -catenin were analyzed using Real Time PCR and Western blot analysis, respectively. This strategy resulted in an efficient downregulation of β -catenin at both protein ($p \leq 0.001$) and mRNA levels ($p \leq 0.001$; **Figure 7**).

The generated β -catenin-deficient cells were used to study the possible effect of β -catenin/Wnt pathway on IGF-IR activation. Thus, phosphorylation of IGF-IR was assessed using Western blot analysis of protein extracts from cells incubated with 0% FBS medium (C), cells transfected with si β -catenin and cells transfected with scrambled siRNAs (siScr). Interestingly, a strong decrease in the phosphorylation levels of IGF-IR ($p \leq 0.01$) in β -catenin deficient cells was shown (**Figure 8**) suggesting that β -catenin/Wnt pathway can regulate IGF-IR activation in MG63 osteosarcoma cells.

Biglycan Co-localizes With LRP6

Previously, biglycan was shown in osteoblasts to affect Wnt-induced β -catenin/T cell-specific factor-mediated transcriptional activity by interacting with the LRP6 receptor (26). Therefore, we examined whether in our osteosarcoma model biglycan interacts with the LRP6 receptor. Utilization of immunofluorescence



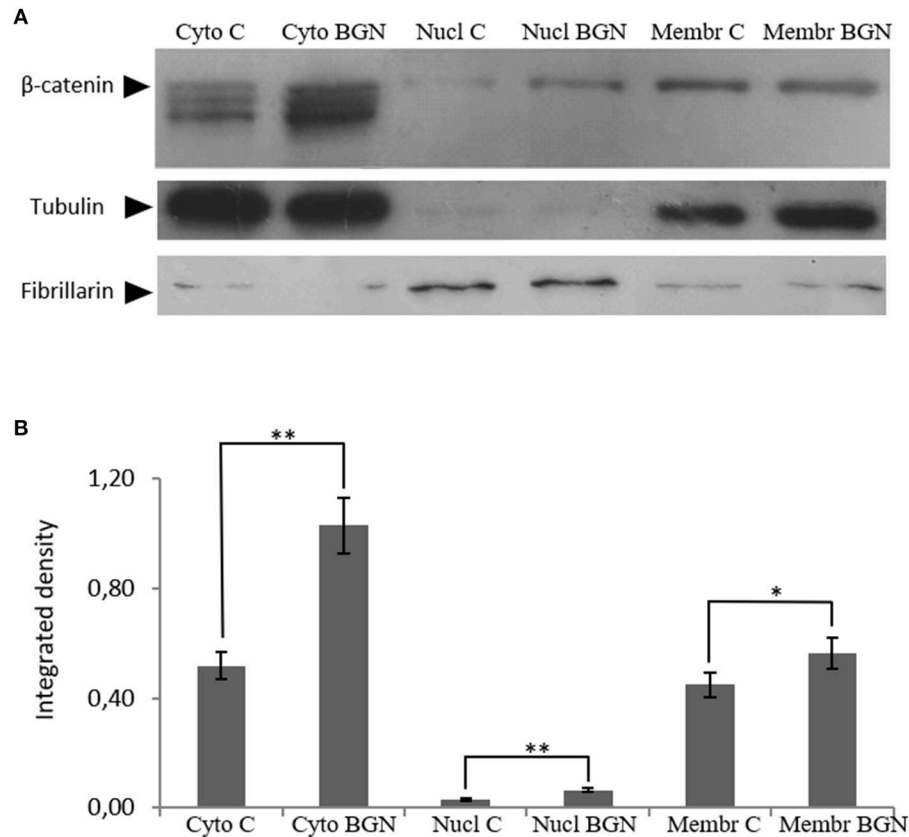


FIGURE 6 | Effect of biglycan on β -catenin protein expression at the different MG63 cell compartments. **(A)** Expression of β -catenin in the cytoplasmic compartment of the cells treated with 0% FBS-medium (Cyto C) and cells treated with biglycan 10 μ g/ml (Cyto BGN), as well as the nuclear compartment of the cells (Nucl C; Nucl BGN) and the membranes (Membr C; Membr BGN) was determined by Western blot analysis. **(B)** Purity controls tubulin and fibrillarin were used for cytoplasmic and nuclear proteins, respectively. Equal amounts of protein from each compartment were loaded and densitometric analysis was performed and plotted. Representative blots are presented. Results represent the average of three separate experiments. Means \pm S.E.M were plotted; statistical significance: ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$ compared with the respective control samples.

demonstrated an abundant deposition of LRP6 (green color) and associated to the cell membrane biglycan (red color with moderate co-localization (LRP6 + biglycan; **Figure 9**). Upon treating the cells with recombinant biglycan a strong increase in orange color, together with enhanced biglycan-LRP6 co-localization was showed (**Figure 9**). These data demonstrate that biglycan in a concentration dependent manner co-localizes with LRP6 in MG63 osteosarcoma cells. Therefore, biglycan, through its interaction with LRP6, activates the receptor and attenuates β -catenin degradation.

Cross Talk Between β -Catenin and IGF Signaling

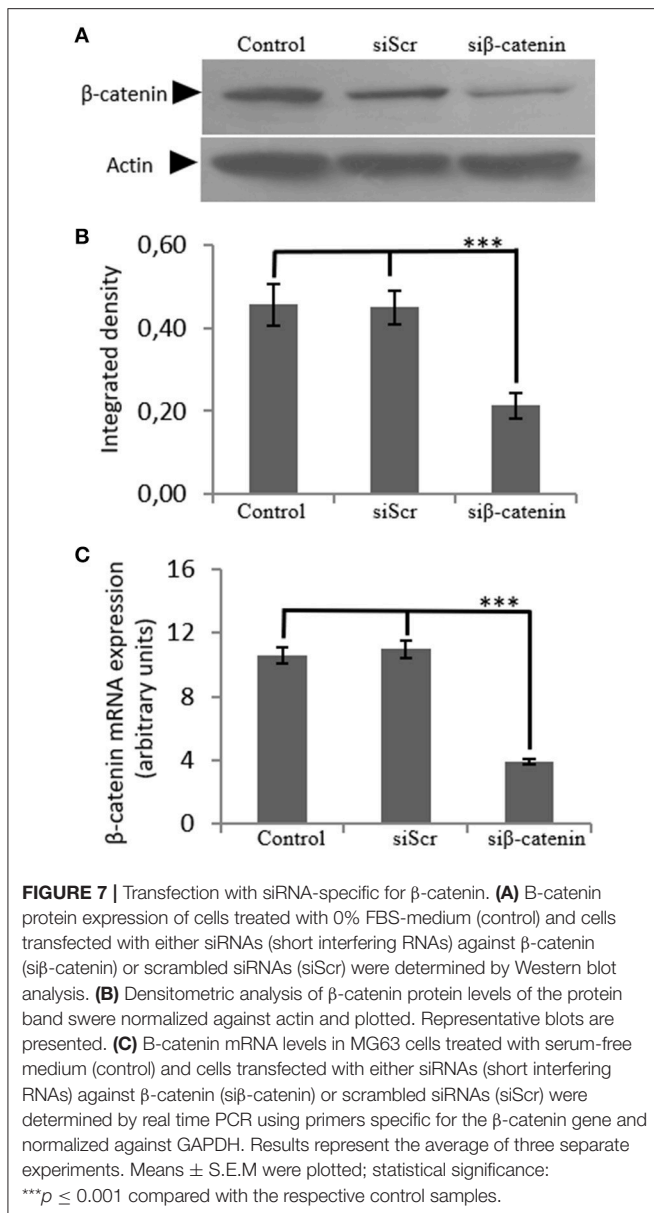
Cytoplasmic β -catenin can be complexed to the cell membrane with the cadherin family members (33). We hypothesized that β -catenin can interact with IGF-IR and to facilitate signaling. Applying anti- β -catenin (green color) and anti-pIGF-IR (red color) antibodies to MG-63 cells demonstrated a co-localization between these molecules (**Figure 10**). Observed co-localization was enhanced in biglycan treated MG-63 cells (**Figure 10**).

Biglycan Activates Canonical β -Catenin Pathway in MG63 Cells

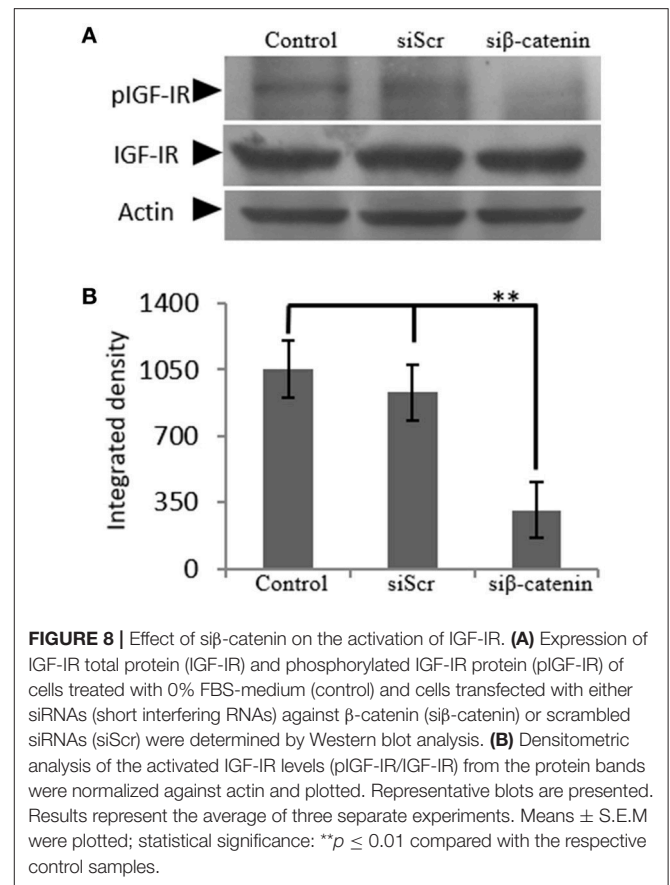
Wnt-mediated transcription through β -catenin—T-cell factor (TCF)/Lymphoid enhancer-binding factor (Lef) transcription factors, is characterized as the canonical wnt/ β -catenin signaling pathway. To assess the modulation of this pathway by biglycan we examined the expression of a β -catenin downstream target molecule cyclin D1 (34, 35). As demonstrated in **Figure 11** cyclin D1 expression was significantly ($p \leq 0.01$) downregulated in biglycan-deficient cells, suggesting that biglycan affects both canonical and non-canonical signaling in osteosarcoma cells.

Role of ERK1/2 in the Biglycan Regulated IGF Signaling

IGF-I/IGF-IR are known to activate several downstream signaling pathways that regulate cell functions including that of the MAP kinases (36, 37). Thus, the role of ERK1/2, member of the MAP kinase pathway, was investigated on IGF-I/biglycan growth effects. Utilization of an ERK1/2 inhibitor in MG63



cells treated or not with IGF-I (10 ng/mL) demonstrated a significant decrease in both the basal and the IGF-I induced MG63 cell proliferation ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$, respectively; **Figure 12A**). These data, therefore, suggest that ERK participates in the regulation of both basal and IGF-I dependent MG-63 cell growth. Next, we wanted to examine the putative effects of biglycan on ERK1/2 activation. To achieve this aim, analysis of ERK1/2 phosphorylation was performed in cell extracts of control cells, cells transfected with siRNAs against biglycan (siBGN) and cells transfected with negative siRNAs (siScr). As shown in **Figures 12 B,C** the activation of ERK1/2 was significantly ($p \leq 0.001$) inhibited in biglycan-deficient (siBGN) cells. These results suggest that ERK1/2 is a downstream mediator of IGF-IR/biglycan signaling dependent cell growth.



DISCUSSION

Biglycan, an important component of bone ECM, has been correlated to the emergence of mesenchymal tumors (7, 21, 38). Recent publications show the importance of the “proteoglycan signature” on cancer patients’ outcome (38) and discuss that they can be used as sensitive biomarkers/therapy targets in some cancer types (39–43). In the present study we demonstrate for the first time that biglycan is an endogenous upregulator of osteosarcoma growth as biglycan-deficient cells were shown to have attenuated ability to proliferate. Others, upon dissecting the sets of genes that regulate the cell functions of biglycan-null pre-osteoblasts using oligonucleotide microarrays, have previously shown that biglycan deficiency modulates the genes that regulate inflammation processes, immune response, as well as proliferation of tumor cells (44). Furthermore, osteosarcoma markers of poor response to therapy (Huvos grade I/II response defines tumors with little or no response to chemotherapy) are predominantly gene products involved in microenvironmental remodeling and osteoclast differentiation, including biglycan (14). We further investigated if other potential mediators of biglycan action involved in key developmental processes such as BMP, Wnt/ β -catenin, RUNX2, HIPPO/YAP or IGF-IR are “hijacked” by osteosarcoma (45) Previously, IGF-I was shown to be an important enhancer of osteosarcoma cell survival facilitating growth and attenuating apoptosis (46).

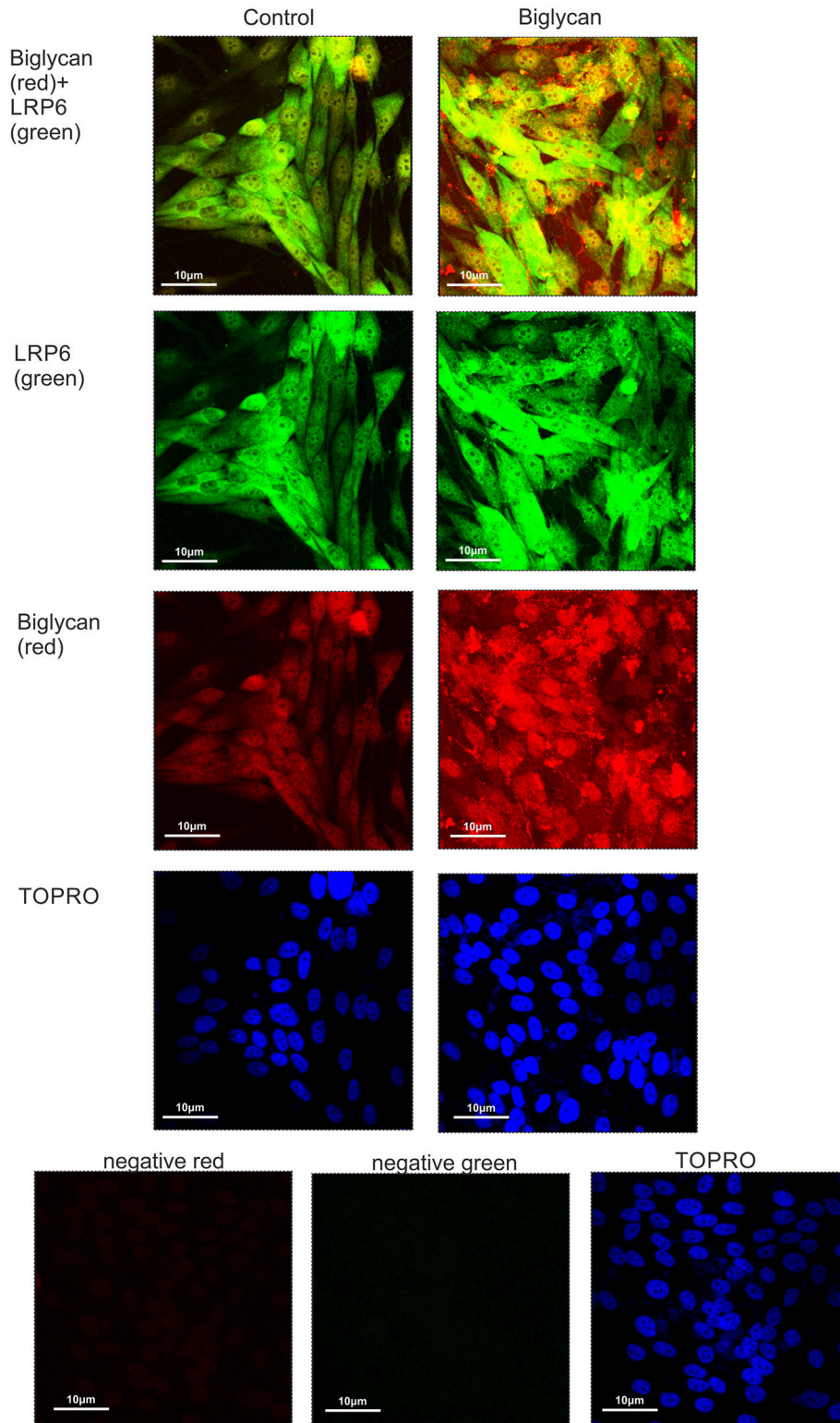


FIGURE 9 | Co-localization of biglycan and LRP6 in MG63 cells using immunofluorescence. Biglycan (red; anti-mouse Alexa Fluor 555) and LRP6 (green; anti-rabbit Alexa Fluor 488) protein staining of cells and respective nuclear staining (using TO-PRO-3) were evaluated in cultures after 48 h in serum-free medium (control) or biglycan (10 µg/ml). In negative controls, primary antibodies were omitted, but both secondary antibodies used (anti-mouse - negative red; anti-rabbit—negative green). Slides were analyzed by confocal microscopy and pictures were taken using x40 magnification.

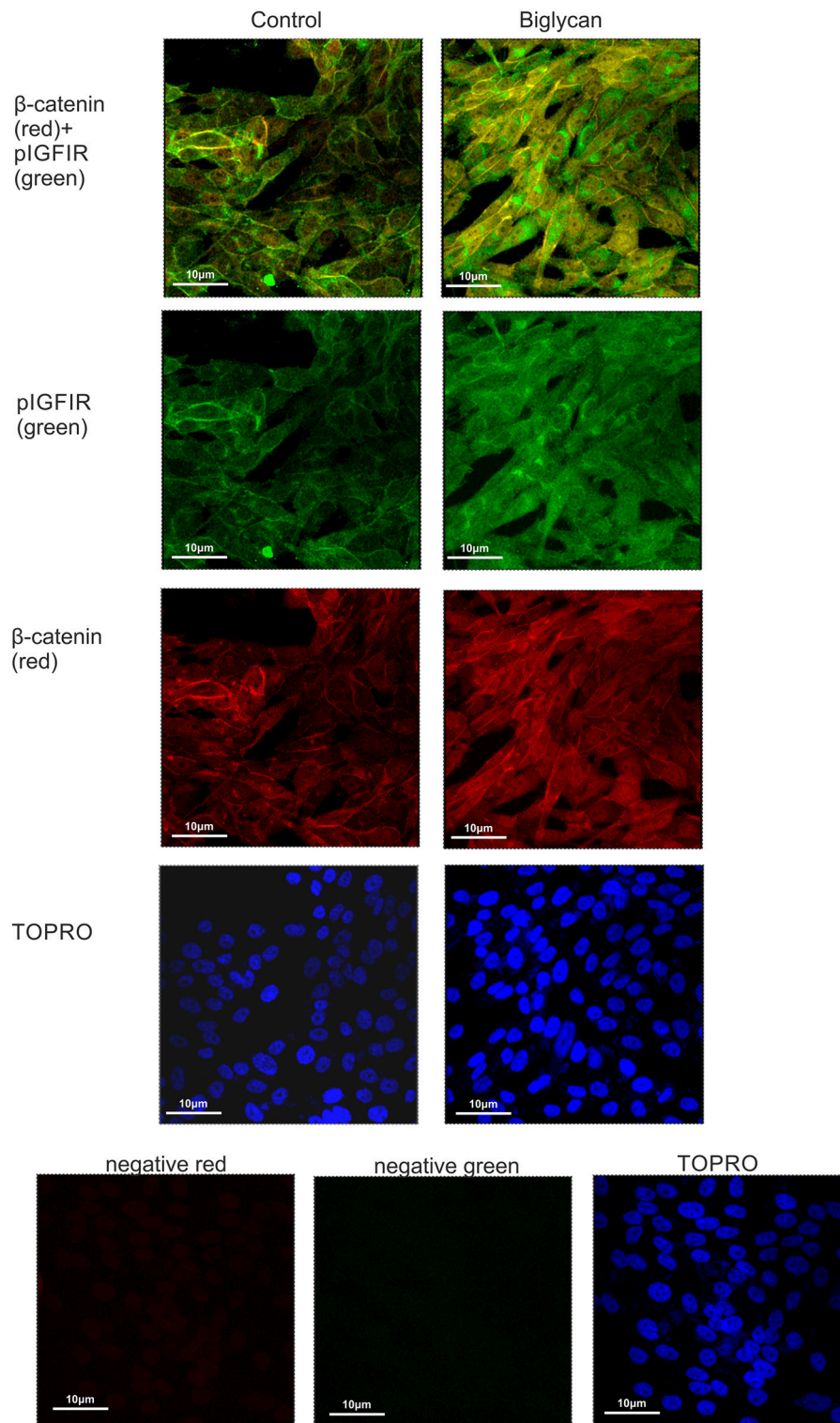
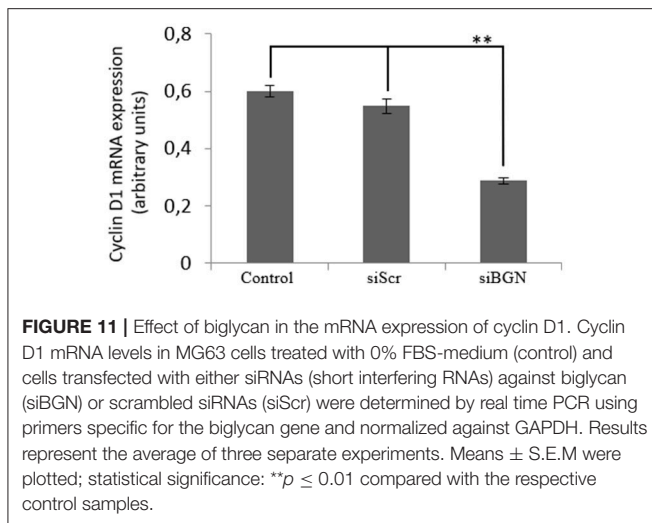
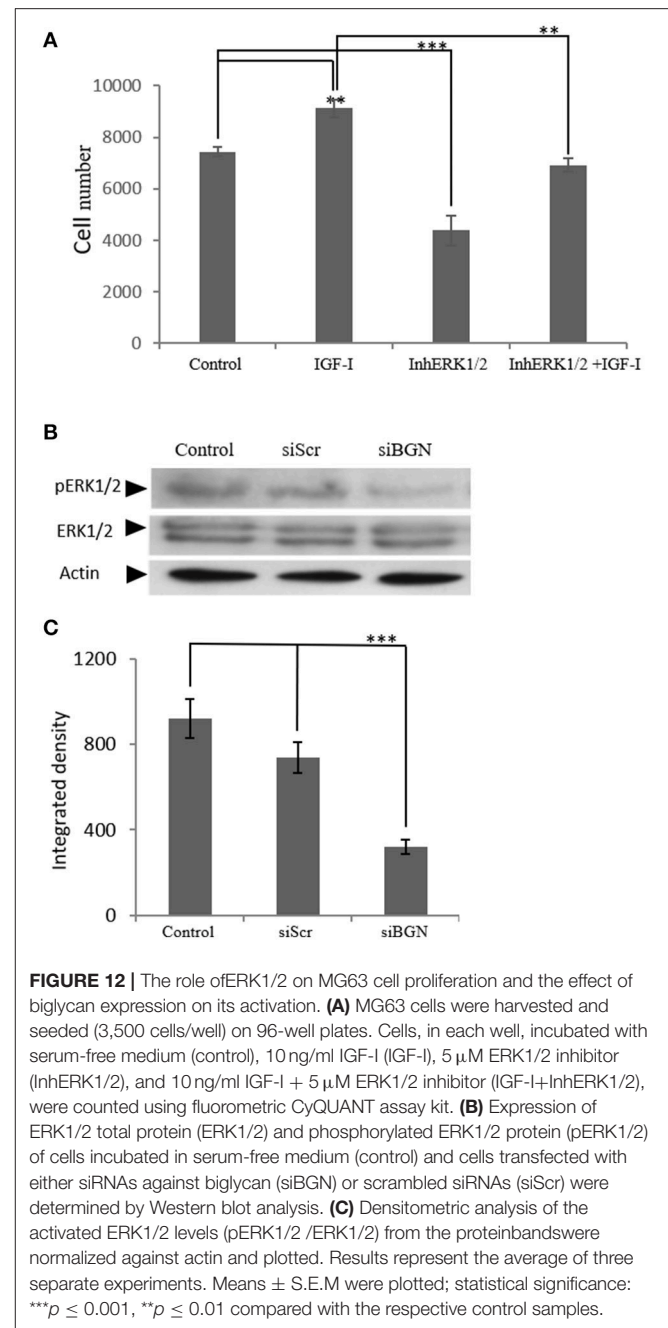


FIGURE 10 | Co-localization of β -catenin and pIGF-IR in MG63 cells using immunofluorescence. β -catenin (red; anti-mouse Alexa Fluor 555) and pIGF-IR (green; anti-rabbit Alexa Fluor 488) protein staining of cells and respective nuclear staining (using TO-PRO-3) were evaluated in cultures after 48 h of incubation with 0% FBS-medium (control) or biglycan (10 μ g/ml). Negative controls were used where the primary antibodies were omitted for both secondary antibodies used (anti-mouse - negative red; anti-rabbit—negative green). Slides were analyzed by confocal microscopy and pictures were taken using x40 magnification.

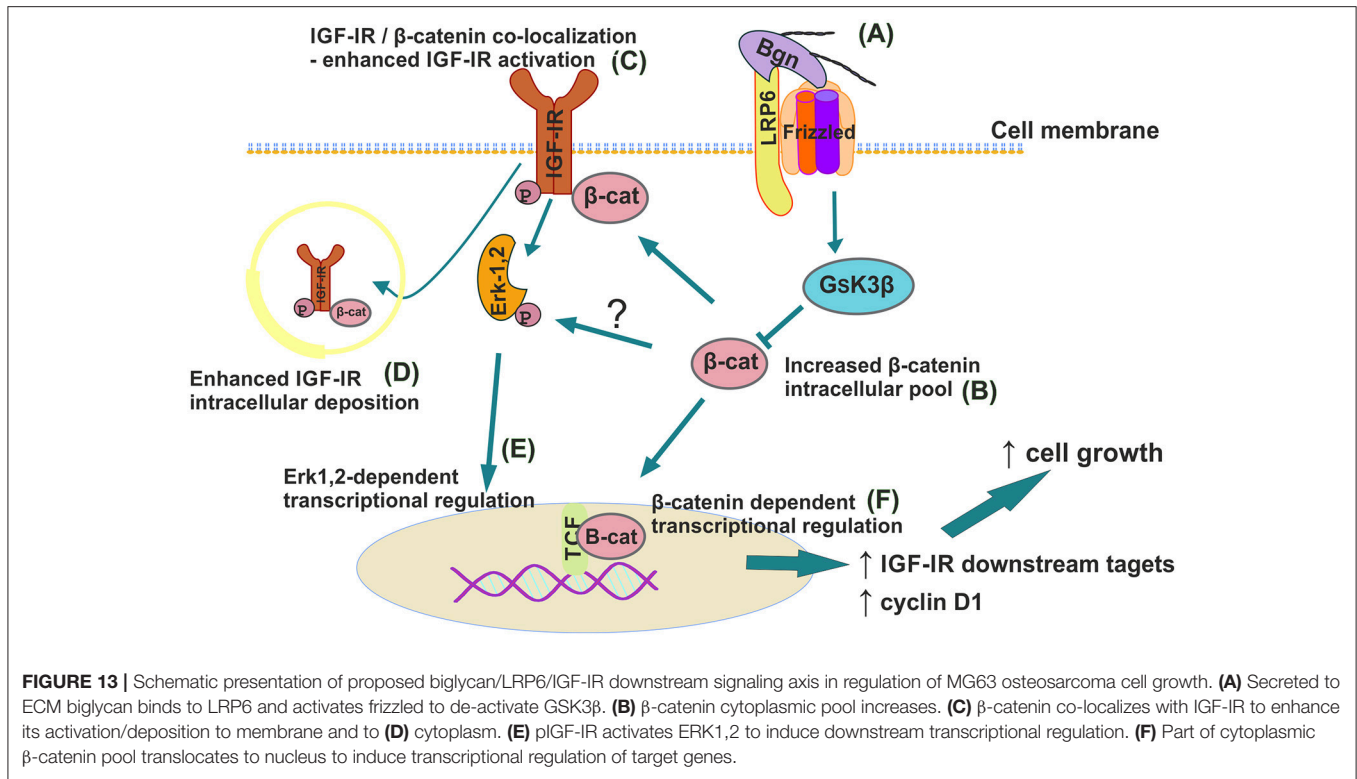


Furthermore, IGF-IR is upregulated in osteosarcoma tissue samples as recently shown by Liu et al. (47) whereas the genetic polymorphisms of IGF-I were shown to be correlated with osteosarcoma risk and prognosis (48). Since in the present study, we showed an enhancement of biglycan expression through IGF-IR downstream effects we examined the possible involvement of IGF-IR in biglycan-dependent osteosarcoma cell growth. Indeed, in this study IGF-IR downstream signaling, was shown to be a strong endogenous enhancer of MG63 cell growth, in keeping with previous reports (47, 49). Importantly, IGF-I/IGF-IR dependent growth was completely abrogated in biglycan-deficient cells. Previously, it has been demonstrated that ligand-induced IGF-IR activation is followed by proteasomal and lysosomal degradation of IGF-IR, a phenomenon of receptor desensitization (50). Thus, endogenous mechanisms prolonging IGF-IR activation would lead to a protracted IGF-I-dependent growth response and facilitate cancer progression. We hypothesized that biglycan downstream effects could lead to enhanced IGF-IR activation and prolonged growth response and assessed potential mediators focusing on the Wnt/ β -catenin. The indirect interactions of β -catenin with IGF-IR receptor and other members of the IGF-I signaling pathway have been reported as β -Catenin/POU5F1/SOX2 transcription factor complex mediates IGF-I receptor signaling and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma and Caveolin-1-LRP6 signaling module stimulates aerobic glycolysis in prostate cancer (27–29). On the other hand, it has been shown that biglycan regulates Wnt/ β -catenin pathway in osteoblastic-lineage cells, by either mediating ligand effects or modulating downstream signaling molecules (26).

We examined the possibility of a cross-talk between IGF-IR and Wnt/ β -catenin pathways in the biglycan effect on osteosarcoma growth. Interestingly, in this study β -catenin deficient MG63 osteosarcoma cells were shown to have abrogated both basal and IGF-I-dependent IGF-IR activation, and strongly attenuated growth. Likewise, we demonstrate for the first time that treatment of MG63 osteosarcoma cells with recombinant biglycan increases β -catenin expression and mediates its



cellular deposition and enhancing β -catenin's cell membrane and cytoplasmic localizations. Previously, it has been shown in mouse calvarial osteoblasts model, that biglycan interacts with both the canonical Wnt ligand Wnt3a and the Wnt co-receptor low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6). Furthermore, this co-localization enhanced downstream Wnt-induced β -catenin/T cell-specific factor-mediated transcriptional activity (26). In order to clarify the mechanism of biglycan action we examined biglycan and LRP6 respective localization in MG63 cells utilizing immunofluorescence assays. This approach showed that biglycan co-localizes with LRP6 in a manner



dependent on biglycan concentration. Binding of biglycan to (LRP5/6) co-receptors determines the inactivation of the β-catenin destruction complex and increases β-catenin cytoplasmic pool. This allows β-catenin to accumulate in the cytoplasm and translocate to the nucleus, where it forms a transcriptionally active complex with TCF/LEF family members or to engage in interactions with and stabilize its membrane/cytoplasmic pool (51). β-catenin cytoplasmic pool is deregulated in cancer in a manner correlated to cancer development (52).

Activation of Wnt signaling was previously shown to enhance the survival of osteoblastic cells, as demonstrated by the reduction in osteoblast and osteocyte apoptosis in mice not expressing the Wnt inhibitor sFRP1 (soluble frizzled-related protein 1) (53). Moreover, Wnt proteins were demonstrated in a separate study to prevent osteoblast and osteocyte apoptosis by a mechanism that requires activation of the Src/ERK signaling pathway (54). Furthermore, increased insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) protein levels and an activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 beta/β-catenin signaling pathway were identified in a mouse neurodegenerative disease model (55). In the present study a strong up regulation β-catenin to the MG63 cell cytoplasm as well as moderate upregulation to membrane and to nucleus was evidenced upon biglycan treatment. Furthermore, immunofluorescence demonstrated that increased MG63 cell growth correlated with β-catenin colocalizing with IGF-IR to the membrane, cytoplasm and nucleus. Previously in a number of chordoma biopsies, Aleksic et al. detected IGF-1R in the plasma membrane and cytoplasm which was expressed more strongly in

recurrent tumor than the primary (56). Furthermore, in the same cohort Aleksic et al. had identified heterogeneous nuclear IGF-1R, which has been linked with sensitivity to IGF-1R inhibition (56).

Our present data demonstrate that biglycan, by binding to the LRP6 receptor, inactivates the formation of the β-catenin destruction complex enhancing its cytoplasmic, membrane as well as nuclear deposition. Increased β-catenin pool interacts with IGF-IR, strongly enhancing pIGF-IR expression at different subcellular compartments. Furthermore, ERK1/2 was found to be a downstream mediator of biglycan/IGF-IR/β-catenin signaling axis facilitating MG63 cell growth. However, we do not exclude the possibility that ERK1/2 may be a downstream mediator of other membrane receptors including Wnt receptors (57) or that ERK1/2 contributes to the sustaining of the β-catenin cytoplasmic pool. Indeed, other studies have suggested an interaction(s) between the β-catenin/Wnt and the ERK pathway without clarifying the exact mechanism(s) of action (58–60). It has, however, been established in NIH 3T3 cells, that WNT3A induces cell proliferation through the activation of ERK and Wnt/β-catenin pathways indicating that these two signaling cascades interact at several levels (61). Moreover, in this study, we also confirm that an increased β-catenin nuclear translocation facilitated transcription of target cyclin D1 gene involved in cell cycle regulation, as previously well established in other models (62).

Our study presents some limitations. First, we utilized a single cell line (MG63), and second, we have not identified the

components of the IGF-IR/ β -catenin co-localization complex, an issue currently under investigation. Future studies in different *in vitro/in vivo* models as well as interpolation with data obtained from patient biopsies could provide more refined data to the mechanism presented here.

In summary we report a novel mechanism where biglycan, an ECM proteoglycan, through a LRP6/ β -catenin/IGF-IR axis enhances osteosarcoma cell growth (**Figure 13**). IGF-IR activation results in increased biglycan secretion thus, forming an autonomous ECM-originating signaling loop which contributes to osteosarcoma growth. Previously PGs were discussed to “regulate the bioavailability of hormones, growth factors, and cytokines as well as the activation of their respective receptors which regulate phenotypic diversibility, gene expression and rates of recurrence in specific tumor types” (40). Defining and targeting the components of the biglycan signaling loop on an individual patient may basis offer ground for the generation of tailor-made osteosarcoma strategies?

REFERENCES

- Iozzo RV, Murdoch AD. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* (1996) 10:598–614. doi: 10.1096/fasebj.10.5.8621059
- Iozzo RV. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Critic Rev Biochem Mol Biol.* (1997) 32:141–74. doi: 10.3109/10409239709108551
- Pietraszek-Gremplewicz K, Karamanou K, Niang A, Dauchez M, Belloy N, Maquart FX, et al. Small leucine-rich proteoglycans and matrix metalloproteinase-14: key partners? *Matrix Biol.* (2017). doi: 10.1016/j.matbio.2017.12.006. [Epub ahead of print].
- McEwan PA, Scott PG, Bishop PN, Bella J. Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. *J Struct Biol.* (2006) 155:294–305. doi: 10.1016/j.jsb.2006.01.016
- Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. Decoding the matrix: instructive roles of proteoglycan receptors. *Biochemistry* (2015) 54:4583–98. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00653
- Schaefer L, Tredup C, Gubbiotti MA, Iozzo RV. Proteoglycan neofunctions: regulation of inflammation and autophagy in cancer biology. *FEBS J.* (2017) 284:10–26. doi: 10.1111/febs.13963
- Nikitovic D, Aggelidakis J, Young MF, Iozzo RV, Karamanos NK, Tzanakakis GN. The biology of small leucine-rich proteoglycans in bone pathophysiology. *J Biol Chem.* (2012) 287:33926–33. doi: 10.1074/jbc.R112.379602
- Nikitovic D, Berdiaki K, Chalkiadaki G, Karamanos N, Tzanakakis G. The role of SLRP-proteoglycans in osteosarcoma pathogenesis. *Connect Tissue Res.* (2008) 49:235–8. doi: 10.1080/03008200802147589
- Hansen MF, Seton M, Merchant A. Osteosarcoma in Paget’s disease of bone. *J Bone Miner Res.* (2006) 21(Suppl. 2):P58–63. doi: 10.1359/jbmr.06s211
- Ottaviani G, Jaffe N. The etiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res.* (2009) 152:15–32. doi: 10.1007/978-1-4419-0284-9_2
- Jaffe N, Carrasco H, Raymond K, Ayala A, Eftekhari F. Can cure in patients with osteosarcoma be achieved exclusively with chemotherapy and abrogation of surgery? *Cancer* (2002) 95:2202–10. doi: 10.1002/cncr.10944
- Benayahu D, Shur I, Marom R, Meller I, Issakov J. Cellular and molecular properties associated with osteosarcoma cells. *J Cell Biochem.* (2001) 84:108–14. doi: 10.1002/jcb.1270
- Nikitovic D, Tsatsakis AM, Karamanos NK, Tzanakakis GN. The effects of genistein on the synthesis and distribution of glycosaminoglycans/proteoglycans by two osteosarcoma cell lines depends on tyrosine kinase and the estrogen receptor density. *Anticancer Res.* (2003) 23:459–64.
- Mintz MB, Sowers R, Brown KM, Hilmer SC, Mazza B, Huvoš AG, et al. An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma. *Cancer Res.* (2005) 65:1748–54. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2463
- Datsis GA, Berdiaki A, Nikitovic D, Mytilineou M, Katonis P, Karamanos NK, et al. Parathyroid hormone affects the fibroblast growth factor-proteoglycan signaling axis to regulate osteosarcoma cell migration. *FEBS J.* (2011) 278:3782–92. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08300.x
- Nikitovic D, Kavasi RM, Berdiaki A, Papachristou DJ, Tsiaoussis J, Spandidos DA, et al. Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide regulate osteosarcoma cell functions: focus on the extracellular matrix (Review). *Oncol Rep.* (2016) 36:1787–92. doi: 10.3892/or.2016.4986
- Yang X, Wang L, Wang Q, Li L, Fu Y, Sun J. MiR-183 inhibits osteosarcoma cell growth and invasion by regulating LRP6-Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* (2018) 496:1197–203. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.170
- Cai Y, Cai T, Chen Y. Wnt pathway in osteosarcoma, from oncogenic to therapeutic. *J Cell Biochem.* (2014) 115:625–31. doi: 10.1002/jcb.24708
- Xie D, Zheng GZ, Xie P, Zhang QH, Lin FX, Chang B, et al. Antitumor activity of resveratrol against human osteosarcoma cells: a key role of Cx43 and Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncotarget* (2017) 8:111419–32. doi: 10.18632/oncotarget.22810
- Zafiroopoulos A, Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Decorin-induced growth inhibition is overcome through protracted expression and activation of epidermal growth factor receptors in osteosarcoma cells. *Mol Cancer Res.* (2008) 6:785–94. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0165
- Nikitovic D, Berdiaki A, Zafiroopoulos A, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, et al. Lumican expression is positively correlated with the differentiation and negatively with the growth of human osteosarcoma cells. *FEBS J.* (2008) 275:350–61. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06205.x
- Nikitovic D, Chalkiadaki G, Berdiaki A, Aggelidakis J, Katonis P, Karamanos NK, et al. Lumican regulates osteosarcoma cell adhesion by modulating TGF β 2 activity. *Int J Biochem Cell Biol.* (2011) 43:928–35. doi: 10.1016/j.biocel.2011.03.008

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JA, AB, DN, DP, AT, and GT conceived and designed the experiments and wrote the paper. JA, AB, DN, DP, AP, and AT performed the experiments and analyzed the data. All authors approved the manuscript.

FUNDING

This research was partially supported by a Special Fund for Research Grants (ELKE) with grant number KA:10028 of University of Crete to DN.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00470/full#supplementary-material>

23. D'Avis PY, Frazier CR, Shapiro JR, Fedarko NS. Age-related changes in effects of insulin-like growth factor I on human osteoblast-like cells. *Biochem J.* (1997) 324 (Pt 3):753–60.
24. Pirskanen A, Jaaskelainen T, Maenpaa PH. Insulin-like growth factor-1 modulates steroid hormone effects on osteocalcin synthesis in human MG-63 osteosarcoma cells. *Eur J Biochem.* (1993) 218:883–91. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18444.x
25. LeRoith D, Roberts CT Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* (2003) 195:127–37. doi: 10.1016/S0304-3835(03)00159-9
26. Berendsen AD, Fisher LW, Kilts TM, Owens RT, Robey PG, Gutkind JS, et al. Modulation of canonical Wnt signaling by the extracellular matrix component biglycan. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2011) 108:17022–7. doi: 10.1073/pnas.1110629108
27. Xu C, Xie D, Yu SC, Yang XJ, He LR, Yang J, et al. Beta-catenin/POU5F1/SOX2 transcription factor complex mediates IGF-I receptor signaling and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* (2013) 73:3181–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4403
28. Tahir SA, Yang G, Goltsov A, Song KD, Ren C, Wang J, et al. Caveolin-1-LRP6 signaling module stimulates aerobic glycolysis in prostate cancer. *Cancer Res.* (2013) 73:1900–11. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3040
29. Fernandes JC, Rodrigues Alves APN, Machado-Neto JA, Scopim-Ribeiro R, Fenerich BA, da Silva FB, et al. IRS1/beta-catenin axis is activated and induces MYC expression in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Cell Biochem.* (2017) 118:1774–81. doi: 10.1002/jcb.25845
30. Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, Plaza-Campillo J, Scully C. beta-catenin in oral cancer: an update on current knowledge. *Oral Oncol.* (2014) 50:818–24. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.06.005
31. Aktary Z, Bertrand JU, Larue L. The WNT-less wonder: WNT-independent beta-catenin signaling. *Pigment Cell Melanoma Res.* (2016) 29:524–40. doi: 10.1111/pcmr.12501
32. Shang S, Hua F, Hu ZW. The regulation of beta-catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget* (2017) 8:33972–89. doi: 10.18632/oncotarget.15687
33. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO J.* (2012) 31:2714–36. doi: 10.1038/emboj.2012.150
34. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* (1999) 398:422–6. doi: 10.1038/18884
35. Shlutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1999) 96:5522–7. doi: 10.1073/pnas.96.10.5522
36. Werner H, Sarfstein R, LeRoith D, Bruchim I. Insulin-like growth factor 1 signaling axis meets p53 genome protection pathways. *Front Oncol.* (2016) 6:159. doi: 10.3389/fonc.2016.00159
37. Satyamoorthy K, Li G, Vaidya B, Patel D, Herlyn M. Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways. *Cancer Res.* (2001) 61:7318–24.
38. Subbarayan K, Seliger B. Tumor-dependent effects of proteoglycans and various glycosaminoglycan synthesizing enzymes and sulfotransferases on patients' outcome. *Curr Cancer Drug Targets* (2018). doi: 10.2174/1568009618666180706165845. [Epub ahead of print].
39. Brezillon S, Untereiner V, Mohamed HT, Hodin J, Chatron-Collet A, Maquart FX, et al. Probing glycosaminoglycan spectral signatures in live cells and their conditioned media by Raman microspectroscopy. *Analyst* (2017) 142:1333–41. doi: 10.1039/C6AN01951J
40. Nikitovic D, Berdiaki A, Spyridaki I, Krasanakis T, Tsatsakis A, Tzanakakis GN. Proteoglycans-biomarkers and targets in cancer therapy. *Front Endocrinol.* (2018) 9:69. doi: 10.3389/fendo.2018.00069
41. Mytilinaiou M, Nikitovic D, Berdiaki A, Kostouras A, Papoutsidakis A, Tsatsakis AM, et al. Emerging roles of syndecan 2 in epithelial and mesenchymal cancer progression. *IUBMB Life* (2017) 69:824–33. doi: 10.1002/iub.1678
42. Hammond E, Khurana A, Shridhar V, Dredge K. The role of heparanase and sulfatases in the modification of heparan sulfate proteoglycans within the tumor microenvironment and opportunities for novel cancer therapeutics. *Front Oncol.* (2014) 4:195. doi: 10.3389/fonc.2014.00195
43. Barbouri D, Afratis N, Gialeli C, Vynios DH, Theocharis AD, Karamanos NK. Syndecans as modulators and potential pharmacological targets in cancer progression. *Front Oncol.* (2014) 4:4. doi: 10.3389/fonc.2014.00004
44. Chen XD, Bian X, Teslovich TM, Stephan DA, Young MF. Dissection of the sets of genes that control the behavior of biglycan-deficient pre-osteoblasts using oligonucleotide microarrays. *Bone* (2005) 37:192–203. doi: 10.1016/j.bone.2005.04.006
45. Mortus JR, Zhang Y, Hughes DP. Developmental pathways hijacked by osteosarcoma. *Adv Exp Med Biol.* (2014) 804:93–118. doi: 10.1007/978-3-319-04843-7_5
46. Schmid C, Ghirlanda C, Niessen M. Prevention of tumour cell apoptosis associated with sustained protein kinase B phosphorylation is more sensitive to regulation by insulin signalling than stimulation of proliferation and extracellular signal-regulated kinase. *Mol Cell Biochem.* (2017) 432:41–54. doi: 10.1007/s11010-017-2996-y
47. Liu Y, Zhu ST, Wang X, Deng J, Li WH, Zhang P, et al. MiR-100 inhibits osteosarcoma cell proliferation, migration, and invasion and enhances chemosensitivity by targeting IGFR. *Technol Cancer Res Treat.* (2016) 15:NP40–8. doi: 10.1177/1533034615601281
48. Mao J, Zhuang G, Chen Z. Genetic polymorphisms of insulin-like growth factor 1 are associated with osteosarcoma risk and prognosis. *Med Sci Monitor* (2017) 23:5892–8. doi: 10.12659/MSM.908004
49. Daqian W, Chuandong W, Xinhua Q, Songtao A, Kerong D. Chimaphilin inhibits proliferation and induces apoptosis in multidrug resistant osteosarcoma cell lines through insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) signaling. *Chem Biol Interact.* (2015) 237:25–30. doi: 10.1016/j.cbi.2015.05.008
50. Vecchione A, Marchese A, Henry P, Rotin D, Morriore A. The Grb10/Nedd4 complex regulates ligand-induced ubiquitination and stability of the insulin-like growth factor I receptor. *Mol Cell Biol.* (2003) 23:3363–72. doi: 10.1128/MCB.23.9.3363-3372.2003
51. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* (2006) 127:469–80. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.018
52. Yamaguchi H, Hsu JL, Hung MC. Regulation of ubiquitination-mediated protein degradation by survival kinases in cancer. *Front Oncol.* (2012) 2:15. doi: 10.3389/fonc.2012.00015
53. Bodine PV, Zhao W, Kharode YP, Bex FJ, Lambert AJ, Goad MB, et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol.* (2004) 18:1222–37. doi: 10.1210/me.2003-0498
54. Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem.* (2005) 280:41342–51. doi: 10.1074/jbc.M502168200
55. Saraceno GE, Bellini MJ, Garcia-Segura LM, Capani F. Estradiol activates PI3K/Akt/GSK3 pathway under chronic neurodegenerative conditions triggered by perinatal asphyxia. *Front Pharmacol.* (2018) 9:335. doi: 10.3389/fphar.2018.00335
56. Aleksic T, Browning L, Woodward M, Phillips R, Page S, Henderson S, et al. Durable response of spinal chordoma to combined inhibition of IGF-1R and EGFR. *Front Oncol.* (2016) 6:98. doi: 10.3389/fonc.2016.00098
57. Palsgaard J, Emanuelli B, Winnay JN, Sumara G, Karsenty G, Kahn CR. Cross-talk between insulin and Wnt signaling in preadipocytes: role of Wnt co-receptor low density lipoprotein receptor-related protein-5 (LRP5). *J Biol Chem.* (2012) 287:12016–26. doi: 10.1074/jbc.M111.337048
58. Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev A. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol.* (2003) 163:847–57. doi: 10.1083/jcb.200308162
59. Georgopoulos NT, Kirkwood LA, Southgate J. A novel bidirectional positive-feedback loop between Wnt-beta-catenin and EGFR-ERK plays a role in context-specific modulation of epithelial tissue regeneration. *J Cell Sci.* (2014) 127(Pt 13):2967–82. doi: 10.1242/jcs.150888

60. Kouvidi K, Berdiaki A, Tzardi M, Karousou E, Passi A, Nikitovic D, et al. Receptor for hyaluronic acid- mediated motility (RHAMM) regulates HT1080 fibrosarcoma cell proliferation via a beta-catenin/c-myc signaling axis. *Biochim Biophys Acta* (2016) 1860:814–24. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.01.019
61. Yun MS, Kim SE, Jeon SH, Lee JS, Choi KY. Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation. *J Cell Sci.* (2005) 118(Pt 2):313–22. doi: 10.1242/jcs.01601
62. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* (2004) 303:1483–7. doi: 10.1126/science.1094291

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Aggelidakis, Berdiaki, Nikitovic, Papoutsidakis, Papachristou, Tsatsakis and Tzanakakis. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

The Biology of Small Leucine-rich Proteoglycans in Bone Pathophysiology*

Published, JBC Papers in Press, August 9, 2012, DOI 10.1074/jbc.R112.379602

Dragana Nikitovic[‡], John Aggelidakis[§], Marian F. Young[¶], Renato V. Iozzo^{||}, Nikos K. Karamanos^{**}, and George N. Tzanakakis^{‡1}

From the [‡]Department of Histology-Embryology, Medical School, University of Crete and the [§]Department of Orthopedics, University Hospital of Heraklion, Heraklion 71003, Greece, the [¶]Craniofacial and Skeletal Diseases Branch, NIDCR, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, the ^{||}Department of Pathology, Anatomy, and Cell Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, and the ^{**}Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Patras, Patras 26110, Greece

The class of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) is a family of homologous proteoglycans harboring relatively small (36–42 kDa) protein cores compared with the larger cartilage and mesenchymal proteoglycans. SLRPs have been localized to most skeletal regions, with specific roles designated during all phases of bone formation, including periods relating to cell proliferation, organic matrix deposition, remodeling, and mineral deposition. This is mediated by key signaling pathways regulating the osteogenic program, including the activities of TGF- β , bone morphogenetic protein, Wnt, and NF- κ B, which influence both the number of available osteogenic precursors and their subsequent development, differentiation, and function. On the other hand, SLRP depletion is correlated with degenerative diseases such as osteoporosis and ectopic bone formation. This minireview will focus on the SLRP roles in bone physiology and pathology.

SLRP Structure and Classification

The small leucine-rich proteoglycans (SLRPs)² were originally defined as proteoglycans with a relatively small protein core (36–42 kDa) harboring tandem leucine-rich repeats and undergoing post-translational modifications, including substitution with glycosaminoglycan side chains of various types (1, 2). Their ubiquitous tissue distribution and expression at strategic sites in embryogenesis and tissue repair, coupled with their protein conservation, suggests that SLRP functions are of no small consequence. Originally, the SLRPs were grouped into three distinct classes based on nucleotide and protein sequence conservation, the organization of disulfide bonds at their N and C termini, and their genomic organization (2, 3). More recently, the SLRP gene family has expanded to encompass 18 genes classified into five distinct subfamilies (Table 1) (4, 5), addition-

ally based on N-terminal Cys-rich clusters of the protein core and ear repeats (C-terminal repeats specific to SLRPs) (6), chromosomal organization (4, 5), and, importantly, functional commonality in view of the fact that some SLRPs are not classical proteoglycans (4). Thus, the canonical class I members decorin and biglycan contain chondroitin or dermatan sulfate side chains, whereas the more recently described asporin does not (7, 8). On the other hand, all class II members bear keratan sulfate chains or poly-lactosamine in their leucine-rich repeats, whereas class III members carry keratan sulfate (osteoglycin), chondroitin/dermatan sulfate (epiphygan), or no glycosaminoglycan (opticin) chains (4, 9). However, most non-canonical class IV and V members (10–13) unexpectedly lack any glycosaminoglycan chain, with the exception of chondroadherin, which is substituted with keratan sulfate (10). Therefore, the unique characteristics of their protein cores and the presence of glycosaminoglycans, together with specific post-translational modifications, notably changes in the degree of glycosaminoglycan epimerization or sulfation, characterize this class of proteoglycans with high structural complexity.

SLRP Functional Network

Following synthesis, most of the SLRPs are secreted into the pericellular matrix, where they either diffuse and bind to components of the extracellular matrix (ECM), *e.g.* collagens, or remain free. The localization of the SLRPs in the ECM appears to be strictly predetermined, with specific SLRPs being predominantly distributed in the ECM “proper” (*i.e.* further removed from the cell or inter-territorial), whereas others are localized both to the ECM and pericellular matrix (territorial, immediately surrounding cells) (7, 14, 15). In addition, the localization of SLRPs to specific compartments is dependent on the tissue of origin (16, 17). ECM-proper SLRPs bind to various types of collagens, thereby regulating the kinetics, assembly, and special organization of fibrils in skin, tendons, bone, and cornea (Fig. 1A) (2, 18–20). However, besides being sequestered mainly in the ECM, ECM-proper SLRPs can also exist as soluble molecules, *e.g.* when released from the ECM by proteolytic digestion of injured tissues. Both bound and soluble SLRPs interact with various growth factors, including TGF- β (Fig. 1B) (21), bone morphogenetic protein BMP4 (22), WISP-1 (Wnt1-inducible secreted protein-1) (23), von Willebrand factor (24), PDGF (25), TNF- α (26), and insulin-like growth factor I (IGF-I) (27). This biological interaction modulates growth factor bioavailability through the formation of specific concentration gradients. On the other hand, SLRP pericellular localization allows these molecules to interact with different ligands and cell-surface receptors, thereby modulating a wide range of cell-matrix interactions (4). Pericellular decorin binds the EGF receptor and ErbB4 in tumor cells, leading to transient activation of the MAPK pathway, mobilization of intracellular Ca²⁺ levels, and induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1} (28) with subsequent down-regulation of the receptor (29–31). Furthermore, decorin binds directly to Met, the receptor for hepatocyte growth factor (32), which is noteworthy, as

* This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grants R01 CA39481 and R01 CA47282 (to R. V. I.) and the NIDCR Division of Intramural Research (to M. F. Y.). This work was also supported by ELKE (Research Committee, University of Crete) Grant KA 3082 (to G. N. T.).

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 30-2810-394719; Fax: 30-2810-394786; E-mail: tzanakakis@med.uoc.gr.

² The abbreviations used are: SLRP, small leucine-rich proteoglycan; ECM, extracellular matrix; IGF-I, insulin-like growth factor I.

TABLE 1
SLRP classes: organization and interacting partners

SLRP class	Class members	Classification parameters	Binding partners
I	Biglycan (BGN) Decorin (DCN) Asporin ECM-2	The N termini have a typical cluster of Cys residues that form two disulfide bonds. Decorin and biglycan can be substituted with either one or two chondroitin/ dermatan sulfate side chains. Asporin lacks the typical Ser-Gly dipeptide and flanking amino acids required for glycanation (7, 8). ECM2 is much larger and structurally different from conventional SLRPs, its LRRs are 35% identical to the corresponding domains of decorin, and the ECM2 gene is physically linked to asporin on chromosome 9 (4).	Biglycan and decorin bind TGF- β through their protein cores with Kd values ranging from 1 to 20 nM for a high-affinity binding site and 50 to 200 nM for the lower-affinity binding site (21); and TNF- α through both protein core and GAG chains with Kds, 0.26 μ M and 0.81 μ M for biglycan and decorin respectively (26). Biglycan binds BMP-4 (22), TLR-2/4 (33, 34). BMP2/ALK6 (51). Decorin binds to PDGF (15), (IGF-I) receptor on endothelial cells with an affinity in the nanomolar range (Kd = 18 nm), which is comparable with IGF-I (Kd = 1.2 nm) (27), EGFR (28), Met (32) and TLR2/4 (37). Asporin binds TGF β 1 and this binding is significantly inhibited by decorin, biglycan, and fibromodulin (8).
II	Fibromodulin (FMOD) Lumican (LUM) PRELP Keratocan (KERA) Osteoadherin (ODH)	Class II SLRPs contain clusters of Tyr sulfate residues at their N termini that could contribute to the polyanionic nature of SLRPs. These SLRPs contain primarily keratan sulfate and polyactosamine, an unsulfated form of keratan sulfate, and their respective genes have a similar exonic organization (three exons), with a large central exon encoding most of LRRs (4).	Lumican is proposed to bind FasL (38), modulate TGF- β signaling (40) and interact with p65 nuclear factor kappaB (NF- κ B) (65).
III	Epiphycean (EPYC) Opticin (OPTC) Osteoglycin (OGN)	The three members of this class are characterized by a relatively low number of LRRs (seven LRRs) and a genomic organization comprising seven exons. Even though most of these SLRPs have a consensus sequence for glycanation, some of them exist as glycoproteins in tissues (4, 9).	Opticin binds growth hormone (9).
IV	Chondroadherin (CHAD) Nycetolopin (NYC) Tsukushi (TSKU)	Class IV, a non-canonical class of SLRPs, is proposed to consist of chondroadherin and nycetolopin (10, 11) and of a new member called tsukushi (12). Nycetolopin is very interesting, being the first described glycosylphosphatidylinositol-anchored member and the second linked to the X chromosome (11). Tsukushi shares functional properties with class I SLRPs (12).	Tsukushi is a BMP inhibitor that forms a ternary complex with BMP and chordin (12).
V	Podocan (PODN) Podocan-like protein-1 (PODN-1)	Class V, a new non-canonical class of SLRPs is proposed to contain two genes, podocan located on chromosome I and a highly homologous podocan-like protein 1 (NCBI accession number 079101) located on chromosome 19. Although these proteins have a different C-terminal Cys rich cluster, they have 20 LRRs with homology to class I and II molecules. Moreover, podocan binds collagen I and inhibits cell growth via induction of p21, both functional properties shared by other SLRP members (13).	Podocan binds collagen and increases p21 expression (13).

signaling through Met leads to the phosphorylation of β -catenin, a known effector of the crucial Wnt signaling pathway that up-regulates tumor cell motility, tissue invasion, and metastasis.

Under physiological conditions, decorin signaling through the IGF-I receptor exerts anti-apoptotic effects, favoring in this manner normal cell growth. By binding to the IGF-I receptor, decorin triggers phosphorylation and downstream activation of phosphoinositide 3-kinase, Akt/protein kinase B, and p21^{WAF1}, inducing an anti-apoptotic effect (27). Another class I SLRP, biglycan, acts as a signaling molecule important for the innate immune system. Upon tissue stress or injury, sequestered and immunologically inactive biglycan is released from the ECM through a so far undefined proteolytic mechanism. Soluble biglycan interacts with the innate immunity Toll-like receptors TLR-2 and TLR-4 on macrophages, taking on a role of an endogenous ligand and consequently triggering an inflammatory response (33, 34). This role could also be relevant in tumor biology, as active Toll-like receptor signaling in tumor cells was shown to affect transformed cell functions (35, 36). A recent report (37) has shown that also decorin binds to TLR-2/4,

thereby inducing the production of PDCD4 (proinflammatory programmed cell death 4) in macrophages. Moreover, decorin prevents the translation repression of PDCD4 via induction of microRNA-21, a PDCD4 repressor. Thus, decorin can boost proinflammatory activity and concurrently retard tumor growth by induction of PDCD4 and microRNA-21.

Additional signaling pathways have also been identified for the class II SLRP, lumican. Fas-FasL signaling, a key cellular pathway, was found to be disrupted in *Lum*^{-/-} stromal corneal keratocytes (38). Consequently, it has been proposed that lumican could directly bind FasL, thereby facilitating induction of Fas. Poor signaling through Fas-FasL in *Lum*^{-/-} mice ultimately leads to attenuated apoptosis of stromal cells, impaired induction of inflammatory cytokines, impaired recruitment of inflammatory cells, and retarded corneal healing. Lumican appears to regulate fibroblast proliferation by modulating specific cell growth mediators. Thus, *Lum*^{-/-} fibroblasts have decreased p21^{WAF1}, a universal inhibitor of cyclin-dependent kinases, and a consequent increase in cyclins A, D₁, and E. Furthermore, the tumor suppressor p53, an upstream regulator of p21^{WAF1}, is down-regulated in *Lum*^{-/-} fibroblasts, suggesting regulation of p21^{WAF1} by lumican in a p53-dependent manner (38). Lumican overexpression was found to suppress tumorigenic transformation of rat fibroblasts induced by *v-src* and *v-K-ras* (39), suggesting that down-regulation of lumican expression may play a role in development of some human cancers. In a recent study by Nikitovic *et al.* (40), lumican was found to modulate the crucial Smad signaling pathway in bone tumor cells.

Given that SLRP production, turnover, and ultimate localization are dynamic processes, variable SLRP availability at different compartments would facilitate signaling pathways regulating specific biological and pathological processes (41). However, the exact mechanisms regulating equilibrium between "free" and bound SLRPs clearly need to be further studied. Some important questions that need to be answered would be how changes in the ECM composition shunt more bound SLRPs into the free pool and to what extent their release is dependent on the degradation of the retaining ECM. Furthermore, we should also consider the activities of processed SLRP fragments vis-à-vis the parent proteins, especially relevant under pathological conditions. Indeed, significant proteolysis of SLRP protein cores occurs in both normal and arthritic tissues, with specific catabolites of biglycan and fibromodulin identified only in the cartilage from damaged joints (42).

The collective findings summarized above clearly indicate that numerous pathways can be affected by the SLRPs. Whether the same pathways are operative in bone biology and musculoskeletal tissues is not entirely clear at this time. However, these investigations provide a fundamental platform upon which to build and deepen our understanding of SLRP function in bone (Fig. 1B).

Key Roles of SLRPs in Bone Physiology

It is now firmly established that specific SLRPs are functionally involved in normal bone development and homeostasis. Using a combination of *in situ* hybridization and immunohistochemistry, class I SLRPs (biglycan and decorin) have been

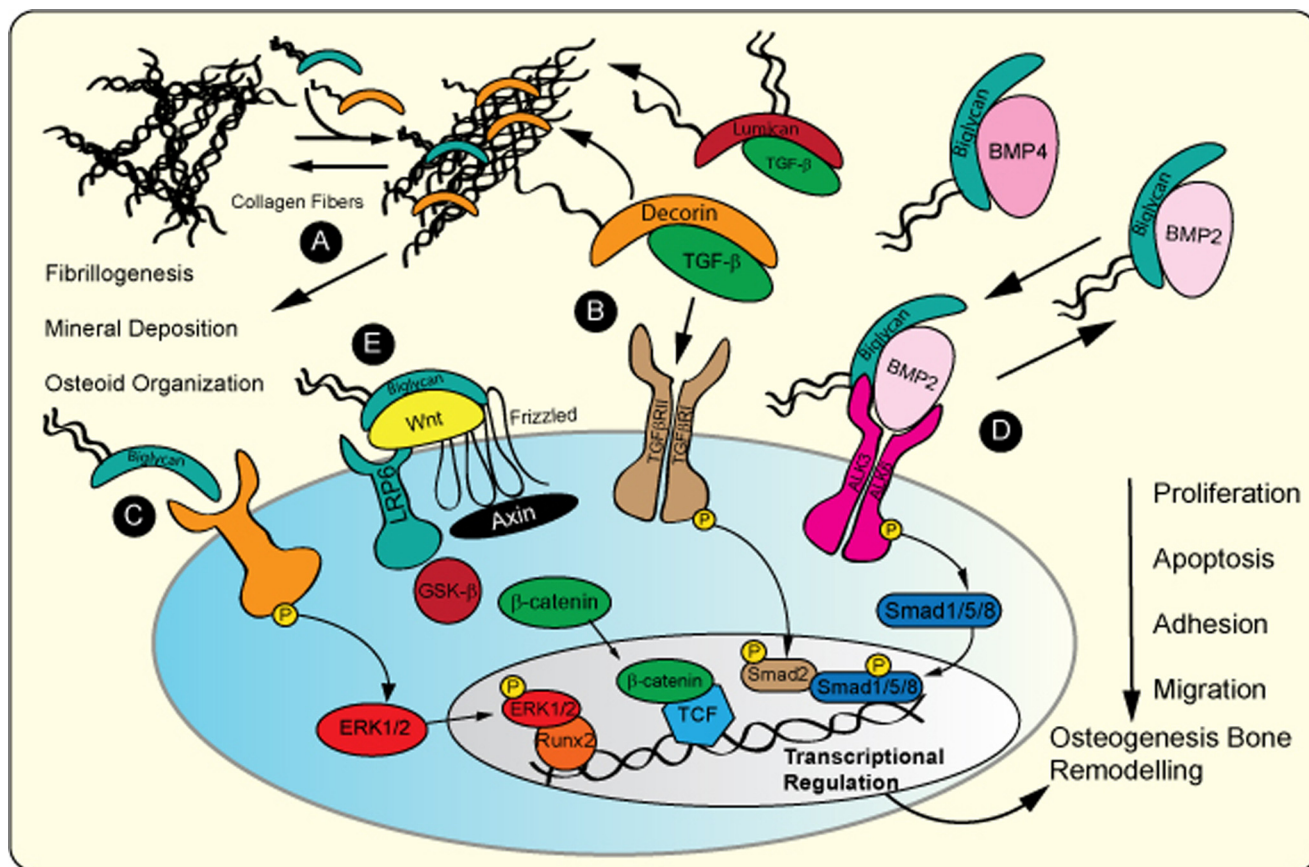


FIGURE 1. **Schematic representation of the roles of SLRPs and their specific signaling pathways in osteogenesis and remodeling.** A, SLRPs have specific roles during all phases of bone formation, including periods relating to cell proliferation, organic matrix deposition, remodeling, and mineral deposition. B, binding of TGF- β to SLRPs (decorin and lumican) regulates its downstream Smad2/3 signaling by facilitating or inhibiting ligand presentation to respective receptors to control bone formation. C, biglycan stimulates ERK phosphorylation and signal transduction through the transcription factor Runx2 to promote osteoblast differentiation. D, biglycan sustains the binding of BMP2/ALK6 to enhance Smad1/5/8 phosphorylation to facilitate downstream signaling relevant to osteogenesis. E, biglycan promotes Wnt3a binding to the LRP6 coreceptor subunit (which engages the Frizzled receptor for complete Wnt-mediated signaling), thereby activating β -catenin signaling to promote bone growth. TCF, T cell factor.

localized to many skeletal regions, including articular and epiphyseal cartilage, vascular canals, subchondral regions, and the periosteum (43). SLRPs have specific roles during all phases of bone formation, including periods relating to cell proliferation, organic matrix deposition, remodeling, and mineral deposition (44, 45). Generation of mutant mice with targeted deletion of *Bgn* has shown that biglycan-deficient mice are viable and have no profound skeletal patterning abnormalities at birth. However, with age, their long bones show decreased length coupled with decreased mineral density and mass compared with age-matched controls (46). Biglycan deficiency leads to structural abnormalities in collagen fibrils in bone, dermis, and tendon and to a “subclinical” cutaneous phenotype with thinning of the dermis but without overt skin fragility (47). Furthermore, male mice depleted of biglycan (the *Bgn* gene is located on the X chromosome; thus, male mice do not contain a second allele of *Bgn*), designated *Bgn*^{-1/0,+1/0}, exhibit reduced bone formation compared with control mice, indicating that biglycan is important for the cells that control bone production (47).

The key role of biglycan in bone development is corroborated by the observation that bone marrow ablation in biglycan-null mice leads to delayed osteogenesis (48). Specifically, mice deficient in *Bgn* develop age-dependent osteopenia and have multiple metabolic defects in their bone marrow stromal cells,

including increased apoptosis, reduced numbers of colony-forming units, and decreased collagen production (48). Therefore, the strategy of using mice deficient in one or more SLRPs has enabled the identification of early molecular events causing skeletal abnormalities that are dependent on SLRP function.

In view of the fact that the *BGN* gene maps to the X chromosome, patients with Turner syndrome (45 chromosomes, X0) have reduced biglycan expression and exhibit short stature, infertility, and early-onset osteoporosis. In contrast, patients with supernumerary sex chromosomes (e.g. Klinefelter syndrome) show increased biglycan expression and longer limbs (49). Thus, bone metabolism in biglycan-deficient mice could be gender-dependent. Indeed, in contrast to male mice, the bone tissue of female mice is less affected, suggesting a gender difference in biglycan skeletal function.

Biglycan can also control key signaling pathways regulating the osteogenic program, including the activity of the multifunctional cytokines TGF- β (50), BMP4 (22, 51), and Wnt (52) (Fig. 1, C–E). Consequently, biglycan can affect the number of available osteogenic precursors as well as their subsequent development, differentiation, and function in bone formation.

Phenotypic analysis of *Dcn*^{-1/-}/*Bgn*^{-1/-} double-null mice reveals that the pathological bone phenotype is more severe and appears evident earlier compared with *Bgn*-deficient mice. In

Roles in Degenerative Bone Diseases

SLRP biology is also closely linked to degenerative skeletal processes. Earlier studies have shown that targeted disruption of the *Bgn* gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice (46). Subsequently, it was proposed that the altered collagen phenotypes in mice deficient in one or more SLRPs demonstrate a cooperative, sequential, timely orchestrated action of the SLRPs that altogether shape the architecture and mechanical properties of the collagen matrix (66). The development of osteoporosis among other disease states by SLRP-deficient mice suggests that mutations in SLRPs may be part of undiagnosed predisposing genetic factors specific for the disease (66). On the other hand, biglycan deficiency was found to protect against increased trabecular bone turnover and bone loss in response to estrogen depletion, supporting the concept that biglycan may modulate both formation and resorption, ultimately influencing the bone turnover process (67).

In addition to normal bone turnover, the SLRPs have been shown to contribute to ectopic ossification (68) of soft tissues. Although both singly depleted biglycan and fibromodulin mice develop ectopic bone in tendon, the effect is exaggerated when the two SLRPs are deleted simultaneously, thus suggesting synergistic activities for these two SLRPs on this function (69). Recently, *in vivo* osteolysis experiments showed that LPS-induced osteolysis occurred more rapidly and extensively in *Bgn*-deficient mice compared with wild-type mice due to increased osteoclast differentiation and activity secondary to defective osteoblasts (70). Moreover, deregulation of matrix protein expression, including that of biglycan, was demonstrated in hypophosphatemia (*Hyp*) mice with osteomalacia (71). Considering that the depletion of SLRPs exacerbates degenerative diseases such as osteoporosis, osteoarthritis, and ectopic bone formation and taking into account an evermore aging population, rife with skeletal issues, one should consider novel therapies such as the use of SLRPs to ameliorate these pathological conditions.

Roles in Bone Tumor Progression

Malignant bone tumors are characterized by the presence of undifferentiated osteoprogenitors that proliferate and develop a mass of tumor tissue recognized as osteosarcoma. The expression and consequent function of SLRPs in primary bone tumors are known to differ compared with disease-free tissue. The absence of biglycan message observed in osteosarcoma samples and some osteosarcoma cell lines provides evidence for alterations in the extracellular matrix that result with non-mineralized osteoid produced by the osteosarcoma cells (72). Dissection of the sets of genes that control the behavior of *Bgn*-null pre-osteoblasts using oligonucleotide microarrays revealed that *Bgn* deficiency affects the genes that control inflammation, immune response, and growth of tumor cells (73). Indeed, biglycan affects osteoblastic tumor cell behavior, as it was recently suggested that osteosarcoma cells utilize Runx2 and the FGF-2/syndecan/heparan sulfate proteoglycan axis, a key effector of the osteogenic program, to regulate their migration in a manner dependent on biglycan expression (74). Furthermore, osteosarcoma markers of poor response to therapy (Huvos grade I/II

addition to the gross skeletal phenotype appearance, *Bgn* and *Dcn* double deficiency results in a striking change in collagen fibril shape and organization to an extent that is greater than the additive effect. Therefore, the effects of *Dcn/Bgn* deficiency in bone are likely synergistic even though *Dcn* deficiency does not appear to affect bone phenotype by itself (47). This could be explained partly by the suggestion that the absence of biglycan and decorin prevents TGF- β from proper sequestration within the ECM. First, decorin and subsequently biglycan, asporin, and fibromodulin were found to bind TGF- β (21, 53), forming SLRP·TGF- β complexes, which are either eliminated from the tissue (via the circulation or by urinary excretion) or, in the presence of collagen I, are sequestered in the ECM, thus down-regulating TGF- β signaling (54–56). However, the interaction of SLRPs with TGF- β could also enhance the bioactivity of TGF- β , as seen in the case of decorin during the process of bone formation during remodeling (57) or muscle formation (58). Therefore, the direct binding of excess TGF- β to its receptors on bone marrow stromal cells could cause a “switch in fate” from growth to apoptosis and thus ultimately lead to decreased numbers of osteoprogenitor cells and subsequent reduced bone formation (50). Furthermore, biglycan promotes osteoblast differentiation through ERK phosphorylation and signal transduction through the transcription factor Runx2 (Fig. 1C) (59); alternatively, the biglycan protein core can bind to BMP2 and BMP2·ALK6 (activin receptor-like kinase 6), thereby sustaining the binding of BMP2·ALK6 (Fig. 1D). The BMP2·biglycan·ALK6 complex can phosphorylate Smad1/5/8 and thus facilitate their downstream signaling relevant to osteogenesis (60). Recently, biglycan was suggested to support Wnt signaling *in vivo* in a manner beneficial to bone formation (52). In this latter study, biglycan promoted binding of Wnt3a to bone matrix by a direct interaction that involved further interface with a key Wnt coreceptor in bone LRP6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 6) (Fig. 1E).

Lumican is a major proteoglycan component of bone matrix. It is secreted by both differentiating and mature osteoblasts but not by proliferating pre-osteoblasts, and therefore, it can be used as a marker to distinguish proliferating pre-osteoblasts from differentiating osteoblasts (61). Keratocan expression is correlated with a more differentiated osteoblast phenotype, whereas histomorphometric analysis indicates that *Kera*^{-/-} mice have significantly decreased rates of bone formation and mineral apposition (62). Male epiphycan (*Dspg3*)-deficient mice also have significantly shorter femurs than wild-type mice at 9 months. Knee joints from *Dspg3/Bgn* double-null mice display increased matrix protein expression compared with wild-type mice. This enhanced expression also includes other SLRP members such as asporin, fibromodulin, and lumican, demonstrating compensatory mechanisms among different SLRP family members (63). The importance of SLRPs in bone homeostasis is further illuminated by the finding that individual members show species-specific and age-related changes that correlate with altered homeostasis of the aging skeleton (64). Another example of the importance of SLRPs in bone biology is offered by proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein, which can down-regulate osteoclastogenesis apparently by inhibiting NF- κ B activity (65).

response defines tumors with little or no response to chemotherapy) are predominantly gene products involved in microenvironmental remodeling and osteoclast differentiation, including *Bgn* (75). On the other hand, gene chip analysis has demonstrated that biglycan has the highest expression (out of 137 genes) in giant cell tumors of bone (76). Moreover, a series of chondrosarcomas, malignant tumors of cartilage epidemiologically established as the second most common primary malignant neoplasm of the skeleton in adults (77), were found to have up-regulated *DCN* transcript levels (78), whereas a human chondrosarcoma cell line was found to express higher amounts of *BGN* and not to express *DCN* (79).

Decorin had severalfold reduced expression in osteoblastic osteosarcoma patients compared with non-osteoblastic osteosarcoma patients, which could be correlated to a poorer prognosis of the first patient group (80). Immunohistochemistry using polyclonal and monoclonal antibodies against ECM molecules, including decorin, has proved to be a useful tool for the differential characterization of osteoid in a series of 20 osteosarcomas with different variants of osteoid formation (81). Importantly, several studies have shown that the histological subtype of osteosarcoma is a predictive factor for response to chemotherapy (82, 83) and correlates with a disease-free period (84, 85) and overall survival (86). Moreover, decorin was found to suppress murine osteosarcoma lung metastasis, which correlated to lower adhesion and motility capabilities of the decorin-expressing osteosarcoma cells (87). Collectively, these findings strongly correlate with the well established antitumor properties of decorin (88). Interestingly, the only exception to the established oncosuppression model is the case of the highly aggressive MG-63 human osteosarcoma cells, found to constitutively produce decorin and to be resistant to decorin-induced growth arrest (89).

The role of lumican in osteosarcoma pathogenesis has previously been reviewed (90). Indeed, the generation of *LUM*-deficient osteosarcoma cells suggested that *LUM* expression may be positively correlated with the differentiation and negatively correlated with the progression of osteosarcoma (40). Furthermore, a novel out-in signaling circuit in human osteosarcoma cells was described: secreted lumican was found to be an endogenous inhibitor of TGF- β 2 activity, resulting in downstream effector modulation, including phospho-Smad2, integrin β 1, and phosphorylated focal adhesion kinase to regulate osteosarcoma adhesion (91). On the other hand, fibromodulin expression was shown to be regulated by the BMP signaling pathway and thus possibly correlated to osteoblast origin cell transformation (92).

Potential Therapeutic Agents for Bone Diseases

As regulators of signaling molecules, SLRPs may hold promise for treatment and prevention of disease. The modulation of *Bgn* gene expression has been proposed to represent a mechanism to counteract mineralized bone loss under conditions of estrogen depletion (67). Trans-osseous application of low-intensity ultrasound at the tendon graft-bone healing interface stimulated endogenous expression of *Bgn* and collagen I, thereby enhancing tendon-bone healing (93). The above studies support utilization of biglycan therapy as a credible thera-

peutic venue to reduce or block degenerative bone diseases. Proof of principle for the possibility of such an application derives from a recent study showing that injections of biglycan into dystrophin-deficient *mdx* mice can repair numerous defects that mimic muscular dystrophy, including the improvement of muscle function (94). In this regard, it can be noted that exogenously applied recombinant biglycan could “rescue” impaired LRP6 signaling caused by a mutation in the extracellular domain of this Wnt receptor (54). Thus, the specific location and function of SLRPs outside the cell lend themselves to accessibility for effective and simple therapeutic intervention.

In the case of primary bone tumors (osteosarcomas), decorin-expressing osteosarcoma cells were found to have a decreased ability to generate pulmonary metastases in a mouse model, thus demonstrating that decorin has the therapeutic potential to reduce lung metastasis in osteosarcoma (87). One important aspect in considering the role of SLRPs in tumor growth and establishment is the role of the tumor microenvironment. Indeed, many SLRPs, including biglycan, decorin, and fibromodulin, are expressed in the stroma and, at least in the case of fibromodulin, appear to control its structure and integrity (95).

Concluding Remarks

In conclusion, this minireview has highlighted the important roles that some SLRPs have in bone physiology and disease. These small proteoglycans are established to specifically regulate both bone osteogenesis and remodeling as well as to participate in the progression of commonly debilitating degenerative bone diseases. Further progress in discerning the specific signaling pathways in skeletal development and homeostasis is needed. Because of SLRP participation in multiple degenerative, inflammatory, and neoplastic diseases, we expect that some of the SLRP-secreted gene products could become reliable biomarkers for bone diseases and perhaps become targets of novel therapeutic interventions. Finally, we should point out that some of the pharmacological therapeutics currently used in clinical settings such as corticosteroid and anti-inflammatory drugs have profound effects on SLRP synthesis and accumulation. These, in turn, could affect not only the structural composition of bone but also the myriad of bone-specific growth factors that ultimately affect bone remodeling and diseases.

Acknowledgment—We thank Tom Neil for help with the illustrations.

REFERENCES

1. Iozzo, R. V., and Murdoch, A. D. (1996) Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity. *FASEB J.* **10**, 598–614
2. Iozzo, R. V. (1997) The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **32**, 141–174
3. Danielson, K. G., Fazio, A., Cohen, I., Cannizzaro, L. A., Eichstetter, I., and Iozzo, R. V. (1993) The human decorin gene: intron-exon organization, discovery of two alternatively spliced exons in the 5'-untranslated region, and mapping of the gene to chromosome 12q23. *Genomics* **15**, 46–60
4. Schaefer, L., and Iozzo, R. V. (2008) Biological functions of the small leu-

- cine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J. Biol. Chem.* **283**, 21305–23109
5. Iozzo, R. V., Goldoni, S., Berendsen, A., and Young, M. (2011) *Biology of Extracellular Matrix*, Springer, Berlin
 6. McEwan, P. A., Scott, P. G., Bishop, P. N., and Bella, J. (2006) Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. *J. Struct. Biol.* **155**, 294–305
 7. Henry, S. P., Takanosu, M., Boyd, T. C., Mayne, P. M., Eberspaecher, H., Zhou, W., de Crombrughe, B., Hook, M., and Mayne, R. (2001) Expression pattern and gene characterization of asporin, a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *J. Biol. Chem.* **276**, 12212–12221
 8. Kizawa, H., Kou, I., Iida, A., Sudo, A., Miyamoto, Y., Fukuda, A., Mabuchi, A., Kotani, A., Kawakami, A., Yamamoto, S., Uchida, A., Nakamura, K., Notoya, K., Nakamura, Y., and Ikegawa, S. (2005) An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat. Genet.* **37**, 138–144
 9. Sanders, E. J., Walter, M. A., Parker, E., Arámburo, C., and Harvey, S. (2003) Opticin binds retinal growth hormone in the embryonic vitreous. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 5404–5409
 10. Neame, P. J., Sommarin, Y., Boynton, R. E., and Heinegård, D. (1994) The structure of a 38-kDa leucine-rich protein (chondroadherin) isolated from bovine cartilage. *J. Biol. Chem.* **269**, 21547–21554
 11. Pusch, C. M., Zeitz, C., Brandau, O., Pesch, K., Achatz, H., Feil, S., Scharfe, C., Maurer, J., Jacobi, F. K., Pinckers, A., Andreasson, S., Hardcastle, A., Wissinger, B., Berger, W., and Meindl, A. (2000) The complete form of X-linked congenital stationary night blindness is caused by mutations in a gene encoding a leucine-rich repeat protein. *Nat. Genet.* **26**, 324–327
 12. Ohta, K., Kuriyama, S., Okafuji, T., Gejima, R., Ohnuma, S., and Tanaka, H. (2006) Tsukushi cooperates with VG1 to induce primitive streak and Hensen's node formation in the chick embryo. *Development* **133**, 3777–3786
 13. Shimizu-Hirota, R., Sasamura, H., Kuroda, M., Kobayashi, E., and Saruta, T. (2004) Functional characterization of podocan, a member of a new class in the small leucine-rich repeat protein family. *FEBS Lett.* **563**, 69–74
 14. Schaefer, L., and Schaefer, R. M. (2010) Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *Cell Tissue Res.* **339**, 37–46
 15. Gruber, H. E., Ingram, J., and Hanley, E. N., Jr. (2002) An improved staining method for intervertebral disc tissue. *Biotech. Histochem.* **77**, 81–83
 16. Egli, P. S., Herrmann, W., Hunziker, E. B., and Schenk, R. K. (1985) Matrix compartments in the growth plate of the proximal tibia of rats. *Anat. Rec.* **211**, 246–257
 17. Vanderploeg, E. J., Wilson, C. G., Imler, S. M., Ling, C. H., and Levenston, M. E. (2012) Regional variations in the distribution and colocalization of extracellular matrix proteins in the juvenile bovine meniscus. *J. Anat.* **221**, 174–186
 18. Reed, C. C., and Iozzo, R. V. (2002) The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj. J.* **19**, 249–255
 19. Zhang, G., Ezura, Y., Chervoneva, I., Robinson, P. S., Beason, D. P., Carine, E. T., Soslowsky, L. J., Iozzo, R. V., and Birk, D. E. (2006) Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development. *J. Cell. Biochem.* **98**, 1436–1449
 20. Chakravarti, S., Zhang, G., Chervoneva, I., Roberts, L., and Birk, D. E. (2006) Collagen fibril assembly during postnatal development and dysfunctional regulation in the lumican-deficient murine cornea. *Dev. Dyn.* **235**, 2493–2506
 21. Hildebrand, A., Romarís, M., Rasmussen, L. M., Heinegård, D., Twardzik, D. R., Border, W. A., and Ruoslahti, E. (1994) Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin, and fibromodulin with transforming growth factor- β . *Biochem. J.* **302**, 527–534
 22. Chen, X. D., Fisher, L. W., Robey, P. G., and Young, M. F. (2004) The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP4-induced osteoblast differentiation. *FASEB J.* **18**, 948–958
 23. Desnoyers, L., Arnott, D., and Pennica, D. (2001) WISP-1 binds to decorin and biglycan. *J. Biol. Chem.* **276**, 47599–47607
 24. Guidetti, G. F., Bartolini, B., Bernardi, B., Tira, M. E., Berndt, M. C., Balduini, C., and Torti, M. (2004) Binding of von Willebrand factor to the small proteoglycan decorin. *FEBS Lett.* **574**, 95–100
 25. Nili, N., Cheema, A. N., Giordano, F. J., Barolet, A. W., Babaei, S., Hickey, R., Eskandarian, M. R., Smeets, M., Butany, J., Pasterkamp, G., and Strauss, B. H. (2003) Decorin inhibition of PDGF-stimulated vascular smooth muscle cell function: potential mechanism for inhibition of intimal hyperplasia after balloon angioplasty. *Am. J. Pathol.* **163**, 869–878
 26. Tufvesson, E., and Westergren-Thorsson, G. (2002) Tumor necrosis factor- α interacts with biglycan and decorin. *FEBS Lett.* **530**, 124–128
 27. Schönherr, E., Sunderkötter, C., Iozzo, R. V., and Schaefer, L. (2005) Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system. *J. Biol. Chem.* **280**, 15767–15772
 28. De Luca, A., Santra, M., Baldi, A., Giordano, A., and Iozzo, R. V. (1996) Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* **271**, 18961–18965
 29. Csordás, G., Santra, M., Reed, C. C., Eichstetter, I., McQuillan, D. J., Gross, D., Nugent, M. A., Hajnóczky, G., and Iozzo, R. V. (2000) Sustained down-regulation of the epidermal growth factor receptor by decorin. A mechanism for controlling tumor growth *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **275**, 32879–32887
 30. Santra, M., Mann, D. M., Mercer, E. W., Skorski, T., Calabretta, B., and Iozzo, R. V. (1997) Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J. Clin. Invest.* **100**, 149–157
 31. Moscatello, D. K., Santra, M., Mann, D. M., McQuillan, D. J., Wong, A. J., and Iozzo, R. V. (1998) Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J. Clin. Invest.* **101**, 406–412
 32. Goldoni, S., Humphries, A., Nyström, A., Sattar, S., Owens, R. T., McQuillan, D. J., Ireton, K., and Iozzo, R. V. (2009) Decorin is a novel antagonistic ligand of the Met receptor. *J. Cell Biol.* **185**, 743–754
 33. Schaefer, L., Babelova, A., Kiss, E., Hausser, H. J., Baliova, M., Krzyzankova, M., Marsche, G., Young, M. F., Mihalik, D., Götte, M., Malle, E., Schaefer, R. M., and Gröne H. J. (2005) The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J. Clin. Invest.* **115**, 2223–2233
 34. Babelova, A., Moreth, K., Tsalasra-Greul, W., Zeng-Brouwers, J., Eickelberg, O., Young, M. F., Bruckner, P., Pfeilschifter, J., Schaefer, R. M., Gröne, H. J., and Schaefer, L. (2009) Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via Toll-like and P2X receptors. *J. Biol. Chem.* **284**, 24035–24048
 35. Huang, B., Zhao, J., Unkeless, J. C., Feng, Z. H., and Xiong, H. (2008) TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene* **27**, 218–224
 36. Parkinson, T. (2008) The future of Toll-like receptor therapeutics. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **10**, 21–31
 37. Merline, R., Moreth, K., Beckmann, J., Nastase, M. V., Zeng-Brouwers, J., Tralhão, J. G., Lemarchand, P., Pfeilschifter, J., Schaefer, R. M., Iozzo, R. V., and Schaefer, L. (2011) Decorin deficiency in diabetic mice: aggravation of nephropathy due to overexpression of profibrotic factors, enhanced apoptosis, and mononuclear cell infiltration. *Sci. Signal.* **4**, ra75
 38. Vij, N., Roberts, L., Joyce, S., and Chakravarti, S. (2004) Lumican suppresses cell proliferation and aids Fas-Fas ligand-mediated apoptosis: implications in the cornea. *Exp. Eye Res.* **78**, 957–971
 39. Yoshioka, N., Inoue, H., Nakanishi, K., Oka, K., Yutsudo, M., Yamashita, A., Hakura, A., and Nojima, H. (2000) Isolation of transformation suppressor genes by cDNA subtraction: lumican suppresses transformation induced by *v-src* and *v-K-ras*. *J. Virol.* **74**, 1008–1013
 40. Nikitovic, D., Berdiaki, A., Zafropoulos, A., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N. K., and Tzanakakis, G. N. (2008) Lumican expression is positively correlated with the differentiation and negatively with the growth of human osteosarcoma cells. *FEBS J.* **275**, 350–361
 41. Merline, R., Schaefer, R. M., and Schaefer, L. (2009) The matricellular functions of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs). *J. Cell Commun. Signal.* **3**, 323–335
 42. Young, A. A., Smith, M. M., Smith, S. M., Cake, M. A., Ghosh, P., Read, R. A., Melrose, J., Sonnabend, D. H., Roughley, P. J., and Little C. B. (2005) Regional assessment of articular cartilage gene expression and small pro-

- teoglycan metabolism in an animal model of osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **7**, R852–R861
43. Bianco, P., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D., and Robey, P. G. (1990) Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 1549–1563
 44. Waddington, R. J., Roberts, H. C., Sugars, R. V., and Schönherr, E. (2003) Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *Eur. Cell Mater.* **6**, 12–21
 45. Parisuthiman, D., Mochida, Y., Duarte, W. R., and Yamauchi, M. (2005) Biglycan modulates osteoblast differentiation and matrix mineralization. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 1878–1886
 46. Xu, T., Bianco, P., Fisher, L. W., Longenecker, G., Smith, E., Goldstein, S., Bonadio, J., Boskey, A., Heegaard, A. M., Sommer, B., Satomura, K., Dominguez, P., Zhao, C., Kulkarni, A. B., Robey, P. G., and Young, M. F. (1998) Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat. Genet.* **20**, 78–82
 47. Corsi, A., Xu, T., Chen, X. D., Boyde, A., Liang, J., Mankani, M., Sommer, B., Iozzo, R. V., Eichstetter, I., Robey, P. G., Bianco, P., and Young, M. F. (2002) Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 1180–1189
 48. Chen, X. D., Allen, M. R., Bloomfield, S., Xu, T., and Young, M. (2003) Biglycan-deficient mice have delayed osteogenesis after marrow ablation. *Calcif. Tissue Int.* **72**, 577–582
 49. Geerkens, C., Vetter, U., Just, W., Fedarko, N. S., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D., Robey, P. G., Wöhrle, D., and Vogel, W. (1995) The X-chromosomal human biglycan gene *BGN* is subject to X inactivation but is transcribed like an X-Y homologous gene. *Hum. Genet.* **96**, 44–52
 50. Bi, Y., Stuelten, C. H., Kilts, T., Wadhwa, S., Iozzo, R. V., Robey, P. G., Chen, X. D., and Young, M. F. (2005) Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 30481–30489
 51. Young, M. F., Bi, Y., Ameye, L., and Chen, X. D. (2002) Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases. *Glycoconj. J.* **19**, 257–262
 52. Berendsen, A. D., Fisher, L. W., Kilts, T. M., Owens, R. T., Robey, P. G., Gutkind, J. S., and Young, M. F. (2011) Modulation of canonical Wnt signaling by the extracellular matrix component biglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 17022–17027
 53. Kresse, H., and Schönherr, E. (2001) Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J. Cell. Physiol.* **189**, 266–274
 54. Abdel-Wahab, N., Wicks, S. J., Mason, R. M., and Chantray, A. (2002) Decorin suppresses transforming growth factor- β -induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human mesangial cells through a mechanism that involves Ca^{2+} -dependent phosphorylation of Smad2 at serine 240. *Biochem. J.* **362**, 643–649
 55. Schaefer, L., Raslik, I., Grone, H. J., Schönherr, E., Macakova, K., Ugorcakova, J., Budny, S., Schaefer, R. M., and Kresse, H. (2001) Small proteoglycans in human diabetic nephropathy: discrepancy between glomerular expression and protein accumulation of decorin, biglycan, lumican, and fibromodulin. *FASEB J.* **15**, 559–561
 56. Schönherr, E., Broszat, M., Brandan, E., Bruckner, P., and Kresse, H. (1998) Decorin core protein fragment Leu-155–Val-260 interacts with TGF- β but does not compete for decorin binding to type I collagen. *Arch. Biochem. Biophys.* **355**, 241–248
 57. Takeuchi, Y., Kodama, Y., and Matsumoto, T. (1994) Bone matrix decorin binds transforming growth factor- β and enhances its bioactivity. *J. Biol. Chem.* **269**, 32634–32638
 58. Riquelme, C., Larrain, J., Schönherr, E., Henriquez, J. P., Kresse, H., and Brandan, E. (2001) Antisense inhibition of decorin expression in myoblasts decreases cell responsiveness to transforming growth factor- β and accelerates skeletal muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* **276**, 3589–3596
 59. Wang, X., Harimoto, K., Xie, S., Cheng, H., Liu, J., and Wang, Z. (2010) Matrix protein biglycan induces osteoblast differentiation through extracellular signal-regulated kinase and Smad pathways. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 1891–1897
 60. Mochida, Y., Parisuthiman, D., and Yamauchi, M. (2006) Biglycan is a positive modulator of BMP2-induced osteoblast differentiation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **585**, 101–113
 61. Raouf, A., Ganss, B., McMahon, C., Vary, C., Roughley, P. J., and Seth, A. (2002) Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix. *Matrix Biol.* **21**, 361–367
 62. Igwe, J. C., Gao, Q., Kizivat, T., Kao, W. W., and Kalajzic, I. (2011) Keratan is expressed by osteoblasts and can modulate osteogenic differentiation. *Connect. Tissue Res.* **52**, 401–407
 63. Nuka, S., Zhou, W., Henry, S. P., Gendron, C. M., Schultz, J. B., Shinomura, T., Johnson, J., Wang, Y., Keene, D. R., Ramírez-Solis, R., Behringer, R. R., Young, M. F., and Höök, M. (2010) Phenotypic characterization of epiphygan-deficient and epiphygan/biglycan double-deficient mice. *Osteoarthritis Cartilage* **18**, 88–96
 64. Singh, K., Masuda K, Thonar, E. J., An, H. S., Cs-Szabo, G. (2009) Age-related changes in the extracellular matrix of nucleus pulposus and annulus fibrosus of human intervertebral disc. *Spine* **34**, 10–16
 65. Rucci, N., Rufo, A., Alamanou, M., Capulli, M., Del Fattore, A., Ahrman, E., Capece, D., Iansante, V., Zazzeroni, F., Alesse, E., Heinigård, D., and Teti, A. (2009) The glycosaminoglycan-binding domain of PRELP acts as a cell type-specific NF- κ B inhibitor that impairs osteoclastogenesis. *J. Cell Biol.* **187**, 669–683
 66. Ameye, L., and Young, M. F. (2002) Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel *in vivo* models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* **12**, 107R–116R
 67. Nielsen, K. L., Allen, M. R., Bloomfield, S. A., Andersen, T. L., Chen, X. D., Poulsen, H. S., Young, M. F., and Heegaard, A. M. (2003) Biglycan deficiency interferes with ovariectomy-induced bone loss. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 2152–2158
 68. Kilts, T., Ameye, L., Syed-Picard, F., Ono, M., Berendsen, A. D., Oldberg, A., Heegaard, A. M., Bi, Y., and Young, M. F. (2009) Potential roles for the small leucine-rich proteoglycans biglycan and fibromodulin in ectopic ossification of tendon induced by exercise and in modulating rotarod performance. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **19**, 536–546
 69. Ameye, L., Aria, D., Jepsen, K., Oldberg, A., Xu, T., and Young, M. F. (2002) Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis. *FASEB J.* **16**, 673–680
 70. Bi, Y., Nielsen, K. L., Kilts, T. M., Yoon, A., Karsdal, M. A., Wimer, H. F., Greenfield, E. M., Heegaard, A. M., and Young, M. F. (2006) Biglycan deficiency increases osteoclast differentiation and activity due to defective osteoblasts. *Bone* **38**, 778–786
 71. Miao, D., Bai, X., Panda, D., McKee, M., Karaplis, A., and Goltzman, D. (2001) Osteomalacia in hyp mice is associated with abnormal phex expression and with altered bone matrix protein expression and deposition. *Endocrinology* **142**, 926–939
 72. Benayahu, D., Shur, I., Marom, R., Meller, I., and Issakov, J. (2001) Cellular and molecular properties associated with osteosarcoma cells. *J. Cell. Biochem.* **84**, 108–114
 73. Chen, X. D., Bian, X., Teslovich, T. M., Stephan, D. A., and Young, M. F. (2005) Dissection of the sets of genes that control the behavior of biglycan-deficient pre-osteoblasts using oligonucleotide microarrays. *Bone* **37**, 192–203
 74. Datsis, G. A., Berdiaki, A., Nikitovic, D., Mytilineou, M., Katonis, P., Karmanos, N. K., and Tzanakakis G. N. (2011) Parathyroid hormone affects the fibroblast growth factor-proteoglycan signaling axis to regulate osteosarcoma cell migration. *FEBS J.* **278**, 3782–3792
 75. Mintz, M. B., Sowers, R., Brown, K. M., Hilmer, S. C., Mazza, B., Huvos, A. G., Meyers, P. A., Lafleur, B., McDonough, W. S., Henry, M. M., Ramsey, K. E., Antonescu, C. R., Chen, W., Healey, J. H., Daluski, A., Berens, M. E., Macdonald, T. J., Gorlick, R., and Stephan, D. A. (2005) An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma. *Cancer Res.* **65**, 1748–1754
 76. Strauss, L. G., Dimitrakopoulou-Strauss, A., Koczan, D., Bernd, L., Haberkorn, U., Ewerbeck, V., and Thiesen, H. (2004) ^{18}F -FDG kinetics and gene expression in giant cell tumors. *J. Nucl. Med.* **45**, 1528–1535
 77. Huvos, A. G. (1991) *Bone Tumors: Diagnosis, Treatment, and Prognosis*, W. B. Saunders, Philadelphia

78. Söderström, M., Böhling, T., Ekfors, T., Nelimarkka, L., Aro, H. T., and Vuorio, E. (2002) Molecular profiling of human chondrosarcomas for matrix production and cancer markers. *Int. J. Cancer* **100**, 144–151
79. Chansky, H., Robbins, J. R., Cha, S., Raskind, W. H., Conrad, E. U., and Sandell, L. J. (1998) Expression of cartilage extracellular matrix and potential regulatory genes in a new human chondrosarcoma cell line. *J. Orthop. Res.* **16**, 521–535
80. Kubista, B., Klingmueller, F., Bilban, M., Pfeiffer, M., Lass, R., Giurea, A., Funovics, P. T., Toma, C., Dominkus, M., Kotz, R., Thalhammer, T., Trieb, K., Zettl, T., and Singer, C. F. (2011) Microarray analysis identifies distinct gene expression profiles associated with histological subtype in human osteosarcoma. *Int. Orthop.* **35**, 401–411
81. Schulz, A., Loreth, B., Battmann, A., Knoblauch, B., Stahl, U., Pollex, U., and Bohle, R. M. (1998) Bone matrix production in osteosarcoma. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* **82**, 44–53
82. Bacci, G., Ferrari, S., Delepine, N., Bertoni, F., Picci, P., Mercuri, M., Bacchini, P., Brach del Prever, A., Tienghi, A., Comandone, A., and Campanacci, M. (1998) Predictive factors of histologic response to primary chemotherapy in osteosarcoma of the extremity: study of 272 patients preoperatively treated with high-dose methotrexate, doxorubicin, and cisplatin. *J. Clin. Oncol.* **16**, 658–663
83. Hauben, E. I., Weeden, S., Pringle, J., Van Marck, E. A., and Hogendoorn, P. C. (2002) Does the histological subtype of high-grade central osteosarcoma influence the response to treatment with chemotherapy and does it affect overall survival? A study on 570 patients of two consecutive trials of the European Osteosarcoma Intergroup. *Eur. J. Cancer* **38**, 1218–1225
84. Bacci, G., Longhi, A., Versari, M., Mercuri, M., Briccoli, A., and Picci, P. (2006) Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. *Cancer* **106**, 1154–1161
85. Hauben, E. I., Bielack, S., Grimer, R., Jundt, G., Reichardt, P., Sydes, M., Taminiau, A. H., and Hogendoorn, P. C. (2006) Clinico-histologic parameters of osteosarcoma patients with late relapse. *Eur. J. Cancer* **42**, 460–466
86. Ferrari, S., Bertoni, F., Mercuri, M., Picci, P., Giacomini, S., Longhi, A., and Bacci, G. (2001) Predictive factors of disease-free survival for non-metastatic osteosarcoma of the extremity: an analysis of 300 patients treated at the Rizzoli Institute. *Ann. Oncol.* **12**, 1145–1150
87. Shintani, K., Matsumine, A., Kusuzaki, K., Morikawa, J., Matsubara, T., Wakabayashi, T., Araki, K., Satonaka, H., Wakabayashi, H., Iino, T., and Uchida, A. (2008) Decorin suppresses lung metastases of murine osteosarcoma. *Oncol. Rep.* **19**, 1533–1539
88. Reed, C. C., Gaudie, J., and Iozzo, R. V. (2002) Suppression of tumorigenicity by adenovirus-mediated gene transfer of decorin. *Oncogene* **21**, 3688–3695
89. Zafiroopoulos, A., Nikitovic, D., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N. K., and Tzanakakis, G. N. (2008) Decorin-induced growth inhibition is overcome through protracted expression and activation of epidermal growth factor receptors in osteosarcoma cells. *Mol. Cancer Res.* **6**, 785–794
90. Nikitovic, D., Berdiaki, K., Chalkiadaki, G., Karamanos, N., Tzanakakis, G. (2008) The role of SLRP proteoglycans in osteosarcoma pathogenesis. *Connect. Tissue Res.* **49**, 235–238
91. Nikitovic, D., Chalkiadaki, G., Berdiaki, A., Aggelidakis, J., Katonis, P., Karamanos, N. K., and Tzanakakis, G. N. (2011) Lumican regulates osteosarcoma cell adhesion by modulating TGF- β 2 activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 928–935
92. Gori, F., Schipani, E., and Demay, M. B. (2001) Fibromodulin is expressed by both chondrocytes and osteoblasts during fetal bone development. *J. Cell. Biochem.* **82**, 46–57
93. Papatheodorou, L. K., Malizos, K. N., Poultsides, L. A., Hantes, M. E., Grafanaki, K., Giannouli, S., Ioannou, M. G., Koukoulis, G. K., Protopappas, V. C., Fotiadis, D. I., and Stathopoulos, C. (2009) Effect of transosseous application of low-intensity ultrasound at the tendon graft-bone interface healing: gene expression and histological analysis in rabbits. *Ultrasound Med. Biol.* **35**, 576–584
94. Amenta, A. R., Yilmaz, A., Bogdanovich, S., McKechnie, B. A., Abedi, M., Khurana, T. S., and Fallon, J. R. (2011) Biglycan recruits utrophin to the sarcolemma and counters dystrophic pathology in *mdx* mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 762–767
95. Oldberg, A., Kalamajski, S., Salnikov, A. V., Stuhr, L., Mörgelin, M., Reed, R. K., Heldin, N. E., and Rubin, K. (2007) Collagen-binding proteoglycan fibromodulin can determine stroma matrix structure and fluid balance in experimental carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 13966–13971

The Biology of Small Leucine-rich Proteoglycans in Bone Pathophysiology
Dragana Nikitovic, John Aggelidakis, Marian F. Young, Renato V. Iozzo, Nikos K.
Karamanos and George N. Tzanakakis

J. Biol. Chem. 2012, 287:33926-33933.

doi: 10.1074/jbc.R112.379602 originally published online August 9, 2012

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.R112.379602](https://doi.org/10.1074/jbc.R112.379602)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Read an Author Profile for this article at

http://www.jbc.org/content/suppl/2012/10/04/R112.379602.DCAuthor_profile

This article cites 93 references, 25 of which can be accessed free at

<http://www.jbc.org/content/287/41/33926.full.html#ref-list-1>



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocel

Lumican regulates osteosarcoma cell adhesion by modulating TGF β 2 activity

Dragana Nikitovic^a, Georgia Chalkiadaki^a, Aikaterini Berdiaki^a, John Aggelidakis^b,
Pavlos Katonis^b, Nikos K. Karamanos^c, George N. Tzanakakis^{a,*}

^a Department of Histology-Embryology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71003, Greece

^b Department of Orthopedics, University Hospital of Heraklion, Heraklion 71003, Greece

^c Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Patras, Patras 26110, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 February 2011

Received in revised form 8 March 2011

Accepted 14 March 2011

Available online 21 March 2011

Keywords:

Lumican

Osteosarcoma cell adhesion

TGF- β 2

pSmad

β 1 integrin

FAK

ABSTRACT

Human osteosarcoma cell lines were recently shown to express and secrete the small leucine rich proteoglycan (SLRP) lumican, with the ability to regulate the growth and motility of these cells. In this study, lumican-deficient Saos 2 cells were demonstrated to have increased adhesive capability onto fibronectin (FN) ($p \leq 0.01$). Upon neutralization of endogenous transforming growth factor β 2 (TGF- β 2) activity, no difference in the ability of lumican siRNA-transfected and scramble siRNA-transfected Saos 2 cells to adhere onto FN was detected ($p = NS$). Exogenous TGF- β 2 was shown to stimulate Saos 2 cell adhesion to FN ($p \leq 0.01$). These results therefore, suggest that the inverse correlation existing between lumican expression and Saos 2 cell adhesion is dependent on active TGF- β 2 signaling. Furthermore, the significant increase in Smad 2 activation present in lumican-deficient cells ($p \leq 0.01$) was annulled in the presence of the anti-TGF- β 2 peptide, demonstrating that lumican is an upstream regulator of the TGF- β 2/Smad 2 signaling cascade. Crucial to FN-dependent adhesion, β 1 integrin expression and pFAK activation were likewise identified as downstream TGF- β 2 effectors regulated by lumican expression. In conclusion, this study demonstrates a novel out-in signaling circuit in human osteosarcoma cells: secreted to extracellular matrix lumican is an endogenous inhibitor of TGF- β 2 activity, resulting in downstream effector modulation including pSmad 2, integrin β 1 and pFAK to regulate osteosarcoma adhesion.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lumican belongs to the small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family, whose members constitute an important fraction of non-collagenous extracellular matrix (ECM) proteins (Iozzo, 1997). Originally, lumican was reported to colocalize with fibrillar collagens in the corneal stroma and to regulate the assembly and diameter of collagen fibers (Blochberger et al., 1992). It has now been established that lumican is expressed in a variety of human tissues, including skin (Chakravarti et al., 1998), artery (Funderburgh et al., 1991), lung (Dolhnikoff et al., 1998), intervertebral discs (Sztrolovics et al., 1999), kidney (Schaefer et al., 2000), bone (Raouf et al., 2002), aorta (Qin et al., 1999), and articular cartilage (Grover et al., 1995).

Under pathological conditions, the lumican protein is highly expressed during corneal wound healing and in ischemic and reperused heart (Baba et al., 2001; Saika et al., 2000). The extent of lumican presence in the tumor microenvironment is important, as it has been demonstrated that reduced expression of lumican associates with a poor outcome in node-negative invasive breast cancer (Leygue et al., 1998), whereas a high expression level of lumican associates with a high grade of tumor differentiation, low oestrogen receptor levels in cancer tissue and a younger age of patients (Troup et al., 2003). Furthermore, it is suggested that the expression pattern and the glycosylated type of lumican in cells and stromal tissues correlate with the aggressiveness of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma (Matsuda et al., 2008). Recent reports which correlate lumican expression to modulations of key cellular functions offer new insights on the mechanisms of lumican action. Inhibition of melanoma cell migration on the lumican substrate was found to depend on a direct binding between the core protein of lumican and the α 2 β 1 integrin (Zeltz et al., 2010), cytoskeleton remodeling and decreased pFAK phosphorylation (Brezillon et al., 2009). On the other hand a 50 kDa lumican protein was found to inhibit HEK cell attachment and growth, through the modulation of integrin activation pathways and not affect these cells' migratory abilities (Ishiwata et al., 2010). We have recently shown that human

Abbreviations: SLRP, small leucine rich proteoglycans; FN, fibronectin; FAK, focal adhesion kinase; TGF- β 2t, transforming growth factor β 2.

* Corresponding author at: Department of Histology-Embryology, Medical School, University of Crete, 711 10 Heraklion, Greece. Tel.: +30 2810 394719; fax: +30 2810 394786.

E-mail address: tzanakak@med.uoc.gr (G.N. Tzanakakis).

osteosarcoma cell lines express and secrete lumican partly substituted with keratan sulfate glycosaminoglycans. Lumican appears to have a role in osteosarcoma pathogenesis, as the growth of Saos 2 osteosarcoma cells was inhibited by lumican, whereas their migration and chemotactic response to fibronectin were found to be promoted (Nikitovic et al., 2008). These key tumor cell functions appear to be modulated through, crucial for bone tumor cells, Smad signaling pathway (Nikitovic et al., 2008). In this study, we examine the effect of lumican on osteosarcoma cell adhesion and investigate the hypothesis that lumican through the modulation of the pericellular availability of the transforming growth factor- β (TGF- β) isoform/s regulates its downstream intracellular signaling and thus affects cell functions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The goat anti-lumican antibody (L-21), Smad 2 (S-20) goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping near the N-terminus of Smad 2 of human origin, and donkey anti-goat IgG (horseradish peroxidase conjugated) and goat anti-mouse IgG (horseradish peroxidase conjugated) polyclonal antibodies were obtained from

Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). The phospho-Smad 2 polyclonal antibody, raised against residues containing phosphorylated Ser465/467 of human Smad 2, was purchased from Cell Signaling (Danvers, ME, USA), Anti-FAK was purchased from BD Transduction Laboratories whereas anti-p-FAK (Y397) was purchased from Chemicon-Millipore, Temecula, MO. Fetal bovine serum, DMEM, penicillin, streptomycin and l-glutamine were all obtained from Biochrom KG (Berlin, Germany). TGF-2 and anti-TGF β 1 and 2 were obtained from R&D Diagnostics (Minneapolis, MN). All other chemicals used were of the best available grade.

2.2. Cell cultures

Saos 2 cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% (v/v) CO₂ in DMEM, supplemented with 10% fetal bovine serum, 4 mM l-glutamine, (2 g/L) sodium bicarbonate, (100 IU/mL) penicillin and (100 g/mL) streptomycin. Cells were grown in 75 cm² tissue culture flasks, and the culture medium was changed every second day until confluence was reached. Prior to stimulation with TGF- β 2 (10 ng/mL) and anti-TGF- β 1 and -2 (0.5 μ g/ml), the cells were serum starved for 24 h.

The cells were cultured for an additional 24 or 48 h before harvesting for RNA and protein extraction, respectively.

2.3. RNA isolation and real-time PCR

Total RNA was isolated with the TRIzol method (GibcoBRL) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was measured fluorometrically using the CyQuant-Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes). cDNA synthesis was performed using the ThermoScript[®] RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For semi-quantification of the genes of interest we utilized the DyNAmo SYBR Green 2-step qRT-PCR Kit (Finnzymes) in a total volume of 20 μ L, performing real-time PCR reactions in an Mx300P cyclor. Utilized primers are presented in Table 1. Standard curves were run in each optimized assay which produced a linear plot of threshold cycle (Ct) against log (dilution). The amount of each target was quantified based on the concentration of the standard curve and was presented as arbitrary units. The quantity of each target was normalised against the quantity of GAPDH.

Table 1
Sequence of utilized primers.

Gene	Sequence
Lumican.F	5' CTTCAATCAGATAGCCAGACTGC 3'
Lumican.R	5' AGCCAGTTCGTTGTGAGATAAAC 3'
TGF β 1.F	5' AAGGACCTCGGCTGGAAGTG 3'
TGF β 1.R	5' CCCGGTTATGCTGGTTGTA 3'
TGF β 2.F	5' CTGTCCCTGCTGCACTTTTGT 3'
TGF β 2.R	5' TCTCCGCCGGTTGGTCTGT 3'
TGF β 3.F	5' GGGCTTTGGACACCAATTAC 3'
TGF β 3.R	5' GCAGATGCTTCAGGGTTCAG 3'
TGFR1.F	5' TCGTCTGCATCTCACTCA 3'
TGFR1.R	5' GATAAATCTCTGCTCAGC 3'
TGFR2.F	5' GCGGGAGACCCCTGTGTGC 3'
TGFR2.R	5' CCCGAGAGCCTGTCCAGATCA 3'
TGFR3.F	5' AATCTGGCCATGATGAGC 3'
TGFR3.R	5' ACTGCTGTTTTCCGAGGC 3'
GAPDH.F	5' GGAAGGTGAAGTCCGAGTCA 3'
GAPDH.R	5' GTCATTGATGGCAACAATCCACT 3'

2.4. Western blot analysis

Total protein secreted into the serum-free culture medium was concentrated using Vivaspin 20 mL centrifugal concentrator tubes to a volume of 500 μ L. Equal amounts of protein, either cell extracts or secreted, were subjected to SDS-PAGE using 8% polyacrylamide gels under reducing conditions. The separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes, which were then incubated for 60 min at room temperature with the primary anti-lumican (1:200), anti-Smad 2 (1:200), anti-phospho-Smad 2 (1:500), anti-FAK (1:1000), anti-p-FAK (Y397) (1:1000) antibodies. The membranes were sequentially washed and incubated with the secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-goat IgG (1:4000) or anti-mouse (1:2000) antibody for a further 60 min at room temperature. After washing, the binding of the antibodies was visualized by enhanced chemiluminescence (West Pico Chemiluminescent, Pierce, Holmdel, NJ).

2.5. Transfection experiments

For transfection experiments, the cells were detached from the culture plate by treatment with 0.25% trypsin/EDTA, and washed in DMEM containing 10% fetal bovine serum to inactivate trypsin activity. This was followed by a wash and resuspension in serum and antibiotic-free DMEM. siRNA specific for lumican was purchased from Invitrogen. To provide for optimal transfection, siRNA (Invitrogen) and Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen) were diluted in Opti-MEM[®] 1 Reduced Serum Medium (Invitrogen). After 5 min of incubation, diluted Lipofectamine[®] 2000 (1 μ L per 50 μ L of medium) was mixed with diluted siRNA (100 pmol per 50 μ L of medium) in 35 mm dishes for 20 min at room temperature to allow siRNA-liposome complexes to form. Cells (8 \times 10⁵ per well), resuspended in serum and antibiotic-free DMEM, were added to the wells and shaken gently. Medium containing siRNA specific for lumican or control scramble siRNA was removed from the cultures after 6 h of incubation and replaced with fresh medium containing antibiotics, and incubation was continued for 48 h. At this time point, the cells were harvested and the RNA was extracted. The optimal transfection protocol conditions for lumican were chosen after pilot experiments in which three different siRNA sequences and amounts were tested (Nikitovic et al., 2008). siRNA specific for the FAK gene was designed according to Hong et al. (2006). All transfection experiments were repeated at least three times and performed in triplicate.

2.6. Cell attachment assay

96 well-plates used were coated with FN (5 μ g/cm²) for 1 h at 37°C. The non specific binding sites were blocked with 1% bovine

serum albumin (BSA) for 30 min at room temperature. The cells detached with trypsin–EDTA. 10^5 cells were seeded onto the coated 96 well-plates. The time points were chosen after preliminary experiments as described in the results section. Saos 2 cells were serum starved for 24 h and then treated with TGF- β 2 (10 ng/ml), antibodies specific for TGF- β 1 and -2 (0.5 μ g/ml) for 48 h. Some experiments were performed by using transfected cells with siRNA specific for lumican (siLum), FAK (siFAK) or control scramble (siScr). Non adherent cells were removed by performing two washes using serum free medium. The number of adherent cells was calculated using the CyQuant fluorometric assay (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Fluorescence was measured in a Fluorometer (Biotek) using the 480/520 nm excitation and emission filters. For converting sample fluorescence values into cell numbers, a reference standard curve was created, using serial dilutions of known cell number. All adhesion experiments were repeated at least five times and performed in triplicates.

3. Results

3.1. Suppression of lumican expression enhances osteosarcoma cell adhesion

In this study, Saos 2 human osteosarcoma cell line was utilized in order to examine the possible effect of lumican on osteosarcoma cell adhesive properties. Saos 2 cells are well-differentiated osteoblast-like cells, (Benayahu et al., 1998). The ability of osteosarcoma cells to adhere to FN was estimated using an *in vitro* adhesion assay, where the optimal adhesion time point (middle of exponential adhesion phase) was found to be 30 min. In order to investigate the possible participation of lumican on human osteosarcoma cell adhesion, Saos 2 cells were transfected with lumican siRNA as previously reported (Nikitovic et al., 2008). As verified in Fig. 1A the inhibition of lumican mRNA expression was a significant (81%) at the 48 h time point (Fig. 1A). The down-regulation of lumican transcripts was followed by a significant decrease in lumican protein secretion (Fig. 1B) as previously demonstrated (Nikitovic et al., 2008). The inhibition of lumican synthesis following treatment of Saos 2 cells with lumican siRNA strongly increased their adhesion capability onto FN as compared to cells treated with scramble siRNA ($p \leq 0.01$) (Fig. 1C). In contrast, no difference in adhesion ability was observed between scramble treated and wild-type osteosarcoma cells (Fig. 1C). These data show that the ability of osteosarcoma cells to specifically adhere onto the FN substrate is lumican-dependent.

3.2. TGF- β 2-mediated cell adhesion is dependent on lumican expression

In a manner similar to other SLRPs (Naito, 2005), lumican has been suggested to bind TGF- β 2 *in vitro* (Kao, 2006) and in this way it may modulate TGF- β 2 bioactivity. The initial analysis of the TGF- β isoform (TGF- β -1, 2 and 3) and their respective receptor (TGFRI, TGFRII and betaglycan) expression, demonstrated that Saos 2 cells express all TGF- β isoforms and their respective receptors in various amounts (Table 2) and in accordance with previous reports (Franchi et al., 1998); TGF- β 2 being the dominant isoform expressed. To study the effect of endogenous TGF- β isoforms on Saos 2 cell adhesion, neutralizing anti-TGF- β 1 and - β 2 antibodies were utilized (0.5 μ g/ml). As shown in Fig. 2, treatment with the anti-TGF- β 2 antibody inhibited Saos 2 cell adhesion ($p \leq 0.05$) suggesting that endogenous TGF- β 2 stimulates Saos 2 cell ability to adhere. Likewise, pretreatment with exogenous TGF- β 2 (10 ng/ml) stimulated Saos 2 cell adhesion to FN ($p \leq 0.01$) (Fig. 2). In contrast TGF- β 1 antibody treatment did not affect Saos 2 adhesion capability

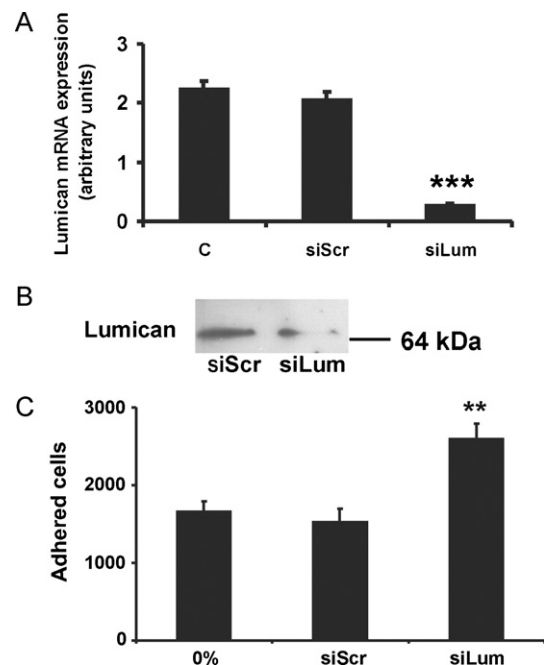


Fig. 1. Transfection with siRNA. Saos 2 cells were transfected with lumican short interfering RNA utilizing scramble interfering RNA (siScr) as control. (A) Inhibition of lumican mRNA expression was verified by real time PCR as compared to siScr control and expressed as arbitrary units at 48 h point. The results represent the average of three separate experiments in triplicate, and are expressed as mean \pm S.E.M. of arbitrary units. Statistical significance: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.01$, compared to control. (B) Western analysis for lumican was performed on total protein secreted to ECM by siScr and siLum Saos 2 cells. Representative blot is presented. (C) Effect of lumican-siRNA on cell adhesion. 48 h after transfection, Saos 2 lumican (siLum) and scramble (siScr) transfected cells were harvested and seeded (10^5 cells) for 30 min on 96 well-plates coated with FN (5 μ g/cm 2). The number of attached cells was determined using fluorometric CyQUANT Assay kit. The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm S.E.M. plotted; Statistical significance: ** $p \leq 0.01$, among the lumican and scramble siRNA transfected cells.

($p = NS$) (Fig. 2). Furthermore, treatment of cells (cultured in 0% FCS) with TGF- β 2 during the 30 min reseeding period did not affect their adhesive abilities (Fig. 2). Control experiments demonstrated that Saos 2 cell adhesion to plastic was not affected by TGF- β 2 (data not shown) indicating thus, that TGF- β 2 specifically regulates the FN-dependent adhesion of osteosarcoma cells.

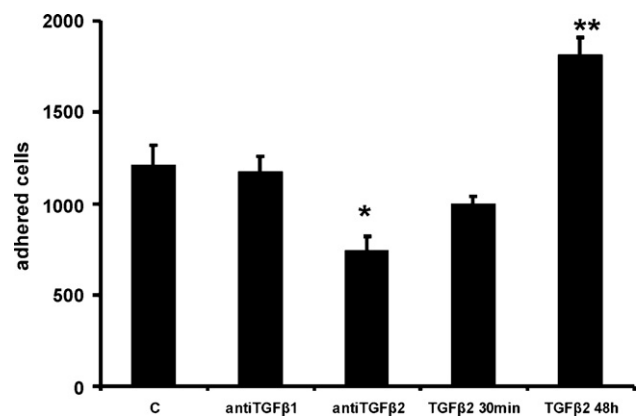


Fig. 2. The effect of TGF- β 2 signaling on osteosarcoma cell adhesion. Saos 2 cells were treated with TGF- β 2 (10 ng/ml), anti-TGF- β 1 (0.5 μ g/ml) and anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml) during 48 h before harvesting and reseeding (10^4 cells) during 30 min on 96 well-plates coated with FN (5 μ g/cm 2). The number of attached cells was determined using fluorometric CyQUANT Assay Kit (Molecular Probes). Cells grown in 0% FBS (0%) were utilized as control. The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm S.E.M. plotted; Statistical significance: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$, among control and respective treatments.

Table 2
Expression of TGF β isoforms and receptors.

Gene	Arbitrary units
TGF β 1	2.4
TGF β 2	3.9
TGF β 3	0.5
TGFR1	3.7
TGFR2	2.4
TGFR3	0.3

Therefore, we hypothesised that secreted lumican may affect the activity of endogenous TGF- β 2 to regulate Saos 2 cell FN-dependent attachment. The adhesion capability of lumican-deficient Saos 2 cells treated with specific TGF- β 2 antibody was not increased as compared to anti-TGF- β 2 treated siScr cells (Fig. 3). These results suggest that secreted lumican regulates TGF- β 2 activity to modulate the adhesion capabilities of Saos 2 osteosarcoma cells on the FN substrate.

3.3. Effect of endogenous TGF- β 2 on osteosarcoma cell Smad activation

The major TGF- β receptor-activated Smad in Saos 2 cells has previously been determined to be Smad 2 (Yu et al., 2004). Therefore, we examined the role of endogenous TGF- β 2 on Smad 2 phosphorylation levels by treating Saos 2 cells with specific anti-TGF- β 2 peptide during 48 h. At this point Smad 2 expression and phosphorylation levels were characterized with the utilization of specific anti-Smad 2 and anti-phospho-Smad 2 peptides. Protein amounts were normalized against actin. Western blot analysis showed that the Smad 2 protein expression (specific 65 kDa band) was not affected by anti-TGF- β 2 peptide (Fig. 4A). On the other hand, as shown in Fig. 4A, basal Smad 2 phosphorylation levels (specific 60 kDa band) were downregulated ($p \leq 0.05$) when endogenous TGF- β 2 was neutralized with the specific anti-TGF- β 2 peptide demonstrating the existence of a TGF- β autocrine loop in Saos 2 human osteosarcoma cells. In control experiments, exogenously added TGF- β 2 enhanced Smad 2 activation ($p \leq 0.01$) whereas, when the cells were treated with a mix of TGF- β 2/anti-TGF- β 2 the TGF- β 2-dependent Smad 2 activation was partially neutralized by the action of anti-TGF- β 2 (Fig. 4A and B). Densitometric analysis of the respective bands is presented in Fig. 4B. Protein amounts were normalized against actin.

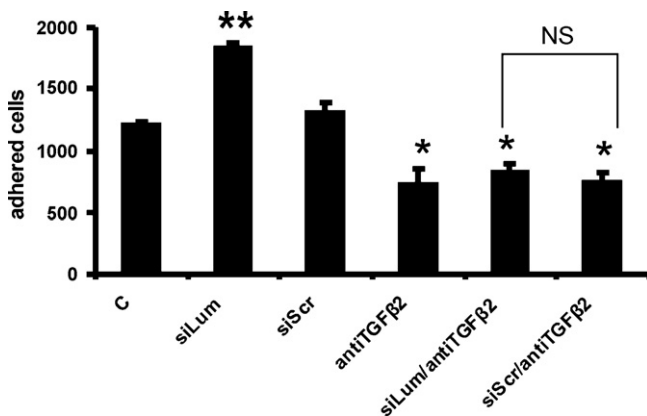


Fig. 3. Effect of lumican on endogenous TGF- β 2 activity. 48 h after transfection, Saos 2 lumican (siLum), scramble (siScr) transfected cells, Saos 2 lumican (siLum) treated with anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml), scramble (siScr) transfected cells treated with anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml) and control (0%) cells were harvested and reseeded (10^4 cells) for 30 min on 96 well-plates coated with FN (5 μ g/cm 2). The number of attached cells was determined using fluorometric CyQUANT Assay kit. The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm S.E.M. plotted; Statistical significance: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ among control and respective treatments.

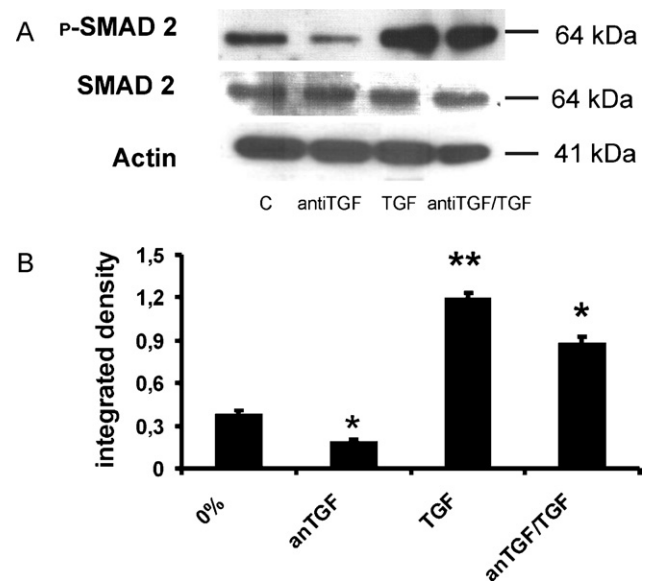


Fig. 4. Effect of endogenous TGF- β 2 on osteosarcoma cell Smad activation (A) Saos 2 cells treated with TGF- β 2 (10 ng/ml), anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml) or their combination for 48 h were harvested and equal amounts of cell extract protein blotted against phosphorylated Smad 2 (pSmad) and total Smad 2 utilizing specific antibodies. The results represent the average of three separate experiments. Representative blots are presented. (B) Specific pSmad and total Smad 2 protein bands were densitometrically analysed and adjusted against actin. The results represent the average of three separate experiments. Statistical significance: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ among control and respective treatments.

3.4. Lumican affects endogenous TGF- β -dependent Smad activation

We have previously shown that lumican participates in the regulation of Smad signaling in Saos 2 cells by demonstrating that Saos 2 lumican-deficient cells had higher levels of Smad phosphorylation as compared to control siScr cells. Therefore, in this study we examined the possible involvement of lumican on endogenous TGF- β -dependent Smad activation. The phosphorylation levels of phosphorylated Smad 2 (pSmad) were examined in lumican-deficient and siScr Saos 2 cells utilizing specific pSmad and Smad antibodies. Importantly, there were no differences in pSmad activation between siScr and siLum cells treated with anti-TGF- β 2 ($p = NS$), suggesting that lumican regulates endogenous TGF- β 2-dependent Smad 2 activation in Saos 2 cells (Fig. 5A and B). Densitometric analysis of the respective bands is presented in Fig. 5B.

3.5. Lumican upregulates β 1 integrin expression modulating of TGF- β signaling

Integrins, and particularly β 1, have been demonstrated to be major osteoblast membrane receptors participating in adhesion onto the FN substrate (Nakayama et al., 2003). Moreover, TGF- β 2 markedly enhanced the expression of integrin β 1 to stimulate HELC cell adhesion (Yao et al., 2007), whereas TGF- β 1 was found to upregulate β 1 integrin expression in MG-63 osteosarcoma cells (Lai et al., 2000). We therefore examined whether TGF- β 2 signaling affects β 1 integrin expression. Saos 2 cells treated with TGF- β 2 were found to have increased β 1 integrin mRNA expression (Fig. 6) ($p \leq 0.01$). In contrast, treatment with the anti-TGF- β 2 IG decreased β 1 integrin expression in Saos 2 cells ($p \leq 0.05$). To investigate the putative role of lumican TGF- β 2-dependent regulation of β 1 integrin expression, lumican-deficient cells were analysed for β 1 integrin expression. siLum cells were found to have (41%) higher

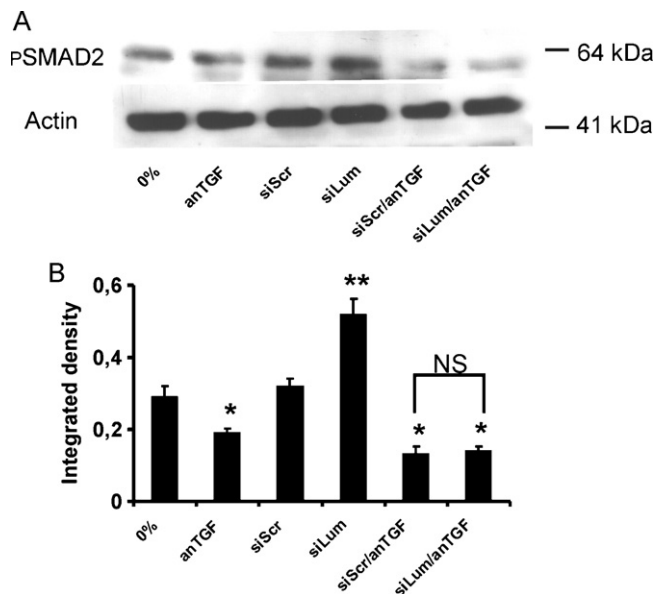


Fig. 5. Effect of lumican on endogenous TGF- β 2-dependent Smad activation (A) 48 h after transfection, Saos 2 lumican (siLum), scramble (siScr) transfected cells, Saos 2 lumican (siLum) treated with anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml), scramble (siScr) transfected cells treated with anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml) and control (0%) cells were harvested and equal amounts of cell extract protein blotted against phosphorylated Smad 2 (pSmad 2) and total Smad utilizing specific antibodies. The results represent the average of three separate experiments. Representative blots are presented. (B) Specific pSmad 2 and Smad 2 protein bands were densitometrically analysed and adjusted against actin. The results represent the average of three separate experiments. Statistical significance: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ among control and respective treatments.

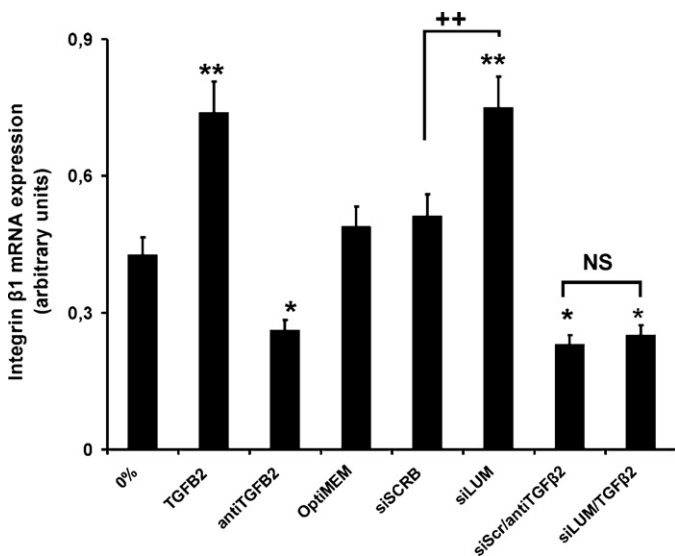


Fig. 6. Effect of TGF- β 2 signaling on β 1 integrin expression-role of lumican. 48 h after transfection, Saos 2 lumican (siLum), scramble (siScr) transfected cells, Saos 2 lumican (siLum) treated with anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml), scramble (siScr) transfected cells treated with anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml), non-transfected cells treated with anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml), non-transfected cells treated with TGF- β 2 (10 ng/ml), and control (0%) cells were harvested and RNA isolated. β 1 integrin mRNA expression was determined by real-time PCR using primers specific for the β 1 integrin gene and normalized against actin as the "housekeeping" gene. The results represent the average of three separate experiments in triplicate, and are expressed as arbitrary units. Statistical significance: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ among control and respective treatments; ** $p \leq 0.01$ among siScr and siLum treatments.

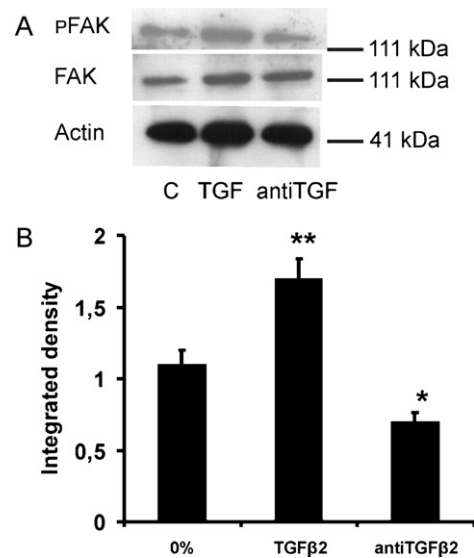


Fig. 7. Effect TGF- β 2 signaling on Saos 2 cell total FAK protein expression and FAK (Y397) phosphorylation. (A) Saos 2 cells treated with anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml) and TGF- β 2 (10 ng/ml), for 48 h were harvested and equal amounts of cell extract protein blotted against phosphorylated FAK (Y397) (pFAK) and total FAK (FAK) utilizing specific antibodies. The results represent the average of three separate experiments. Representative blots are presented. (B) Specific pFAK and FAK protein bands were densitometrically analysed and adjusted against actin. The results represent the average of three separate experiments. Statistical significance: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ among control and respective treatments.

expression of β 1 integrin as compared to control siScr cells (Fig. 6) ($p \leq 0.01$). When endogenous TGF- β 2 signaling was neutralized with the utilization of specific TGF- β 2 antibody no effect of lumican on β 1 integrin expression was observed (Fig. 6) ($p = \text{NS}$). These results demonstrate that lumican upregulates β 1 integrin expression in Saos 2 osteosarcoma cell line through the modulation of TGF- β signaling.

3.6. The effect of TGF- β 2 signaling on FAK (397) phosphorylation

Previously, TGF- β 2 was found to enhance cell adhesion onto FN, by upregulating focal adhesion kinase (FAK) (397) phosphorylation (Yao et al., 2007). Integrin binding to extracellular matrix components or integrin crosslinking increases tyrosine phosphorylation of FAK (pFAK). Therefore, in this study we examined the possible effect of TGF- β 2 on pFAK activation. Saos 2 cells were treated with TGF- β 2 (10 ng/ml) or anti-TGF- β 2 (0.5 μ g/ml) during 24 and 48 h, whereupon their cell lysates were probed against FAK and pFAK utilizing specific antibodies (Fig. 7A and B). Our results show that TGF- β 2 treatment strongly enhanced FAK (397) activation ($p \leq 0.01$) whereas in contrast anti-TGF- β 2 inhibited phosphorylation at the Tyr397 site ($p \leq 0.05$) (Fig. 7). These results thus demonstrate that pFAK activation in Saos 2 osteosarcoma cells is TGF- β 2 dependent.

3.7. The effect of lumican on FAK (397) phosphorylation

We examined the effect of lumican on pFAK activation. Lumican-deficient (siLum) and control (siScr) Saos 2 cells were generated and their cell lysates were probed against FAK and pFAK utilizing specific antibodies (Fig. 8A). Our results show that cells deficient in lumican had increased FAK (397) activation ($p \leq 0.05$) (Fig. 8A and B). These results thus demonstrate that pFAK activation in Saos 2 osteosarcoma cells is inversely correlated to lumican expression.

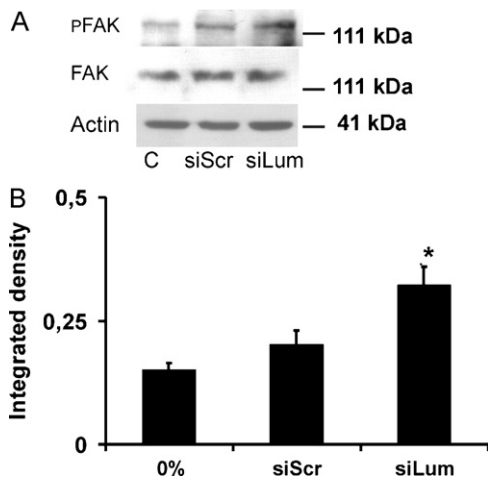


Fig. 8. Effect of lumican on Saos 2 cell total FAK protein expression and FAK (Y397) phosphorylation. (A) siScr and siLum generated cells were harvested and equal amounts of cell extract protein blotted against phosphorylated FAK (Y397) (pFAK) and total FAK (FAK) utilizing specific antibodies. The results represent the average of three separate experiments. Representative blots are presented. (B) Specific pFAK and FAK protein bands were densitometrically analysed and adjusted against actin. The results represent the average of three separate experiments. Statistical significance: * $p \leq 0.05$; among siScr and siLum generated cells.

3.8. Osteosarcoma cell adhesion depends on the expression and activation of FAK

To examine the putative participation of FAK signaling on osteosarcoma cell adhesion, we used Saos 2 cells for transfection with FAK siRNA (siFAK) designed according to Hong et al. (2006) and demonstrated to be specific for the FAK gene. As shown in Fig. 9A–C, treatment of Saos 2 cells with siFAK for 48 h resulted in the inhibition of FAK at both the mRNA, protein and phosphorylation levels ($p \leq 0.01$). Saos 2 cells treated with siFAK for 48 h were harvested and their adhesion ability evaluated. The inhibition of FAK expression decreases significantly (36%) their adhesion capability as compared to cells treated with scramble siRNA ($p \leq 0.01$) (Fig. 9D). Notably, osteosarcoma cell adhesion is inversely correlated to FAK expression and activation levels (Fig. 9D).

4. Discussion

In order to affect cell adhesion lumican may interact with specific adhesive receptors on the cell membrane or alternatively it may modulate the activity of adhesion-stimulating extracellular molecules. Osteosarcoma cells were demonstrated to secrete lumican proteoglycan (60–70 kDa) with the ability to regulate the growth and motility of these cells (Nikitovic et al., 2008). In this study, we show that lumican inhibits osteosarcoma cell adhesion through the modulation of TGF- β 2 downstream signaling pathways. The obtained data are summarized in a schematic representation in the graphical abstract.

TGF- β isoforms have previously been demonstrated to stimulate the adhesive properties of osteoblastic cells (Lai et al., 2000) possibly correlated to their key role in osteosarcoma tumorigenesis (Franchi et al., 1998). Saos 2 cells are known to secrete the three (TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3) isoforms, thus enabling autocrine modes of action (Gassling et al., 2009). We determined that TGF- β 2 is the isoform most abundantly expressed by these cells. The neutralization of endogenous TGF- β 2 inhibited significantly Saos 2 osteosarcoma cell adhesion whereas exogenous TGF- β 2 strongly enhanced these cells' attachment. Lumican-deficient Saos 2 cells have increased adhesive capability however; lumican siRNA-transfected Saos 2 cells did not show enhanced ability to adhere to

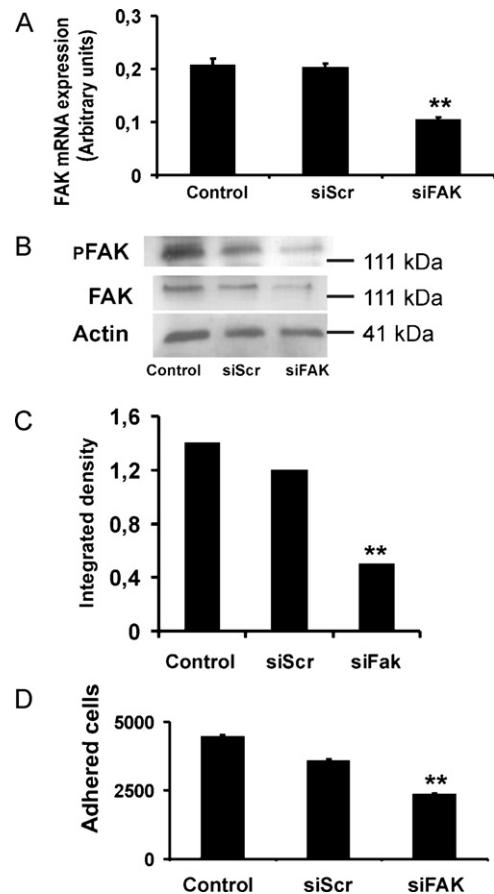


Fig. 9. The role of FAK on osteosarcoma cell adhesion. (A) Transfection with siRNA. Saos 2 cells were transfected with FAK short interfering RNA utilizing scramble interfering RNA (siScr) as control. Inhibition of FAK mRNA expression was verified by real time PCR as compared to siScr control and expressed as arbitrary units at 48 h point. The results represent the average of three separate experiments in triplicate, and are expressed as mean \pm S.E.M. plotted; Statistical significance: ** $p \leq 0.01$ compared to control. (B) Cell extracts of FAK transfected (siFAK) and scramble transfected cells (siScr) were probed with the specific FAK antibody. (C) Specific siFAK and siScr protein bands were densitometrically analysed and adjusted against actin. The results represent the average of three separate experiments. (D) Effect of FAK-siRNA on cell adhesion. 48 h after transfection, Saos 2 FAK transfected (siFAK) and scramble transfected (siScr) cells were harvested and seeded (10^5 cells) for 30 min on 96 well-plates coated with FN ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). The number of attached cells was determined using fluorometric CyQUANT Assay kit. The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm S.E.M. plotted; Statistical significance: ** $p \leq 0.01$, among the FAK and scramble siRNA transfected cells.

FN as compared to scramble siRNA-transfected cells upon neutralization of endogenous TGF- β 2. Therefore, one can conclude that the inverse correlation existing between lumican expression and Saos 2 cell adhesion is dependent on active TGF- β 2 signaling. Furthermore, the significant increase in Smad 2 activation present in lumican-deficient cells was annulled in the presence of the specific TGF- β 2 antibody, demonstrating that lumican is an upstream regulator of the TGF- β 2/Smad 2 signaling cascade. Since the expression of lumican in Saos 2 cells was previously found to be inhibited by TGF- β 2 (Nikitovic et al., 2008), these data suggests the existence of a backfeed loop between lumican expression and TGF- β 2 activity. Another SLRP member nephrocan, was found in kidney tubular cells to down-regulate Smad 3 phosphorylation, indicating that it may function as an endogenous inhibitor of the TGF- β /Smad 3 signaling pathway, upstream of Smad 3 (Mochida et al., 2006). The class I SLRP, decorin binds to TGF-beta, thus inhibiting its bioactivity, and is a direct or indirect negative modulator of TGF-beta synthesis (Ständer et al., 1998, 1999). On the other hand biglycan-

deficient cells have reduced response to TGF- β (Young et al., 2002), which underscores the critical roles of SLRP members in controlling TGF- β superfamily signaling (Chen et al., 2004; Ohta et al., 2004; Kizawa et al., 2005).

Since, our data demonstrate that TGF- β 2 effect on Saos 2 cell adhesion is FN-dependent we hypothesized that TGF- β 2 modulates osteosarcoma attachment in part via regulating the expression of β 1 integrins which are main FN ligands (Hu et al., 1995; Cheng et al., 2000). TGF- β pathway has previously been demonstrated to regulate the integrin expression of osteoblast-like cells (Nesti et al., 2002; Lai et al., 2000). Specifically, TGF- β 1 was found to augment the expression of α v β 5 by enhancing transcription of the β 5 subunit gene in a murine osteoblastic cell line, via a mechanism that requires both Sp1/Sp3 and Smad proteins. The higher α 5 β 1 integrin expression levels resulted in increased adhesion of TGF- β treated murine osteoblasts (Lai et al., 2000). In this study, TGF- β 2 stimulated β 1 integrin expression. Since lumican-deficient Saos 2 cells have their increased integrin β 1 expression annulled in the presence of the specific TGF- β 2 antibody, it is postulated that lumican through the inhibition of endogenous TGF- β 2 activity modulates integrin β 1 levels. The expression of integrin β 1 has earlier been shown to correlate to pFAK activation (Yao et al., 2007). FAK is an immediate downstream signal of the β 1-integrin, and inactivation of FAK is negatively correlated to osteoblastic differentiation (Tamura et al., 2001). Interestingly, our results demonstrate that neutralization of endogenous TGF- β 2 was also correlated to decreased pFAK activation levels whereas exogenous TGF- β 2 enhanced pFAK phosphorylation at Y397. Lumican-deficient cells had increased FAK Y397 activation demonstrating thus, that lumican expression is inversely correlated to FAK phosphorylation levels. Furthermore, FAK-deficient Saos 2 cells exhibited significantly lower FN-dependent adhesion as compared to wild type cells confirming thus the key role of FAK on osteoblastic cells attachment (Nakayamada et al., 2003). This is furthermore, in accord with previous findings showing that the addition of TGF- β 1 to MC3T3-E1 cells augmented expression of focal adhesion kinase, resulted in cytoskeletal reorganization, and cell elongation, accompanied by an increase in the area of cell-free substratum (Karsdal et al., 2001). Therefore, these data suggests that the downregulation of TGF- β 2 activity by lumican has not only a single target hit (i.e., pSmad 2), but also downstream of pSmad 2 multiple kinase inactivation effects. Recently, the global effect of TGF- β 2 inhibition was suggested to result in a more comprehensive inhibition of several important pathways involved in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma, including decreased phosphorylation of Smad2, FAK and β 1-integrin, and with increased levels of E-cadherin expression (Giannelli et al., 2010; Fransvea et al., 2010).

At this point, it is still unclear how lumican inhibits TGF- β 2 signaling. Mature TGF- β is secreted together with latent TGF- β -binding protein(s) and the dissociation from this complex is a central regulatory mechanism for its activation (Miyazono et al., 1991; Rifkin, 2005). Since lumican is a secreted protein its inhibitory effect(s) is likely perpetrated through the extracellular interaction with: (a) mature TGF- β to inhibit the ligand-receptor(s) binding; (b) TGF- β type I and/or type II receptor to block the binding of mature TGF- β to its receptors. and/or (c) secreted TGF- β complex to inhibit the dissociation of mature TGF- β . Therefore, further studies on the mechanisms by which lumican inhibit TGF- β activities are in order.

In this study, the existence of a novel out-in signaling circuit in human osteosarcoma cells has been demonstrated. The secreted to extracellular matrix lumican is shown to be an endogenous inhibitor of TGF- β 2 activity, resulting in downstream effector modulation including pSmad 2, integrin β 1 and pFAK to regulate osteosarcoma adhesion.

References

- Baba H, Ishiwata T, Takashi E, Xu G, Asano G. Expression and localization of lumican in the ischemic and reperfused rat heart. *Japanese Circulation Journal* 2001;65:445–50.
- Benayahu D, Shur I, Meller I, Issakow J. Cellular and molecular properties associated with osteosarcoma cells. *Journal of Cell Biochemistry* 1998;84:108–14.
- Blochberger TC, Cornuet PK, Hassell JR. Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267:20613–9.
- Brezillon S, Zeltz C, Schneider L, Terryn C, Vuillermoz B, Ramont L, et al. Lumican inhibits B16F1 melanoma cell lung metastasis. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2009;60(Suppl. 4):15–22.
- Chakravarti S, Magnuson T, Lass LH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *Journal of Cell Biology* 1998;141:1277–86.
- Chen XD, Fisher LW, Robey PG, Young MF. The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation. *FASEB Journal* 2004;18:948–58.
- Cheng SL, Lai CF, Fausto A, Chellaiah M, Feng X, McHugh KP, et al. Regulation of α 5 β 1 and α 5 β 2 integrins by dexamethasone in normal human osteoblastic cells. *Journal of Cell Biochemistry* 2000;77:265–76.
- Dolnikoff M, Morin J, Roughley PJ, Ludwig MS. Expression of lumican in human lungs. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1998;19:582–7.
- Franchi A, Arganini L, Baroni G, Calzolari A, Capanna R, Campanacci D, et al. Expression of transforming growth factor beta isoforms in osteosarcoma variants: association of TGF beta 1 with high-grade osteosarcomas. *Journal of Pathology* 1998;185:284–9.
- Fransvea E, Mazzocca A, Santamato A, Azzariti A, Antonaci S, Giannelli G. Kinase activation profile associated with TGF- β -dependent migration of HCC cells: a preclinical study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2010, September 16 [Epub ahead of print].
- Funderburgh JL, Funderburgh ML, Mann MM, Conrad GW. Arterial lumican. Properties of a corneal-type keratan sulphate proteoglycan from bovine aorta. *Journal of Biological Chemistry* 1991;266:24773–7.
- Giannelli G, Mazzocca A, Fransvea E, Lahn M, Antonaci S. Inhibiting TGF- β signaling in hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Acta* 2010, December 1 [Epub ahead of print].
- Gassling VL, Açil Y, Springer IN, Hubert N, Wiltfang J. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2009;108:48–55.
- Grover J, Chen XN, Korenberg JR, Roughley PJ. The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:21942–9, 1995.
- Hong IK, Jin YJ, Byun HJ, Jeoung DI, Kim YM, Lee H. Homophilic interactions of Tetraspanin CD151 up-regulate motility and matrix metalloproteinase-9 expression of human melanoma cells through adhesion-dependent c-Jun activation signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:24279–92.
- Hu DD, Lin EC, Kovach NL, Hoyer JR, Smith JW. A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins α v β 1 and α v β 5. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:26232–8.
- Iozzo RV. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 1997;32:141–74.
- Ishiwata T, Yamamoto T, Kawahara K, Kawamoto Y, Matsuda Y, Ishiwata S, et al. Enhanced expression of lumican inhibited the attachment and growth of human embryonic kidney 293 cells. *Experimental and Molecular Pathology* 2010;88:363–70.
- Kao WW. Ocular surface tissue morphogenesis in normal and disease states revealed by genetically modified mice. *Cornea* 2006;25(Suppl. 1):S7–19.
- Karsdal MA, Fjording MS, Foged NT, Delaisse JM, Lochter A. Transforming growth factor-beta-induced osteoblast elongation regulates osteoclastic bone resorption through a p38 mitogen-activated protein kinase- and matrix metalloproteinase-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:39350–8.
- Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A, et al. *Nature Genetics* 2005;37:138–44.
- Lai CF, Feng X, Nishimura R, Teitelbaum SL, Avioli LV, Ross FP, et al. Transforming growth factor-beta up-regulates the beta 5 integrin subunit expression via Sp1 and Smad signalling. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:36400–6.
- Leygue E, Snell L, Dotzlaw H, Hole K, Hiller-Hitchcock T, Roughley PJ, et al. Expression of lumican in human breast carcinoma. *Cancer Research* 1998;58:1348–52.
- Matsuda Y, Yamamoto T, Kudo M, Kawahara K, Kawamoto M, Nakajima Y, et al. Expression and roles of lumican in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* 2008;33:1177–85.
- Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO Journal* 1991;10:1091–101.
- Mochida Y, Parisuthiman D, Kaku M, Hanai J, Sukhatme VP, Yamauchi M. Nephrocain, a novel member of the small leucine-rich repeat protein family, is an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:36044–51.

- Naito Z. The role of small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family in pathological lesions and cancer cell growth. *Journal of Nippon Medical School* 2005;72:137–45.
- Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Tamura M, Tanaka Y. Beta1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on osteoblasts and osteoclast maturation. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:45368–74.
- Nesti LJ, Caterson EJ, Wang M, Chang R, Chapovsky F, Hoek JB, et al. TGF-beta1 calcium signaling increases alpha5 integrin expression in osteoblasts. *Journal of Orthopaedic Research* 2002;20:1042–9.
- Nikitovic D, Berdiaki A, Zafiropoulos A, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, et al. Lumican expression is positively correlated with the differentiation and negatively with the growth of human osteosarcoma cells. *FEBS Journal* 2008;275:350–61.
- Ohta K, Lupo G, Kuriyama S, Keynes R, Holt CE, Harris WA, et al. Tsukushi functions as an organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin. *Developmental Cell* 2004;7:347–58.
- Qin H, Ishiwata T, Asano G. Effects of the extracellular matrix on lumican expression in rat aortic smooth muscle cells in vitro. *Journal of Pathology* 1999;195:604–8.
- Raouf A, Ganss B, McMahon C, Vary C, Roughley PJ, Seth A. Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix. *Matrix Biology* 2002;4:361–7.
- Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:7409–12.
- Saika S, Shiraiishi A, Liu CY, Funderburgh JL, Kao CW, Converse RL, et al. Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:2607–12.
- Schaefer L, Grone HJ, Raslik I, Robenek H, Ugorcakova J, Budny S, et al. Small proteoglycans of normal adult human kidney: distinct expression patterns of decorin, biglycan, fibromodulin, and lumican. *Kidney International* 2000;58:1557–68.
- Ständer M, Naumann U, Dumitrescu L, Heneka M, Löschnann P, Gulbins E, et al. Decorin gene transfer-mediated suppression of TGF-beta synthesis abrogates experimental malignant glioma growth in vivo. *Gene Therapy* 1998;5:1187–94.
- Ständer M, Naumann U, Wick W, Weller M. Transforming growth factor-beta and p-21: multiple molecular targets of decorin-mediated suppression of neoplastic growth. *Cell Tissue Research* 1999;296:221–7.
- Sztrolovics R, Alini M, Mort JS, Roughley PJ. Age related changes in fibromodulin and lumican in human intervertebral discs. *Spine* 1999;24:1765–71.
- Tamura Y, Takeuchi Y, Suzawa M, Fukumoto S, Kato M, Miyazono K, et al. Focal adhesion kinase activity is required for bone morphogenetic protein-Smad1 signaling and osteoblastic differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *Journal of Bone Mineral Research* 2001;16:1772–9.
- Troup S, Njue C, Kliwer EV, Parisien M, Roskelley C, Chakravarti S, et al. Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2003;9:207–14.
- Yao KE, Tan J, Ye P, Wang K, Xu W, Shen Tu X, et al. Integrin beta1-mediated signaling is involved in transforming growth factor-beta2-promoted migration in human lens epithelial cells. *Molecular Vision* 2007;13:1769–76.
- Young MF, Bi Y, Ameye L, Chen XD. Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases. *Glycoconjugate Journal* 2002;19:257–62.
- Yu Y, Harris RI, Yang JL, Anderson HC, Walsh WR. Differential expression of osteogenic factors associated with osteoinductivity of human osteosarcoma cell lines. *Journal of Biomedical Material Research A* 2004;70:122–8.
- Zeltz C, Brézillon S, Käpylä J, Eble JA, Bobichon H, Terryn C, et al. Lumican inhibits cell migration through $\alpha 2\beta 1$ integrin. *Experimental Cell Research* 2010;316:2922–31.