



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Διευθύντρια: Ασπασία Τσέζου

Διδακτορική Διατριβή

**«Γενετικοί και Επιγενετικοί παράγοντες στην οστεοαρθρίτιδα: Ο
ρόλος των microRNAs.»**

Υπό

ΕΛΕΝΗ ΝΤΟΥΜΟΥ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ-ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος
Λάρισα, 2023

© 2023 ΕΛΕΝΗ ΝΤΟΥΜΟΥ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

1^{ος} Εξεταστής (Επιβλέπουσα)	Ασπασία Τσέζου Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2^{ος} Εξεταστής	Κωσταντίνος Μαλίζος Ομ. Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3^{ος} Εξεταστής	Μιχαήλ Χαντές Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
4^{ος} Εξεταστής	Θεόφιλος Καραχάλιος Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
5^{ος} Εξεταστής	Σωκράτης Βαρυτιμίδης Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
6^{ος} Εξεταστής	Βαρβάρα Τραχανά Επίκουρος Καθηγήτρια - Μόνιμη, Κυτταρική Βιολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
7ος Εξεταστής	Ιωάννα Παπαθανασίου Επίκουρος Καθηγήτρια, Ιατρική Βιολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας σε συνεργασία με την Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Για την επιτυχή ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κα Ασπασία Τσέζου, της οποίας η αμέριστη υποστήριξη και καθοδήγηση ήταν ανεκτίμητη σε όλη αυτή τη διαδρομή. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε και η επιστημονική της καθοδήγηση εμπλούτισαν σημαντικά την ερευνητική μου εμπειρία. Εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Ομ. Καθηγητή Ορθοπαιδικής κ. Κωνσταντίνο Μαλίζο, για τη συνεργασία και την ανεκτίμητη συνεισφορά στην ολοκλήρωση της διατριβής μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ορθοπαιδικής κ. Μιχαήλ Χαντέ για την επίβλεψη της διατριβής μου.

Ευχαριστώ θερμά τα αξιότιμα μέλη της εξεταστικής επιτροπής: το Καθηγητή Ορθοπαιδικής κ. Θεόφιλο Καραχάλιο, το Καθηγητή Ορθοπαιδικής κ. Σωκράτη Βαρυτιμίδη, την Επίκουρο Καθηγήτρια – Μόνιμη στη Κυτταρική Βιολογία κα Βαρβάρα Τραχανά και την Επίκουρο καθηγήτρια στην Ιατρική Βιολογία κα Ιωάννα Παπαθανασίου, για την κρίση της διατριβής μου.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους συναδέλφους μου, στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για την αρμονική πολυετή συνεργασία μας. Καθώς και τους συνεργάτες της Ορθοπαιδικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για την απρόσκοπτη συνεργασία μας στη συλλογή των δειγμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένεια μου και τους φίλους μου, για την αμέριστη ενθάρρυνση, την απέραντη υπομονή και την ατελείωτη υποστήριξη τους. Η πίστη τους στις ικανότητές μου με ενίσχυσε και με στήριξε κατά της διάρκειας της περάτωσης της διατριβής μου.

Ελένη Ντούμου

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Ελένη Ντούμου

Ηλεκτρονική διεύθυνση: elenintoumou@hotmail.com

Εκπαίδευση

Μάιος 2014-Νοέμβριος 2023: Υποψήφια Διδάκτωρ του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θέμα διατριβής: «Γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες στην Οστεοαρθρίτιδα: ο ρόλος των microRNAs».

2010-2012: Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας-Γενετικής, Διαγνωστικοί Βιοδείκτες.», Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Θέμα διπλωματικής: «Φαρμακογενετική μελέτη συσχέτισης γονιδιακών πολυμορφισμών και της απόκρισης στην θεραπεία σε ασθενείς με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό».

2005-2010: Πτυχίο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης.

Θέμα διπλωματικής: «Επίδραση της διακοπής του καπνίσματος του τσιγάρου στο σωματικό βάρος, στην πρόσληψη τροφής και στα επίπεδα γκρελίνης στη κυκλοφορία σε επίμυες».

Επαγγελματική εμπειρία

2020-2023: Μοριακή Βιολόγος σε ιδιωτικό Διαγνωστικό Εργαστήριο

06/2019-11/2019: Πρακτική Άσκηση στο Kennedy Institute of Rheumatology, University of Oxford (Ηνωμένο Βασίλειο)

2014-2022: Διδακτορική εργαστηριακή διατριβή στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

01/2013-04/2013: Πρακτική Άσκηση στο Department of Cell and Developmental Biology Anatomy Building University College London (Ηνωμένο Βασίλειο)

2011-2012: Εργαστηριακή διπλωματική στο Εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής & Συγκριτικής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2008-2009: Εργαστηριακή διπλωματική στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας, Ιατρική Σχολή Αλεξανδρούπολης, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Εργαστηριακές τεχνικές

- **ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ:** καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών, παρασκευή θρεπτικών μέσων, βακτηριακές καλλιέργειες
- **ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ:** απομόνωση DNA, RNA και πρωτεϊνών, σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR), ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (αγαρόζη και πολυακρυλαμίδης), RFLP, απομόνωση του DNA του πλασμιδίου, απομόνωση τού RNA, μέθοδος Bradford, κλωνοποίηση, ligation
- **ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ:** Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσοφνητική Μέτρηση (ELISA), Ανοσοκατακρήμνιση κατά Western, φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH), ανοσοφθορισμός, ανοσοϊστοχημεία
- **ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ:** εμπειρία στον χειρισμό έμβρυων ποντικών, κρυοτομές, εμφύτευση σε παραφίνη
- **ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ:** χειρισμός πειραματόζων (ποντίκια και αρουραίοι)
- **ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ:** παρασκευή καρυοτύπου και ανάλυση των χρωμοσωμάτων στο μικροσκόπιο
- **ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ:** Χρήση των εργαλείων βιοπληροφορικής (e.g Blast, miRwalk, TargetScan, DAVID, miRANDA, Reactome, Cytoscape), σχεδιασμός εκκνητών

Συμμετοχή σε Ερευνητικά Προγράμματα-Υποτροφίες

2019: Υποτροφία από το Οικονομικό Πανεπιστήμιο Αθηνών για Πρακτική άσκηση στο Πανεπιστήμιο της Οξφόρδης στα πλαίσια του προγράμματος κινητικότητας (Erasmus +).

2016-2017: Υποτροφία του ΙΚΥ στο πλαίσιο τού προγράμματος «Ερευνητικά προγράμματα αριστείας ΙΚΥ/SIEMENS» για την υλοποίηση του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο: «MicroRNAs: Νέοι βιοδείκτες για έγκυρη διάγνωση και πρόγνωση παθήσεων τού μυοσκελετικού».

2014-2015: Υποτροφία τού Εθνικού Κέντρου Έρευνας & Τεχνολογικής Ανάπτυξης/ Ινστιτούτο Βιοοικονομίας και Αγροτεχνολογίας (ΕΚΕΤΑ/ ΙΒΟ-πρώην ΙΕΤΕΘ), με αντικείμενο την ερευνητική υποστήριξη του έργου «ΚΡΗΠΙΣ-ΕΠΕΑ-Θ: Ευφυής πόλος εξειδίκευσης και Ανάπτυξης Θεσσαλίας: Έρευνα, Καινοτομία και Στρατηγικές» (ΕΣΠΑ 2007-2013) για την ερευνητική υποστήριξη της υλοποίησης της ενότητας εργασίας με τίτλο: «Μελέτη της παθογένειας εκφυλιστικών νοσημάτων του μυοσκελετικού συστήματος».

Ομιλίες – Αναρτημένες Ανακοινώσεις

- 38th Pan-Hellenic Congress of Endocrinology and Metabolism, held in Thessaloniki, Greece, April 6th- 9th 2011. Effects of Cigarette Smoke Cessation on Body Weight and Circulating Leptin levels in the Rat. Ypsilantis, Politou, Anagnostopoulos, Tsigalou, Papanastasi, **Ntoumou**, Kaliva, Tseliou, Kambourimiti, Kortsaris, Simopoulos
- 18th Pan-Hellenic Congress of Biosciences, Patra October 18th-20th 2012- Pharmacogenomic association study of gene polymorphisms ABCB1 and MTHFR and

treatment response to patients with psoriasis in the Greek population. **Ntoumou**, Vasilopoulos, Sarafidou, Stamatis, Zafiriou, Bagiatis, Patsatsi, Sotiriadis, Roussaki-Schulze, Mamuris

- ORS Annual meeting of 2017, San Diego, California, March 20-22, 2017. Circulating Micrnas Novel Biomarkers for Early Detection of Joint Infections. Mourmoura E, Malizos K, Varitimidis S, Stefanou N, Papathanasiou I, **Ntoumou** E, Anastasopoulou L, Tsezou A.
- ESHG Conference 2017, Copenhagen Denmark, May 27-30. Circulating microRNA signature as novel biomarker for osteoarthritis development. **Ntoumou** E, Braoudaki M, Lambrou G, Stefanou N, Papathanasiou I, Poulou M, Anastasopoulou L., Malizos K, Trachana V, Tzetis M, Tsezou A.
- ORS 2018 Annual Meeting, New Orleans, LA. Mir-140-3p, Mir-671-3p And Mir-33b-3p: A Three-mirna Signature In Serum As Biomarker For Osteoarthritis Development. Tsezou A, **Ntoumou** E, Braoudaki M, Lambrou G, Poulou M, Malizos K, Stefanou N, Anastasopoulou L, Tzetis M.
- EFORT, 2018, Barcelona. Serum MicroRNAs As Novel Biomarkers for Osteoarthritis Development. **Ntoumou**, Mourmoura, Anastasopoulou, Papathanasiou, Tzetis, Braoudaki, Heiss, Malizos, Tsezou.
- FENS FORUM 2022, Paris France, July 2022. A novel PGx test supporting drug selection for diseases of the Central Nervous System. **Ntoumou** E, Panagiotou N., Bothos E., Roukas D., Drakoulis N., Papasavva M., Karakostis F.A., Moulos P., Karakostis K.

Δημοσιεύσεις

- Vasilopoulos Y, Sarri C, Zafiriou E, Patsatsi A, Stamatis C, **Ntoumou** E, Fassos I, Tsalta A, Karra A, Roussaki-Schulze A, Sotiriadis D, Mamuris Z, Sarafidou T. A pharmacogenetic study of ABCB1 polymorphisms and cyclosporine treatment response in patients with psoriasis in the Greek population. Pharmacogenomics J. 2014;14(6):523-5. (Impact Factor: 4.229)
- **Ntoumou** E, Tzetis M, Braoudaki M, Lambrou G, Poulou M, Malizos K, Stefanou N, Anastasopoulou L, Tsezou A. Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes. Clin Epigenetics. 2017; 9:127 (Impact factor: 4.987)
- Trachana V*, **Ntoumou** E*, Anastasopoulou L, Tsezou A. Studying microRNAs in osteoarthritis: critical overview of different analytical approaches. Mechanisms of Ageing and Development.;171:15-23. (Impact factor: 3.739)
- Bothos E, **Ntoumou** E, Kelaidoni K, Roukas D, Drakoulis N, Papasavva M, Karakostis FA, Moulos P, Karakostis K. Clinical pharmacogenomics in action: design, assessment and implementation of a novel pharmacogenetic panel supporting drug selection for diseases of the central nervous system (CNS). J Transl Med. 2021 Apr 15;19(1):151. (Impact factor: 4.197)

Ξένες γλώσσες – Η/Υ

- Αγγλικά (Proficiency)
- Γαλλικά (B1)

- Γνώση στατιστικών πακέτων SPSS και GraphPad Prism
- Microsoft Word, Excel, Access, Powerpoint,
- Εισαγωγή στην γλώσσα προγραμματισμού R

Άλλες πιστοποιήσεις

- Πιστοποιητικό Επιμόρφωσης στη Βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων Αλληλούχισης Επόμενης Γενιάς (NGS) με R, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Κέντρο Επιμόρφωσης και Διά Βίου Μάθησης (Κ.Ε.ΔΙ.ΒΙ.Μ.)
- Πιστοποιητικό Επιμόρφωσης στη «Διαχείριση και Διοίκηση Έργου (Project Management)», Vellum.
- ISO 9001 2015 Internal Auditor Quality Management System Training, TUV, Hellas
- Πιστοποίηση Εκπαιδευτικής Επάρκειας Εκπαιδευτών Ενηλίκων, ΕΟΠΠΕΠ.

«Γενετικοί και Επιγενετικοί παράγοντες στην οστεοαρθρίτιδα: Ο ρόλος των microRNAs.»

ΕΛΕΝΗ ΝΤΟΥΜΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Ασπασία Τσέζου**, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπουσα**)
2. **Κωσταντίνος Μαλίζος**, ομ. Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Μιχαήλ Χαντές**, Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Περίληψη

Η Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί τη πιο κοινή χρόνια εκφυλιστική νόσο των αρθρώσεων και είναι κύρια αιτία πόνου και αναπηρίας. Είναι μία νόσος που πλήττει όλες τις αρθρώσεις του σώματος με μεγαλύτερη επιβάρυνση στην άρθρωση του γονάτου, ενώ επηρεάζει και τα δομικά στοιχεία της άρθρωσης, με κύρια χαρακτηριστικά της τον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, το σχηματισμό οστεοφύτων, τη σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού και την υπερτροφία του αρθρικού υμένα. Σε παγκόσμιο επίπεδο, εκτιμάται ότι περίπου 500 εκατομμύρια άτομα πάσχουν από ΟΑ. Διάφοροι παράγοντες κινδύνου, όπως η γήρανση, η παχυσαρκία, το φύλο, ο τραυματισμός των αρθρώσεων και η κληρονομικότητα, έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη και την εξέλιξη της ΟΑ. Ωστόσο, οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΟΑ παραμένουν ασαφείς.

Παρά τη σημαντική επιβάρυνση της ΟΑ για τους ασθενείς και τα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης, έως σήμερα δεν υπάρχουν ευαίσθητοι βιοδείκτες για την ανίχνευση της νόσου σε πρώιμα στάδια, ούτε αποτελεσματικές θεραπευτικές επιλογές εκτός της αρθροπλαστικής χειρουργικής επέμβασης (γονάτος ή ισχίου) σε προχωρημένα στάδια της νόσου. Η τυπική μέθοδος για τη διάγνωση και την αξιολόγηση της βαρύτητας της ΟΑ γονάτος γίνεται με ακτινογραφική απεικόνιση με βάση τη κλίμακα κατάταξης κατά Kellgren/Lawrence. Ως εκ τούτου, υπάρχει ανάγκη να εντοπιστούν μη επεμβατικοί και ευαίσθητοι βιοδείκτες για την έγκαιρη πρόγνωση και διάγνωση της ΟΑ, προκειμένου να αντιμετωπιστεί έγκαιρα και να βελτιστοποιηθεί η κλινική αντιμετώπιση της νόσου.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA (miRNAs) αποτελούν πολλά υποσχόμενους βιοδείκτες για διάφορες ασθένειες, όπως καρκίνος, διαβήτης, καρδιαγγειακές παθήσεις κ.α. Τα miRNAs είναι μια ομάδα μικρών μη κωδικών μορίων RNA, μήκους περίπου 22-28 νουκλεοτιδίων, που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο μέσω της αποικοδόμησης ή αναστολής της μετάφρασης των mRNA στόχων. Κάθε miRNA μπορεί να ρυθμίσει μεγάλο αριθμό γονιδίων μέσω πρόσδεσης κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή (UTR) των mRNA στόχων. Τα miRNAs ενέχονται σε διαδικασίες που σχετίζονται με την παθογένεια της ΟΑ, όπως η ομοιόσταση του χόνδρου, η ρύθμιση της εξωκυττάριας μήτρας, η οστεοποίηση, ο μεταβολισμός των οστών, η απόπτωση, η αυτοφαγία, η φλεγμονή και ο μεταβολισμός των λιπιδίων. Επιπλέον, τα miRNAs έχουν βρεθεί και στη κυκλοφορία. Τα στοιχεία δείχνουν ότι τα miRNAs που κυκλοφορούν μπορούν να μεταφερθούν μέσω μικροκυστιδίων, εξωσωμάτων, συμπλεγμάτων πρωτεΐνης Ago ή λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) και μπορούν είτε να αντανakλούν το κυτταρικό περιεχόμενο είτε να μεσολαβούν στη διακυτταρική σηματοδότηση, παρέχοντας πληροφορίες για την παθοφυσιολογική κατάσταση του κυττάρου.

Τα miRNAs θεωρούνται ελκυστικά μόρια ως βιοδείκτες λόγω της σταθερότητάς τους, της ιστοειδικής τους έκφρασης, της μη επεμβατικής ανίχνευσης και του ρυθμιστικού τους ρόλου στη γονιδιακή έκφραση. Παράλληλα, εξελίξεις στις τεχνικές της μοριακής βιολογίας έχουν διευκολύνει την ανίχνευση των miRNAs με μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια. Στο πλαίσιο αυτό, η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την διερεύνηση των προφίλ έκφρασης των miRNAs και τη συσχέτιση τους με την παθογένεια διαφόρων ασθενειών. Επιπλέον, τα miRNAs αποτελούν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους για την ανάπτυξη εξατομικευμένων στρατηγικών θεραπευτικής αντιμετώπισης της νόσου. Ειδικότερα, το hsa-miR-140, το οποίο έχει μελετηθεί ευρέως στην ΟΑ, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση και τη χονδρογένεση και έχειδειχθεί ότι εμφανίζει διαφοροποιημένη έκφρασή στον ΟΑ χόνδρο και στο αρθρικό υγρό, αλλά όχι στον ορό. Το hsa-miR-140 παράγει δύο ώριμα microRNAs: το hsa-miR-140-5p και το hsa-miR-140-3p.

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση του συνολικού προφίλ έκφρασης των miRNAs στον ορό ατόμων με ΟΑ γόνατος, που ενέχονται σε σημαντικές διαδικασίες με την παθογένεια της ΟΑ, και η ανεύρεση πιθανού μηχανισμού δράσης τους. Απώτερος σκοπός ήταν η ανάδειξη miRNAs που θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς προγνωστικούς βιοδείκτες για την ΟΑ. Για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ορού και αρθρικού χόνδρου ασθενών με πρωτοπαθή οστεοαρθρίτιδα που είχαν υποβληθεί σε ολική αρθροπλαστική γόνατος. Τα άτομα που εμφάνιζαν ρευματοειδή αρθρίτιδα ή αρθρίτιδα στα πλαίσια άλλου αυτοάνοσου νοσήματος, καθώς και χονδροδυσπλασία, σπηπική ΟΑ και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Για την ομάδα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από άτομα χωρίς ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων, τα οποία είχαν υποβληθεί σε σοβαρή χειρουργική επέμβαση κατάγματος ή ακρωτηριασμό.

Στη μελέτη πραγματοποιήθηκε ανάλυση του προφίλ έκφρασης των miRNAs χρησιμοποιώντας συστοιχίες miRNA υψηλής ευκρίνειας στον ορό ασθενών με ΟΑ και σε υγιή άτομα. Χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα miRNA Microarray Agilent Human, η οποία ανιχνεύει την έκφραση 2.549 miRNAs. Οι καμπύλες ROC κατασκευάστηκαν για την αξιολόγηση της διαγνωστικής αξίας στον ορό, των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ ΟΑ και υγιών ατόμων. Τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων miRNAs, που εμφάνιζαν τις μεγαλύτερες διαφορές στην έκφρασή τους στον ορό, μεταξύ ΟΑ και ομάδας ελέγχου, όπως hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p, and hsa-miR-671-3p επαληθεύθηκαν και σε δείγματα αρθρικού χόνδρου ατόμων με ΟΑ. Με τη χρήση διαφόρων εργαλείων βιοπληροφορικής διερευνήθηκαν οι προβλεπόμενες μοριακές σηματοδοτήσεις και τα γονίδια στόχοι των

διαφοροποιημένων miRNAs. Στην συνέχεια, επιλέχθηκε το hsa-miR-140-3p, προκειμένου να αναλυθεί περαιτέρω ο ρόλος του στην ΟΑ. Με εργαλεία βιοπληροφορικής, απεικονίστηκαν σε δίκτυα οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις των γονιδίων στόχων του hsa-miR-140-3p. Πραγματοποιήθηκαν επιδράσεις με μιμητή του miR-140-3p σε ΟΑ χονδροκύτταρα και διερευνήθηκε η επίδραση του στα μεταγραφικά επίπεδα των πιθανών γονιδίων στόχων TGF α , BCL-2, SIRT-1, HMGCR και HDAC4 και μοριακών δεικτών ομοιοστασίας του χόνδρου και συγκεκριμένα της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP-13, του TNFA και του COL2A1.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής ανέδειξαν 279 miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στον ορό ασθενών με ΟΑ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Μεταξύ αυτών, 205 miRNA (73,5%) εμφάνισαν αυξημένη έκφραση και 74 miRNAs (26,5%) εμφάνιση μειωμένη έκφραση. Η ανάλυση ROC εντόπισε 77 miRNAs με AUC>0,8 και τιμές $p<0,05$ υποδεικνύοντας τη διαγνωστική τους δυνατότητα. Η ανάλυση βιοπληροφορικής αυτών των 77 miRNAs ανέδειξε τη συμμετοχή τους σε πολλαπλές σηματοδοτήσεις που σχετίζονται με την ΟΑ, όπως FoxO, mTOR, Wnt, PI3K/Akt, TGF- β , ECM-υποδοχέα και βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων. Ο προσδιορισμός της έκφρασης των επιλεγμένων miRNAs (hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p, and hsa-miR-671-3p) με qRT-PCR επιβεβαίωσε τη μείωση της έκφρασης τριών εξ αυτών, των miRNAs hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-671-3p και hsa-miR-140-3p στον ορό ασθενών με ΟΑ. Η μειωμένη έκφραση των hsa-miR-140-3p και hsa-miR-671-3p παρατηρήθηκε επίσης και σε δείγματα αρθρικού χόνδρου από ασθενείς με ΟΑ σε σχέση με υγιή άτομα, επιβεβαιώνοντας ότι πρόκειται για κυκλοφορούντα miRNA που υπάρχουν και στο περιβάλλον της ΟΑ άρθρωσης.

Βιοπληροφορική ανάλυση του hsa-miR-140-3p ανέδειξε τα σχετιζόμενα με την ΟΑ γονίδια στόχους του. Οι σημαντικότερες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του δικτύου που δημιουργήθηκε μεταξύ των γονιδίων στόχων αποκαλύφθηκαν με την ανάλυση της τοπολογίας του δικτύου και με την ανάλυση μονοπατιών-γονιδιακών οντολογιών. Συνεκτιμώντας τις παραπάνω αναλύσεις βιοπληροφορικής, προέκυψε ότι το PTEN αποτελεί ένα γονίδιο που εμφάνισε έναν από τους υψηλότερους βαθμούς συνδεσιμότητας στο δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (PPI, protein-protein interactions) και με συμμετοχή σε πολλαπλές σηματοδοτήσεις/διαδικασίες σημαντικές για την ΟΑ.

Περαιτέρω, η μελέτη της 3' UTR του mRNA του PTEN για την εύρεση λειτουργικών θέσεων σύνδεσης του hsa-miR-140-3p, με τη χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής TargetScanHuman 8.0, έδειξε την ύπαρξη αλληλουχιών, οι οποίες αναγνωρίζονται από το miR-140-3p μέσω των οποίων ασκεί τη δράση του στο PTEN. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες για το miR-140-3p στη 3'UTR του PTEN, στη θέση 1763-1769

και θέση 2882-2888. Χορήγηση του miR-140-3p mimic για 72 ώρες (100 nm) σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων έδειξε σημαντική μείωση των επιπέδων της mRNA έκφρασης του PTEN σε σχέση με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε. Τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που έδειξαν αυξημένη μεταγραφική έκφραση του PTEN και μειωμένη έκφραση του hsa-miR-140-3p στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά, αναδεικνύουν την αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ του miR-140-3p και του PTEN, το ρόλο του miR-140-3p στη ρύθμιση της έκφρασης του PTEN και ένα πιθανό μοριακό μηχανισμό ο οποίος συμβάλλει στη διαφοροποιημένη έκφραση του PTEN στον OA χόνδρο. Επιπλέον, η χορήγηση του miR-140-3p mimic σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων, επέφερε σημαντική μείωση των επιπέδων της mRNA έκφρασης των γονιδίων *HMGCR*, *HDAC4* και *MMP-13* και αύξηση της mRNA έκφρασης του γονιδίου *BCL-2*, σε σχέση με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε το hsa-miR-140-3p.

Συμπερασματικά, αναδείχθηκε μια υπογραφή τριών miRNA (hsa-miR-140-3p, hsa-miR-671-3p και hsa-miR-33b-3p) στον ορό ασθενών με OA με τη χρήση μικροσυστοιχιών miRNAs. Αυτά τα miRNAs θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες για την αξιολόγηση του κινδύνου και της εξέλιξης της OA. Επιπρόσθετα, αναδείχθηκε το hsa-miR-140-3p εκτός από βιοδείκτης και ως πιθανός θεραπευτικός στόχος για την οστεοαρθρίτιδα. Η χρήση αναστολέων ή μιμητικών μορίων των miRNAs έχει αποδειχθεί ότι έχει θεραπευτικά οφέλη σε προκλινικά (ζωικά) μοντέλα της νόσου, υποδεικνύοντας ότι αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την αναστολή της εξέλιξης της OA σε πρώιμα στάδια.

Abstract

Osteoarthritis (OA) is the most common chronic degenerative joint disease, causing significant pain and disability. It affects all joints in the body with the knee joint bearing the greatest burden. OA affects structural elements of the joint, characterized by degeneration of joint cartilage, formation of osteophytes, subchondral bone sclerosis, and synovial membrane hypertrophy. Globally, it is estimated that around 500 million people suffer from OA. Various risk factors such as aging, obesity, gender, joint injury, and heredity have been associated with the development and progression of OA. However, the precise molecular mechanisms underlying OA pathogenesis remain unclear.

Despite the significant burden of OA on patients and healthcare systems, there are currently no sensitive biomarkers for early detection of the disease, nor effective therapeutic options apart from joint replacement surgery (knee or hip) in advanced stages of the disease. The standard method for diagnosing and assessing the severity of knee OA is through radiography based on the Kellgren/Lawrence grading scale. Therefore, there is a need to identify non-invasive and sensitive biomarkers for the early prediction and diagnosis of OA, for the early treatment and the optimization of the clinical management of the disease.

Recent studies have reported that small non-coding RNAs called microRNAs (miRNAs) are considered as promising biomarkers for various diseases such as cancer, diabetes, cardiovascular diseases, and OA. MiRNAs are a group of small non-coding RNA molecules, approximately 22-28 nucleotides in length, that regulate gene expression post-transcriptionally by degrading or inhibiting the translation of target mRNAs. Each miRNA can target multiple genes by binding primarily to the 3' untranslated region (UTR) of their target mRNAs. MiRNAs are involved in processes related to OA pathogenesis, such as cartilage homeostasis, regulation of the extracellular matrix, osteogenesis, bone metabolism, apoptosis, inflammation, and lipid metabolism. Additionally, miRNAs have been found in circulation, suggesting their potential as biomarkers. They can be transported through microvesicles, exosomes, protein complexes like Ago, or high-density lipoproteins (HDL), reflecting the cellular content or mediating intercellular signaling, providing valuable information about the pathophysiological state of cells.

MiRNAs are attractive as biomarkers due to their stability, tissue-specific expression, non-invasive detection, and regulation of gene expression. Furthermore, advances in molecular biology techniques have facilitated sensitive and accurate detection of miRNAs. Microarray technology is a valuable tool for investigating miRNA expression profiles and their role in the

pathogenesis of various diseases. Moreover, miRNAs represent potential therapeutic targets for developing personalized therapeutic strategies for the disease. Specifically, hsa-miR-140, extensively studied in OA, plays a significant role in chondrocyte homeostasis and chondrogenesis. It has been reported to show differential expression in OA cartilage and synovial fluid but not in serum. Hsa-miR-140 generates two mature microRNAs: hsa-miR-140-5p and hsa-miR-140-3p.

The aim of the present thesis is the investigation of miRNAs involved in significant processes related to OA pathogenesis, in the serum of individuals with knee osteoarthritis (OA) and the identification of implicated mechanisms controlling their actions. The goal was to highlight miRNAs that could emerge as potentially important prognostic/diagnostic biomarkers for OA. Cartilage samples from patients with primary osteoarthritis who had undergone total knee arthroplasty were used. Patients with rheumatoid arthritis or arthritis and other autoimmune diseases, as well as chondrodysplasia, septic OA and post-traumatic OA were excluded from the study. For the control group, cartilage samples were obtained from individuals, with no history of joint disease, who had undergone severe fracture repair surgery or amputation.

More precisely, a comprehensive analysis of miRNA expression profiles was conducted using high-density miRNA arrays in the serum of OA patients compared to healthy individuals. The Agilent Human miRNA Microarray platform, interrogating 2,549 miRNAs, was used. ROC curves were constructed to evaluate the diagnostic value of the differentially expressed miRNAs in the serum of OA patients and healthy individuals. The expression levels of specific miRNAs, which showed the greatest differences in the serum between OA and the control group, such as hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p, and hsa-miR-671-3p, were validated in samples of articular cartilage from the same individuals. Bioinformatics tools were used to investigate the predicted molecular signaling pathways and the target genes of the differentially expressed miRNAs. Subsequently, hsa-miR-140-3p was selected to further investigate its role in OA. Protein-protein interaction networks of the target genes of hsa-miR-140-3p were constructed using bioinformatics tools. Transfection of OA chondrocytes with miR-140-3p mimic was performed, and its impact on the transcriptional levels of potential target genes such as PTEN, TGF α , BCL-2, SIRT-1, HMGCR and HDAC4, as well as molecular markers related to cartilage homeostasis, specifically MMP-13, TNFA, and COL2A1, was investigated.

The results of the thesis revealed 279 miRNAs deregulated in the serum of OA patients compared to the control group, 205 miRNAs (73.5%) showed increased expression and 74 miRNAs (26.5%) exhibited decreased expression. ROC analysis identified 77 miRNAs with

AUC>0.8 and p-values<0.05, indicating their diagnostic potential. Bioinformatics analysis of these 77 miRNAs revealed their involvement in multiple signaling pathways related to OA, such as FoxO, mTOR, Wnt, PI3K/Akt, adipocytokine, TGF- β , ECM receptor, and fatty acid biosynthesis pathways. The expression levels of the selected miRNAs (hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p, and hsa-miR-671-3p) were validated with qRT-PCR, showing reduced expression of three miRNAs (hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-671-3p, and hsa-miR-140-3p) in the serum of OA patients compared to healthy individuals. Hsa-miR-140-3p and hsa-miR-671-3p expression levels were consistently downregulated in articular cartilage of OA patients compared to healthy individuals, confirming their presence in the OA joint environment.

Through bioinformatics analysis, the target genes of hsa-miR-140-3p associated with osteoarthritis were identified. Notably, significant protein-protein interaction networks involving these target genes were discovered through network topology analysis and pathway-gene ontology analysis. Considering these bioinformatics findings, PTEN emerged as a gene displaying high connectivity in the PPI network and involvement in multiple pathways/processes crucial for OA.

Furthermore, the analysis of the 3' UTR mRNA of PTEN to identify functional binding sites of hsa-miR-140-3p, using the bioinformatics tool TargetScanHuman 8.0, revealed the presence of specific sequences recognized by hsa-miR-140-3p. Specifically, two complementary sequences for miR-140-3p were found in the 3' UTR of PTEN, at positions 1763-1769 and 2882-2888. Treatment of OA chondrocytes with miR-140-3p mimic (100 nM) for 72 hours resulted in significant reduction of PTEN mRNA expression levels compared to untreated cells. These findings combined with the results showing increased PTEN transcriptional levels and decreased hsa-miR-140-3p levels in osteoarthritic chondrocytes compared to normal, indicate an inverse correlation between these two molecules, highlighting the role of miR-140-3p in PTEN regulation, and a potential molecular mechanism contributing to the differential expression of PTEN in OA cartilage. Moreover, treatment of OA chondrocytes with miR-140-3p mimic resulted in significantly decreased HMGCR, HDAC4, and MMP-13 mRNA expression levels and increased BCL-2 mRNA expression levels compared to untreated cells.

In conclusion, a signature of three miRNAs (hsa-miR-140-3p, hsa-miR-671-3p, and hsa-miR-33b-3p) was identified in the serum of OA patients using miRNA microarrays. These miRNAs could be considered as potential biomarkers for assessing the risk and progression of OA. Additionally, hsa-miR-140-3p was identified not only as a biomarker but also as a potential therapeutic target for osteoarthritis. The use of miR inhibitors or mimics has been shown to

have therapeutic benefits in preclinical (animal) models of the disease, indicating that it is a promising approach for slowing down the progression of OA at early stages.

Περιεχόμενα

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	21
A.1 Οστεοαρθρίτιδα	22
A.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	22
A.1.2 Επιδημιολογία	22
A.1.3 Κοινωνικο-δημογραφικά χαρακτηριστικά και παράγοντες κινδύνου	24
A.1.4 Ταξινόμηση	25
A.1.6 Η ΟΑ προσβάλλει ολόκληρη την άρθρωση -Παθογένεια της ΟΑ.....	25
A.1.7.1 Αρθρικός χόνδρος	26
A.1.7.2 Υποχόνδριο οστό.....	29
A.1.7.3 Αρθρικός θύλακας και φλεγμονή.....	31
A.1.7.4 Παχυσαρκία και λιποκίνες.....	33
A.1.8 Γενετική Προδιάθεση στην Οστεοαρθρίτιδα	35
A.2 Επιγενετική ρύθμιση στην Οστεοαρθρίτιδα.....	39
A.2.1 Βιογένεση των miRNAs.....	39
A.2.2 In silico ανάλυση miRNAs με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής.....	43
A.2.3 Τα miRNAs της κυκλοφορίας ως πιθανοί βιοδείκτες για την ΟΑ.....	44
A.2.4 Τα miRNAs στην Οστεοαρθρίτιδα.....	47
A.2.5 Το miR-140 και ο ρόλος του στην ΟΑ.....	50
A.2.5.1 Ο ρόλος του miR-140-3p	51
A.3 Το γονίδιο PTEN.....	52
A.3.1 PTEN και Οστεοαρθρίτιδα	54
A.4 Ο ρόλος των γονιδίων <i>TGFα</i> , <i>BCL-2</i> , <i>SIRT-1</i> , <i>HMGCR</i> , και <i>HDAC4</i> στην Οστεοαρθρίτιδα.	54
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	59
B.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	60
B.1.1 Συλλογή δειγμάτων.....	60
B.1.2 Συλλογή ορού από δείγματα περιφερικού αίματος.....	62

B.1.3 Απομόνωση RNA από δείγματα ορού περιφερικού αίματος.....	62
B.1.4 Μικροσυστοιχίες miRNA (miRNA microarrays).....	65
B.1.5 Ανάλυση των δεδομένων των microarrays	70
B.1.6 ROC Ανάλυση.....	71
B.1.7 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) από RNA δειγμάτων ορού	72
B.1.9 Σχετική ποσοτικοποίηση miRNAs με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) με τη χρήση του mirScript SYBR® Green PCR Kit σε δείγματα ορού.....	74
B.1.8 Απομόνωση RNA από χονδροκύτταρα	80
B.1.9 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) από RNA χονδροκυττάρων	82
B.1.10 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης miRNAs και mRNA μεταγράφων σε χονδροκύτταρα καλλιέργειας μεταξύ ατόμων με ΟΑ και φυσιολογικών ατόμων με την χρήση της μεθόδου Real-Time qPCR.....	84
B.1.11 Αποσιώπηση γονιδίων με τη χρήση miRNAs.....	89
B.1.12 Βιοπληροφορική ανάλυση.....	91
B.1.13 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη τεχνική της Real Time.....	94
B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	95
B.2.1 Ανεύρεση miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στον ορό ατόμων με ΟΑ σε σχέση με υγιή άτομα με χρήση μικροσυστοιχιών miRNAs	95
B.2.2 Αξιολόγηση της διαγνωστικής αξίας των διαφοροποιημένων miRNAs στον ορό, με τον υπολογισμό καμπύλων ROC.	96
B.2.3 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης επιλεγμένων miRNAs με την μέθοδο qRT-PCR στον ορό ατόμων με ΟΑ σε σχέση με υγιή άτομα	101
B.2.4 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης επιλεγμένων miRNAs με την μέθοδο qRT-PCR σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων από άτομα με ΟΑ σε σχέση με υγιή άτομα.....	103
B.2.5 Ανάλυση σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν τα miRNAs και πρόβλεψη γονιδίων στόχων τους.....	104
B.2.6 Ανεύρεση γονιδίων στόχων του miR-140-3p που σχετίζονται με την ΟΑ.....	106
B.2.7 Ανεύρεση σηματοδοτικών μονοπατιών και δικτύων που συνδέουν το miR-140-3p με την ΟΑ.....	110
B.2.8 In silico ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA του <i>PTEN</i> με τη χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής TargetScanHuman 8.0	115
B.2.9 Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου PTEN σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων	115

B.2.10 Επίδραση miR-140-3p mimic σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων και μελέτη έκφρασης του γονιδίου στόχου <i>PTEN</i>	116
B.2.11 Επίδραση του miR-140-3p mimic σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων και μελέτη έκφρασης των πιθανών γονιδίων στόχων <i>TGFα</i> , <i>BCL-2</i> , <i>SIRT-1</i> , <i>HMGCR</i> και <i>HDAC4</i>	116
B.2.12 Επίδραση miR-140-3p mimic σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων και μελέτη της έκφρασης μοριακών δεικτών της ομοιοστασίας του χόνδρου.....	117
B.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	119
Βιβλιογραφία.....	133

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1 Οστεοαρθρίτιδα

A.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι μια χρόνια εκφυλιστική πάθηση των αρθρώσεων και της σπονδυλικής στήλης, και αποτελεί κύρια αιτία αναπηρίας στον ενήλικο πληθυσμό. Παρόλο που η αποδόμηση του χόνδρου αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό της ΟΑ, τα τελευταία χρόνια έχει διαπιστωθεί η γενικευμένη εμφάνιση αλλαγών σε όλους τους ιστούς της άρθρωσης, συμπεριλαμβανομένων του υποχόνδριου οστού, των συνδέσμων, των τενόντων, του μηνίσκου και του αρθρικού υμένα^{1,2}. Πιο συγκεκριμένα, η παθοφυσιολογία της νόσου χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια του αρθρικού χόνδρου, ασβεστοποίηση του χόνδρου, σχηματισμό οστεοφύτων, αναδιαμόρφωση του υποχόνδριου οστού και ήπια έως μέτρια φλεγμονή του αρθρικού υμένα. Η ΟΑ συντελεί σε μεγάλο βαθμό στην επιβάρυνση της υγείας και εμφανίζει σημαντικές επιπτώσεις στη ποιότητα της ζωής των ατόμων που νοσούν, στα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης και στο ευρύτερο κοινωνικοοικονομικό κόστος^{1,2}.

Ωστόσο η πλήρης κατανόηση της αιτιολογίας της νόσου παραμένει άγνωστη και οφείλεται σε πολλαπλούς παράγοντες. Μεταξύ των επιβαρυντικών παραγόντων για τη παθογένεια της ΟΑ είναι η γενετική προδιάθεση, η εμβιομηχανική της προσβεβλημένης άρθρωσης και η εμφάνιση φλεγμονής. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η γήρανση, η αυξανόμενη παχυσαρκία στο παγκόσμιο πληθυσμό και οι τραυματισμοί στις αρθρώσεις αποτελούν επιπλέον επιβαρυντικούς παράγοντες για την εμφάνιση της ΟΑ, εκτιμάται ότι σε παγκόσμιο επίπεδο περίπου 250 εκατομμύρια άτομα πάσχουν από ΟΑ³. Στο πλαίσιο αυτό, το γεγονός ότι η διαθέσιμη φαρμακευτική θεραπευτική αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας δεν εμφανίζει τη μέγιστη αποτελεσματικότητα, καθιστά τη χειρουργική επέμβαση σε πολλές περιπτώσεις τη μοναδική δυνατότητα για τη βελτίωση της κλινικής εικόνας του ασθενούς.

Η οστεοαρθρίτιδα είναι μια χρόνια νόσος, η οποία εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια. Ωστόσο, δεδομένης της αυξανόμενης ατομικής και κοινωνικής επιβάρυνσης που επιφέρει η νόσος, η προσέγγιση για τη διαχείρισή της θα πρέπει να στραφεί προς την εξατομικευμένη φροντίδα των ασθενών. Επομένως, είναι πολύ σημαντική η διερεύνηση γενετικής και της επιγενετικής της οστεοαρθρίτιδας με στόχο την ανάπτυξη νέων καινοτόμων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

A.1.2 Επιδημιολογία

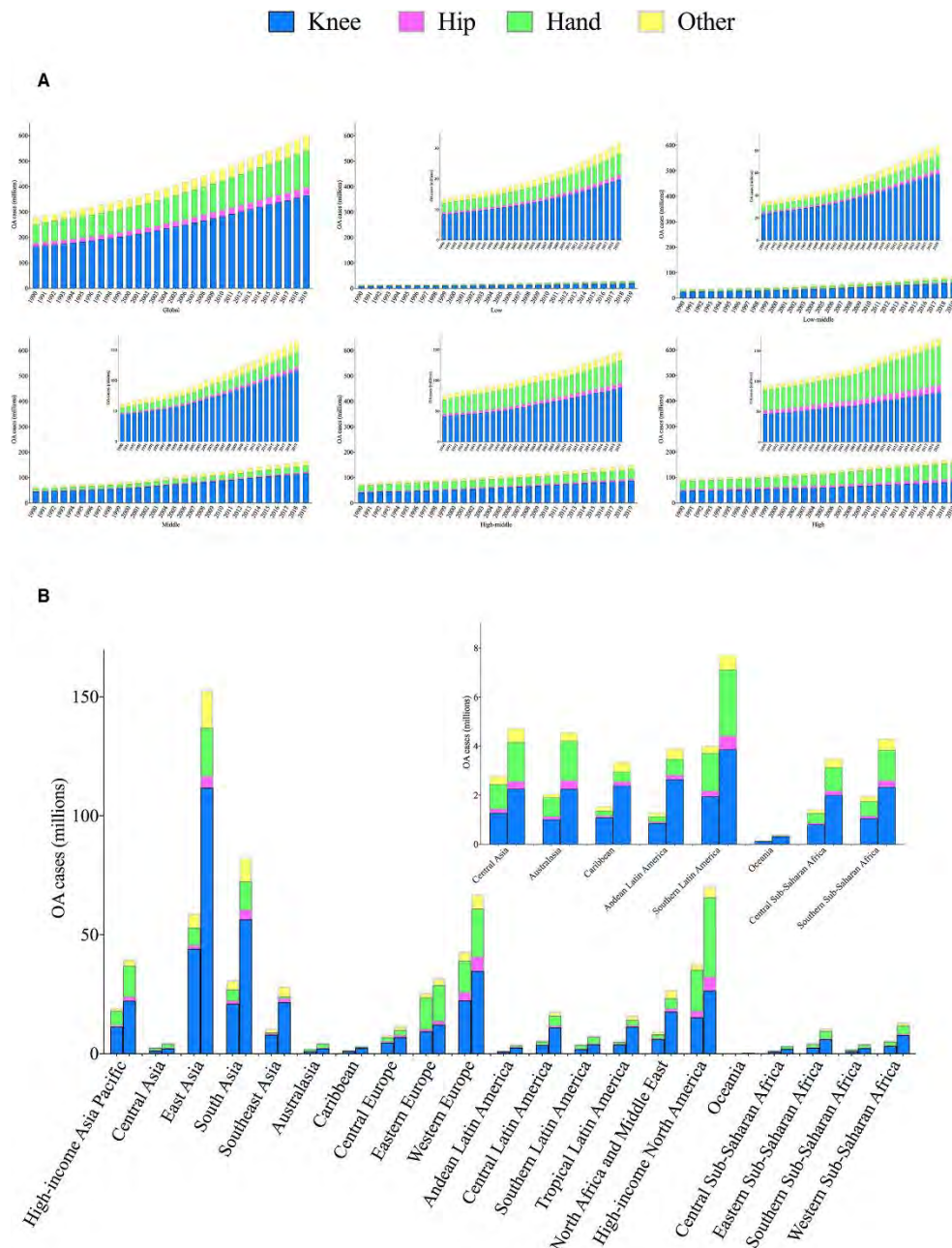
Η ΟΑ αποτελεί την πιο κοινή μορφή αρθρίτιδας σε όλο το κόσμο και μια από τις πιο συχνές ασθένειες που προκαλούν ανικανότητα στις αναπτυγμένες χώρες. Σύμφωνα με τις παγκόσμιες εκτιμήσεις το 9,6% των ανδρών και το 18,0% των γυναικών, άνω των 60 ετών

έχουν αναπτύξει συμπτωματική (επώδυνη) ΟΑ. Το 80% των ασθενών με ΟΑ εμφανίζουν προβλήματα κίνησης και το 25% δεν μπορεί να εκτελέσει τις κύριες καθημερινές δραστηριότητές του⁴. Η αύξηση του προσδόκιμου ζωής και η γήρανση του πληθυσμού έχουν καταστήσει την ΟΑ κύρια αιτία αναπηρίας σε ανθρώπους άνω των 65 ετών, η οποία και συνοδεύεται από συν-νοσηρότητες και μειωμένη ποιότητα ζωής.

Ο εκτιμώμενος επιπολασμός και η συχνότητα εμφάνισης της ΟΑ ποικίλλουν ανάλογα με το είδος της ΟΑ, το είδος των αρθρώσεων και τον πληθυσμό⁵⁻⁷. Σε παγκόσμιο επίπεδο, ο επιπολασμός της ΟΑ αυξήθηκε κατά 113,25%, από 247,51 εκατομμύρια το 1990 σε 527,81 εκατομμύρια το 2019 (Εικόνα 1) και η ΟΑ γόνατος εμφάνισε τη μεγαλύτερη συνολική επιβάρυνση⁸.

Στον Ελληνικό πληθυσμό βρέθηκε ότι ο συνολικός επιπολασμός της ΟΑ, άνω-κάτω άκρων και σπονδυλικής στήλης ανέρχεται στο 13,1%, σύμφωνα με μια επιδημιολογική έρευνα για τις ρευματικές ασθένειες που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα (μελέτη ESORDIG)⁹. Περίπου 27 εκατομμύρια ενήλικες στις ΗΠΑ και 8,5 εκατομμύρια ενήλικες στο Ηνωμένο Βασίλειο εκτιμάται ότι έχουν διαγνωστεί με ΟΑ, βάσει συμπτωμάτων και κλινικών ευρημάτων^{10,11}. Σε μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες, η ΟΑ συχνά καθορίζεται με βάση τον ακτινογραφικό έλεγχο, με το σύστημα Kellgren-Lawrence. Για παράδειγμα, ο επιπολασμός της ΟΑ γόνατος βάσει των ακτινογραφικών εκτιμήσεων, ήταν 19% και 28%, για τους ενήλικες άνω των 45 ετών στη μελέτη Framingham και στο Πρόγραμμα Οστεοαρθρίτιδας Johnston County, αντίστοιχα, ενώ ο επιπολασμός της ΟΑ γόνατος βάσει συμπτωμάτων ήταν 7% στη μελέτη Framingham και 17% στο Πρόγραμμα Οστεοαρθρίτιδας Johnston County^{12,13}.

Η συχνότητα εμφάνισης της συμπτωματικής ΟΑ γόνατος, χεριού και ισχίου ήταν 6,0%, 2% και 0,9%, αντίστοιχα. Το γυναικείο φύλο και η ηλικία αποτελούν παράγοντες κινδύνου για όλα τα είδη της ΟΑ, ενώ η παχυσαρκία αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου για την ΟΑ γόνατος και ισχίου¹⁴. Σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα, υπάρχουν διαφορετικοί φαινότυποι οστεοαρθρίτιδας που αντικατοπτρίζουν διαφορετικούς μηχανισμούς της νόσου.



Εικόνα 1: Συνολικός αριθμός περιστατικών οστεοαρθρίτιδας (OA) και αριθμός περιστατικών OA σύμφωνα με την προσβεβλημένη άρθρωση, παγκοσμίως, κατά κατηγορία κοινωνικοδημογραφικού δείκτη (SDI) (χαμηλός, χαμηλός-μεσαίος, μεσαίος, υψηλός-μεσαίος και υψηλός) και ανά γεωγραφική περιοχή, και για τα δύο φύλα μαζί. Α, Αριθμός περιστατικών OA για κάθε έτος από το 1990 έως το 2019, παγκοσμίως και ανά κατηγορία SDI. Β, Αριθμός περιστατικών OA το 1990 και το 2019 σε 21 αναφερόμενες γεωγραφικές περιοχές. Για κάθε περιοχή, η αριστερή στήλη εμφανίζει δεδομένα για το 1990 και η δεξιά στήλη εμφανίζει δεδομένα για το 2019 ⁸.

A.1.3 Κοινωνικο-δημογραφικά χαρακτηριστικά και παράγοντες κινδύνου

Στην Οστεοαρθρίτιδα, αναγνωρίζονται διάφοροι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την ανάπτυξη ή/και την εξέλιξη της νόσου τόσο σε συστημικό επίπεδο όσο και τοπικό

εμβιομηχανικό επίπεδο. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ορίζει ως παράγοντα κινδύνου οποιοδήποτε χαρακτηριστικό αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης μιας ασθένειας¹⁵.

Σε συστημικό επίπεδο, στους παράγοντες κινδύνου συμπεριλαμβάνονται τα κοινωνικο-δημογραφικά χαρακτηριστικά (π.χ. γυναικείο φύλο, φυλή), η γενετική προδιάθεση, η παχυσαρκία, οι παράγοντες που σχετίζονται με τη διατροφή και η υψηλή οστική πυκνότητα. Παράλληλα, οι παράγοντες κινδύνου που αναγνωρίζονται σε τοπικό εμβιομηχανικό επίπεδο περιλαμβάνουν το σχήμα οστών/αρθρώσεων, τη μυϊκή αδυναμία, τη δυσπλασία των αρθρώσεων, τη συμμετοχή σε ορισμένες επαγγελματικές/αθλητικές δραστηριότητες και τον τραυματισμό των αρθρώσεων¹⁶.

Η μεγάλη ηλικία είναι ένας κύριος παράγοντας κινδύνου για την ΟΑ^{7,17}. Σε σύγκριση με τους άνδρες, οι γυναίκες είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν οστεοαρθρίτιδα στο χέρι, στο πόδι και στο γόνατο, αλλά είναι λιγότερο πιθανό να αναπτύξουν ΟΑ της αυχενικής σπονδυλικής στήλης¹⁷. Μια μελέτη διαπίστωσε ότι τα χαμηλότερα επίπεδα ενδογενών ορμονών φύλου συσχετίστηκαν με αυξημένη εμφάνιση υμενίτιδας στο γόνατο μόνο σε γυναίκες και όχι σε άνδρες με ΟΑ¹⁸. Σε σχέση με άλλες φυλές, οι Αφροαμερικανοί έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν ΟΑ γόνατος και ισχίου^{6,19}, ενώ έχει δειχθεί ότι υπάρχουν φυλετικές/εθνικές διαφορές και στα ακτινογραφικά χαρακτηριστικά της ΟΑ¹⁹.

A.1.4 Ταξινόμηση

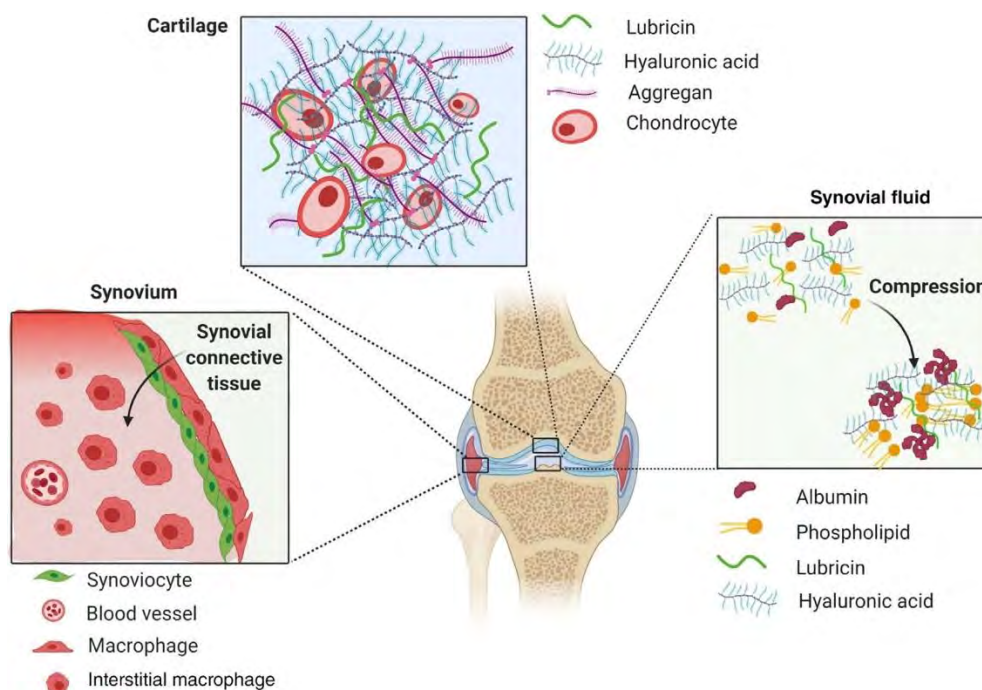
Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο τύπους με βάση τις υποκείμενες αιτίες της: πρωτοπαθή και δευτεροπαθή²⁰. Η πρωτοπαθής ΟΑ, γνωστή και ως ιδιοπαθής ΟΑ, παρατηρείται συχνότερα σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας και είναι πιθανότατα αποτέλεσμα της γήρανσης, που οδηγεί στη σταδιακή φθορά των αρθρώσεων. Ωστόσο, η ακριβής αιτία εμφάνισής του παραμένει ασαφής.

Από την άλλη πλευρά, η δευτεροπαθής ΟΑ εμφανίζεται σε νεότερα άτομα και συνήθως οφείλεται σε συγκεκριμένη αιτία. Συχνά προκύπτει ως συνέπεια τραυματισμών των αρθρώσεων, των ανωμαλιών στη δομή του μυοσκελετικού συστήματος, φλεγμονωδών καταστάσεων ή μεταβολικών διαταραχών²¹.

A.1.6 Η ΟΑ προσβάλλει ολόκληρη την άρθρωση -Παθογένεια της ΟΑ.

Η άρθρωση είναι μια σύνθετη δομή που αποτελείται από τον αρθρικό χόνδρο, το υποχόνδριο οστό, τον αρθρικό υμένα, το αρθρικό υγρό και τους συνδετικούς ιστούς. Τα χονδροκύτταρα είναι ο μοναδικός κυτταρικός τύπος του αρθρικού χόνδρου και χαρακτηρίζεται από την απουσία αιμοφόρων αγγείων και νεύρων. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ο αρθρικός υμένας αποτελείται από ένα στρώμα κυττάρων με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μακροφάγων και ινοβλαστών²². Το αρθρικό υγρό είναι υπεύθυνο για την

διατήρηση και τη λίπανση του αρθρικού χόνδρου. Το υποχόνδριο οστό προσαρμόζει την δομή και την αρχιτεκτονική του ως απόκριση στο εμβιομηχανικό περιβάλλον μέσω της αναδιαμόρφωσης του, η οποία ρυθμίζεται από τις αλληλεπιδράσεις με τους οστεοκλάστες και τους οστεοβλάστες²³ (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της άρθρωσης του γόνατος²⁴.

Μεταβολές στην ακεραιότητα των ιστών των αρθρώσεων μπορεί να προέρχονται είτε από τραυματισμό ή μέσω κυτταρικών παραγόντων ή παραγόντων της μήτρας που η αλληλεπίδραση τους έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της σύνθεσης, της δομής και των ιδιοτήτων των ιστών των αρθρώσεων. Αν και οι παθολογικές διεργασίες μπορούν να στοχεύουν σε έναν μόνο ιστό τελικά, όλοι οι ιστοί των αρθρώσεων επηρεάζονται λόγω της στενής φυσικής και λειτουργικής τους σχέσης. Η ΟΑ θεωρείται επομένως μια πάθηση ολόκληρης της άρθρωσης²⁵.

A.1.7.1 Αρθρικός χόνδρος

Ο φυσιολογικός χόνδρος αποτελείται από 70% νερό και συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, όπως κολλαγόνο τύπου II, αγκρεκάνες ή άλλες πρωτεογλυκάνες^{25,26,27}. Το δίκτυο του κολλαγόνου παρέχει αντοχή σε δυνάμεις εφελκυσμού και οι πρωτεογλυκάνες παρέχουν ανθεκτικότητα στις πιέσεις, παγιδεύοντας μεγάλες ποσότητες νερού μέσω των πλευρικών αλυσίδων τους, των γλυκοζαμινογλυκανών (GAG)^{28,29}. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, τα χονδροκύτταρα δεν εμφανίζουν μιτωτική δραστηριότητα και διατηρούν σταθερό το κολλαγόνο τους. Ως απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως στη μηχανική

φόρτιση, μια κύρια διεργασία που συμβαίνει στα χονδροκύτταρα είναι η αντικατάσταση των συστατικών των γλυκοζαμινογλυκανών (GAG), που εντοπίζονται σε μόρια αγγρεκάνης και σε μικρές πρωτεογλυκάνες. Ωστόσο, η ικανότητα των επιδιορθωτικών μηχανισμών των κυττάρων μειώνεται με την ηλικία και την ΟΑ³⁰. Τα χονδροκύτταρα περικλείονται από μια περικυτταρική μήτρα που αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου VI και άλλες πρωτεΐνες της μήτρας. Η μήτρα βοηθά στη διατήρηση των χονδροκυττάρων σε μια κατάσταση χαμηλής μεταβολικής δραστηριότητας^{31,32}. Διάφοροι ενδοκυτταρικοί παράγοντες, όπως ο HIF-1α (hypoxia-inducible factor 1α) απαιτούνται για τη διατήρηση της ομοιόστασης των χονδροκυττάρων και την προσαρμογή στο εμβιομηχανικό περιβάλλον³³. Επιπλέον, πρωτογενείς βλεφαρίδες που βρίσκονται στην επιφάνεια των χονδροκυττάρων και άλλοι ευαίσθητοι μηχανοϋποδοχείς επιτρέπουν στα χονδροκύτταρα να προσαρμόσουν τη μεταβολική τους δραστηριότητα, ως απόκριση στις φυσικές δυνάμεις^{34,35}.

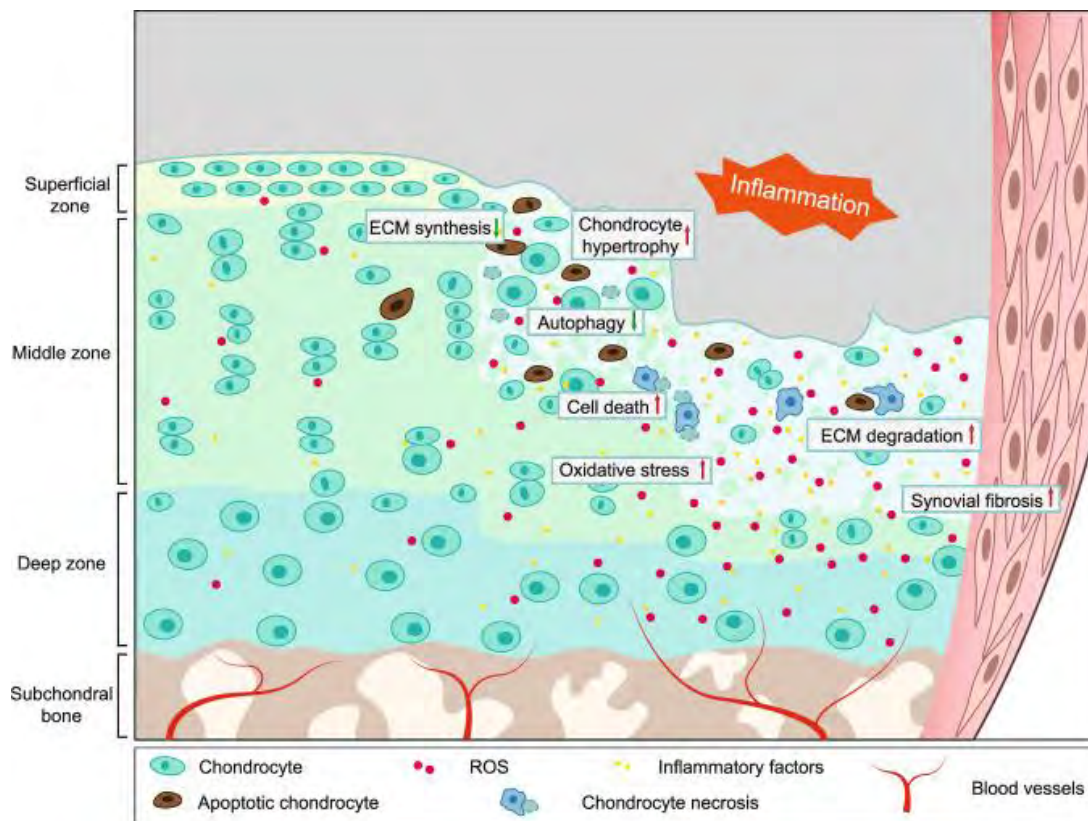
Κατά την εξέλιξη της ΟΑ, ο αρθρικός χόνδρος υφίσταται εντυπωσιακές αλλαγές στη σύνθεση και τη δομή του. Αρχικά, εμφανίζονται επιφανειακές βλάβες που καθώς εξελίσσεται η παθολογική κατάσταση, οδηγούν τελικά σε ολική καταστροφή του χόνδρου. Αυτές οι αλλαγές συνοδεύονται από επέκταση της ζώνης του ασβεστοποιημένου χόνδρου και αντικατάσταση του υποκείμενου αρθρικού χόνδρου³⁶⁻³⁸. Αυτή η διαδικασία σχετίζεται με το διπλασιασμό της ζώνης μετάβασης (tidemark), που είναι μια ιστολογικά καθορισμένη ζώνη που διαχωρίζει τον ασβεστοποιημένο αρθρικό χόνδρο από το υποχόνδριο οστό. Κοντά στην άρθρωση, τα αγγειακά στοιχεία από το χώρο του μυελού διεισδύουν στο υποχόνδριο οστό και στον ασβεστοποιημένο χόνδρο μαζί με αισθητήρια και συμπαθητικά νεύρα³⁸. Γύρω από αυτά τα κανάλια, σχηματίζεται νέο οστό, με τη διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης^{39,40}. Στα αρχικά στάδια της ΟΑ, τα χονδροκύτταρα εμφανίζουν αυξημένη συνθετική δραστηριότητα, προσπαθώντας να επιδιορθώσουν τις βλάβες⁴¹. Ένα πρώιμο συμβάν είναι η διάσπαση του εξωκυττάρου πλέγματος των χονδροκυττάρων που εκθέτει τα κύτταρα σε συστατικά της περιφερειακής μήτρας, η οποία απορρυθμίζει τη λειτουργία των χονδροκυττάρων μέσω υποδοχέων κυτταρικής επιφάνειας³².

Καθώς η ασθένεια εξελίσσεται, οι πρωτεογλυκάνες αποικοδομούνται και το δίκτυο του κολλαγόνου καταστρέφεται, το οποίο σηματοδοτεί μια μη αναστρέψιμη εξέλιξη. Αυτό συνοδεύεται από την επαγωγή των αγγρεκανασών, οι οποίες περιλαμβάνουν μέλη της οικογένειας ντισιντεγκρινών και μεταλλοπρωτεϊνών με μοτίβα θρομβοσπονδίνης (ADAMTS), τα οποία διασπούν την πρωτεΐνη του πυρήνα αγγρεκανάση⁴², και πολλές μεταλλοπρωτεϊνάσες⁴³. Μια άλλη κατηγορία σημαντικών μορίων που εκφράζονται από τα ΟΑ χονδροκύτταρα είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs). Οι MMPs είναι μια ομάδα πρωτεασών που επάγουν την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας και είναι αυξημένες

στην ΟΑ. Η MMP-13 αποτελεί τη κύρια μεταλλοπρωτεϊνάση στο ΟΑ χόνδρο, η οποία ευθύνεται για τη διάσπαση του COL2A1 και κατ'επέκταση την αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου⁴⁴.

Η αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με φλεγμονώδεις και καταβολικές αποκρίσεις, πραγματοποιείται κυρίως μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν τον πυρηνικό παράγοντα-κΒ (NF-κΒ), τη MAPK, και άλλα μονοπάτια που προκαλούνται από φλεγμονή και stress^{45,46}. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι ο αυξημένος θάνατος των χονδροκυττάρων, οφείλεται, εν μέρει, σε μείωση της αυτοφαγίας. Σε κανονικές συνθήκες, η αυτοφαγία χρησιμεύει ως προστατευτικός μηχανισμός που χρησιμοποιείται από κύτταρα κάτω από συνθήκες stress^{47,48}. Πολλά από τα χονδροκύτταρα εμφανίζουν έναν εκκριτικό φαινότυπο που σχετίζεται με τη γήρανση, ο οποίος χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου, κυτοκινών, χημειοκινών και άλλων προφλεγμονωδών προϊόντων⁴⁹.

Κατά τα τελευταία στάδια της ΟΑ, πολλά από τα χονδροκύτταρα δείχνουν αυξημένη έκφραση γονιδίων και παραγωγής πρωτεϊνών που σχετίζονται με υπερτροφία⁵⁰. Οι αγγειογενείς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα, επάγονται στα χονδροκύτταρα και συμμετέχουν στην αγγειακή διήθηση και την ασβεστοποίηση του χόνδρου^{40,51}. Μεταβολές στη σύνθεση του χόνδρου προκαλούν σημαντικές αλλαγές στις ιδιότητες των υλικών και αυξάνουν την ευαισθησία του χόνδρου στην επίδραση μηχανικών δυνάμεων^{52,53}. Επιπλέον, τα προϊόντα αποικοδόμησης της μήτρας και οι προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές που παράγονται από τη καταβολική δραστηριότητα των χονδροκυττάρων δρουν με τρόπο αυτοκρινή ή παρακρινή για την περαιτέρω απορρύθμιση της λειτουργίας των χονδροκυττάρων και για να διεγείρουν πολλαπλασιαστικές και προφλεγμονώδεις αποκρίσεις στο παρακείμενο υμένα (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Ιστολογικά χαρακτηριστικά ΟΑ χόνδρου. Ο αρθρικός χόνδρος αποτελείται από μια πυκνή εξωκυττάρια μήτρα (ECM) και αραιή κατανομή χονδροκυττάρων. Ο αρθρικός χόνδρος μπορεί να διαχωριστεί στην επιφανειακή ζώνη, στη μέση ζώνη και στη βαθιά ζώνη (το κάτω μέρος είναι ασβεστοποιημένο). Τα χονδροκύτταρα και η ECM στον ΟΑ χόνδρο παρουσιάζουν εκτεταμένες αλλαγές. Η κυτταρική απόπτωση αυξάνεται στα ΟΑ χονδροκύτταρα σε συνδυασμό με αναστολή της σύνθεσης και ενισχυμένη αποικοδόμηση της ECM. Φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως ο TNFα που εκκρίνονται από τα χονδροκύτταρα και τους ινοβλάστες της αρθρικής μεμβράνης, και διεγείρουν τη φλεγμονή σε ολόκληρη την άρθρωση. Υμενική υπερπλασία, ίνωση και μη φυσιολογική εισβολή αιμοφόρων αγγείων από το υποχόνδριο οστό, αυξημένη υπερτροφία χονδροκυττάρων και οξειδωτικό στρες με υπερβολική παραγωγή ROS παρατηρούνται επίσης, στην ΟΑ άρθρωση ⁵⁴.

A.1.7.2 Υποχόνδριο οστό

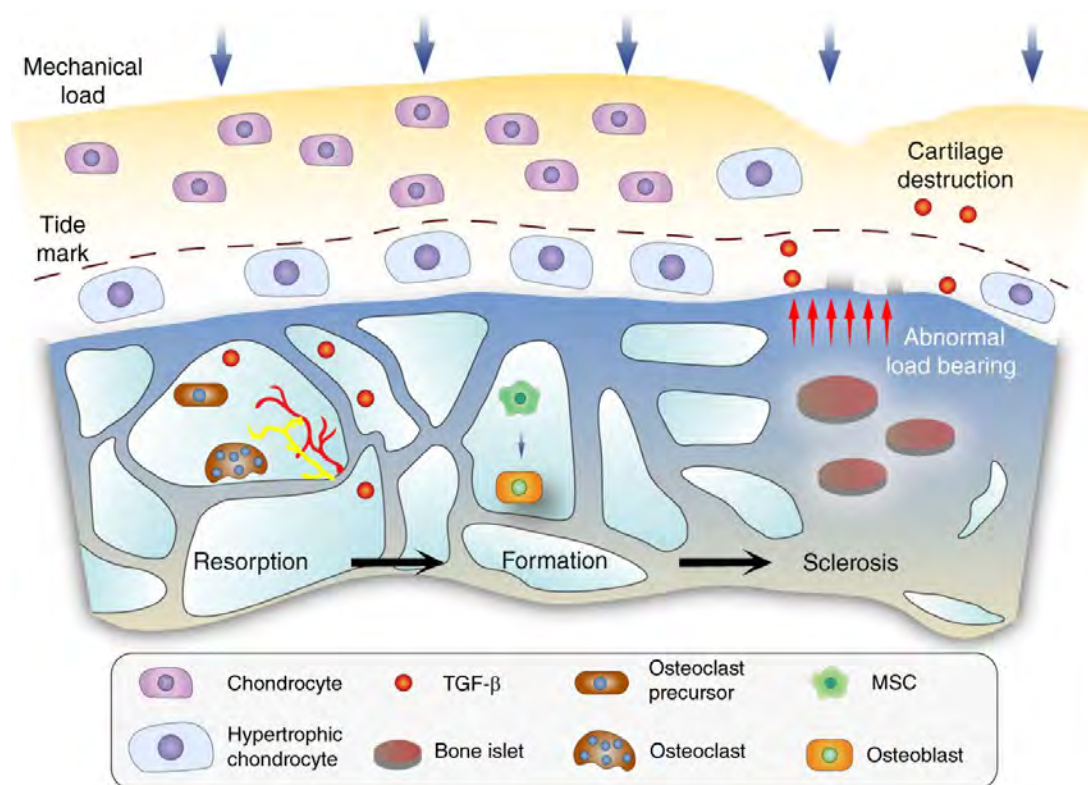
Η δομή και η σύνθεση των οστών προσαρμόζεται καθ' όλη τη διάρκεια ζωής ενός ατόμου μέσω διεργασιών και με τη μεσολάβηση κυττάρων όπως οι οστεοβλάστες, οι οποίοι συνθέτουν νέο οστό και οι οστεοκλάστες, οι οποίοι απορροφούν τα οστά ως απόκριση τοπικών εμβιομηχανικών παραγόντων, ορμονών και τοπικών διαλυτών διαμεσολαβητών. Το υποχόνδριο οστό οργανώνεται σε στρώμα φλοιώδους οστού που μοιάζει με πλάκα και σε μια γειτονική περιοχή σπογγώδες οστού^{36,55,56}.

Η εμφάνιση της ΟΑ συνοδεύεται από αυξήσεις στον όγκο, στο πάχος και στο περίγραμμα της φλοιώδους πλάκας, μεταβολές στην κατάσταση της μεταλλοποίησης των οστών και των ιδιοτήτων του υλικού, αλλαγές στην αρχιτεκτονική του υποχόνδριου οστού και της οστικής μάζας, το σχηματισμό κύστεων, μη φυσιολογική εισβολή αιμοφόρων αγγείων και εμφάνιση βλαβών του μυελού των οστών και οστεοφύτα^{55,57,58-61}. Αυτές οι αλλαγές προκαλούνται από μεταβολές στη δραστηριότητα των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών^{36,55,58} (Εικόνα 4).

Πολυάριθμες μελέτες αναφέρουν ότι η υποχόνδρια σκλήρυνση των οστών θα μπορούσε να είναι ένας από τους κύριους λόγους που προκαλούν ΟΑ που σχετίζεται με τη γήρανση και ότι η μη φυσιολογική αναδιαμόρφωση των οστών που σχετίζεται με τη απορρύθμιση των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών παίζει βασικό ρόλο στην έναρξη και ανάπτυξη της ΟΑ^{37,58,59,62,63}. Το οστό μπορεί επίσης να υποστεί άμεση φυσική βλάβη που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ρωγμών εντός του φλοιού ή του σπογγώδους οστού και αυτή η διαδικασία ενισχύεται στην ΟΑ που σχετίζεται με τις δυσμενείς επιπτώσεις της αυξημένης μηχανικής φόρτωσης^{55,57}.

Η σταδιακή πάχυνση της υποχόνδριας πλάκας, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της προχωρημένης ΟΑ, αντικατοπτρίζει την επίδραση των αλλαγών της μηχανικής φόρτισης στις βλάβες του χόνδρου και στις αλλαγές των ιδιοτήτων του υποχόνδριου οστού. Είναι σημαντικό ότι υπάρχει μια στενή ανατομική σχέση μεταξύ αυτών των αλλαγών των οστών και της ανάπτυξης τοπικής παθολογίας χόνδρου ΟΑ⁵⁷, που δείχνει ότι και οι δύο ιστοί ανταποκρίνονται στις δυσμενείς επιπτώσεις της μηχανικής φόρτωσης⁶⁴⁻⁶⁶. Οι Radin και Rose⁶⁷ πρότειναν τη δεκαετία του 1980 ότι η αυξημένη δυσκαμψία του υποχόνδριου οστού έχει δυσμενείς επιπτώσεις στον υποκείμενο χόνδρο και συμβάλλει στην ανάπτυξη ΟΑ παθολογίας στον χόνδρο. Ωστόσο, μελέτες από τους Day et al στη δεκαετία του 2000 αμφισβήτησαν την ιδέα των Radin and Rose, καθώς διαπίστωσαν ότι, αν και ο όγκος του υποχόνδριου οστού αυξήθηκε, η δυσκαμψία των οστών μειώθηκε λόγω της μείωσης της οστικής πυκνότητας^{68,69}. Επίσης, υποστήριξαν ότι η μείωση της δυσκαμψίας του οστού μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη παραμόρφωση του χόνδρου κατά τη φόρτωση, συμβάλλοντας άμεσα στην ανάπτυξη της παθολογίας της ΟΑ στο χόνδρο. Αυτές οι μελέτες υποστηρίζουν την αντίληψη ότι οι μεταβολές στις ιδιότητες των υποχόνδριων οστών επηρεάζουν την κατάσταση του υποκείμενου αρθρικού χόνδρου, αλλά δείχνουν την πολυπλοκότητα αυτής της σχέσης, η οποία εξελίσσεται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της ΟΑ. Οι κύστες των υποχόνδριων οστών είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό της προχωρημένης ΟΑ. Οι παρατηρήσεις ότι οι κύστες τείνουν να αναπτύσσονται σε τοποθεσίες προϋπάρχουσας βλάβης του μυελού των οστών οδήγησαν στην ιδέα ότι δημιουργούνται

απευθείας εντός του υποχόνδριου οστού και ότι η οστική βλάβη και η νέκρωση ξεκινούν τη διαδικασία της οστικής απορρόφησης που προκαλείται από οστεοκλάστες που οδηγεί στο σχηματισμό κυστών⁷⁰. Τα οστεόφυτα είναι οστικές εκφύσεις που εντοπίζονται μέσα στην άρθρωση. Οι κύστες των οστών σχηματίζονται κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση, η οποία είναι μια διαδικασία σχηματισμού οστών που ξεκινά με το σχηματισμό του χόνδρου⁷¹.



Εικόνα 4: Σχηματικό διάγραμμα υποχόνδριου οστού που ανταποκρίνεται σε μη φυσιολογική μηχανική φόρτιση και επακόλουθη καταστροφή του χόνδρου. Σε αρχικό στάδιο της ΟΑ του γόνατος, η οστική απορρόφηση υπερενεργοποιείται. Βιολογικοί παράγοντες, όπως ο TGF-β, ενορχηστρώνουν τη στρατολόγηση των MSCs και τον σχηματισμό οστών, μαζί με τη δημιουργία αγγείων και νευρικών ινών. Η οστεοσκλήρυνση και οι νησίδες των οστών μπορούν να παρατηρηθούν σε προχωρημένα στάδια, τα οποία συνεισφέρουν στον εκφυλισμό του χόνδρου⁵⁹.

A.1.7.3 Αρθρικός θύλακας και φλεγμονή

Ο αρθρικός θύλακας περιλαμβάνει τον αρθρικό υμένα και το αρθρικό υγρό. Ο αρθρικός υμένας είναι ένα λεπτό κυτταρικό στρώμα που περιβάλλει την κοιλότητα της άρθρωσης, η οποία δρα ως ημιδιαπερατή μεμβράνη για τη ρύθμιση της μεταφοράς μορίων μέσα και έξω από την άρθρωση. Είναι μια σημαντική πηγή των συστατικών του αρθρικού υγρού, συμπεριλαμβανομένων των θρεπτικών ουσιών και των λιπαντικών παραγόντων, όπως η λουμπρικήνη και το υαλουρονικό οξύ. Οι λιπαντικοί παράγοντες συμβάλλουν στις μοναδικές ιδιότητες χαμηλής τριβής της αρθρικής επιφάνειας.

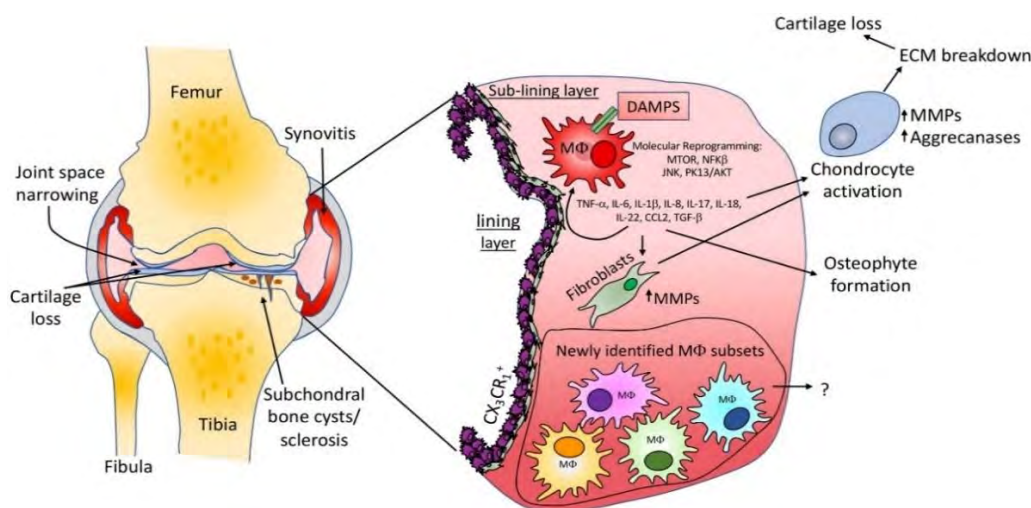
Ο αρθρικός υμένας εμφανίζει σημαντικές αλλαγές σε αρχικό στάδιο της ΟΑ, ακόμη και πριν από την αποικοδόμηση του χόνδρου^{60,72}. Στο αρχικό στάδιο της ΟΑ, ιστολογικές αλλαγές του αρθρικού υμένα περιλαμβάνουν υπερτροφία του υμένα, αυξημένη αγγειογένεση, χαμηλό επίπεδο φλεγμονής και ίνωση⁷³⁻⁷⁶. Η υμενίτιδα (φλεγμονή του υμένα), η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα μακροφάγων εντοπίζεται σε τελικό στάδιο της ΟΑ⁷⁷. Ήπια αρθρική φλεγμονή μπορεί να ανιχνευθεί σε >50% των ασθενών με ΟΑ τόσο σε πρώιμα όσο και σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου^{78,79}.

Τα μη λειτουργικά χονδροκύτταρα και η βλάβη του χόνδρου διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη αρθρικής φλεγμονής. Οι πρωτεΐνες που απελευθερώνονται από τα χονδροκύτταρα οδηγούν στη δημιουργία των προϊόντων αποικοδόμησης του προ-φλεγμονώδους χόνδρου, που ονομάζονται DAMPS (Damage-Associated Molecular Patterns), και αλληλεπιδρούν με τους TLRs (Toll-like receptors), τις ιντεγκρίνες και τα RAGE, τα οποία εκφράζονται στα χονδροκύτταρα προκειμένου να αυξήσουν την παραγωγή των φλεγμονωδών και των καταβολικών προϊόντων^{1,48,73,80}. Τα DAMPs απελευθερώνονται επίσης στο αρθρικό υγρό όπου δρουν στο παρακείμενο αρθρικό υμένα για να προκαλέσουν φλεγμονή που με τη σειρά της δημιουργεί πρόσθετα προ-φλεγμονώδη και καταβολικά προϊόντα που επιδρούν στα χονδροκύτταρα και απορρυθμίζουν περαιτέρω τη λειτουργία τους.

Επιπλέον, αρκετές προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες μπορούν να ανιχνευθούν στο αρθρικό υγρό, στον αρθρικό χόνδρο και στον υμένα σε ασθενείς με ΟΑ, ενώ απουσιάζουν από υγιή άτομα^{96,99}. Η IL-1 (ιντερλευκίνη -1) και ο TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκων) είναι ισχυροί ρυθμιστές των καταβολικών διεργασιών στα χονδροκύτταρα και στα κύτταρα του αρθρικού υμένα. Ειδικότερα, ο TNF-α επάγει την παραγωγή των iNOS, COX-2, IL-6 και PGE2^{100,101} και αναστέλλει τη σύνθεση του κολλαγόνου τύπου II, των πρωτεογλυκανών και των πρωτεϊνών που δεσμεύουν τις πρωτεογλυκάνες^{101,102}.

Ο πιο άφθονος τύπος κυττάρων του ανοσοποιητικού στον αρθρικό υμένα σε άτομα με ΟΑ είναι τα μακροφάγα. Ενεργοποιημένα από παράγοντες όπως IFN-γ, TNF-α και LPS, τα μακροφάγα M1 εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και χαμηλά επίπεδα IL-10. Τα μακροφάγα M2 εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και διαθέτουν λειτουργίες αποκατάστασης ιστών⁸¹. Υψηλά επίπεδα μακροφάγων ανιχνεύονται σε ασθενείς με ΟΑ σε σύγκριση με υγιή άτομα και οι ποσότητες ενεργοποιημένων μακροφάγων συσχετίζονται με κλινικά συμπτώματα^{82,83}. Επιπλέον, αύξηση στα επίπεδα άλλων μορίων που σχετίζονται με τα μακροφάγα (sCD163 και sCD14) και στα χημειοελκτικά, όπως τα CCL2 και CX3CL1 στο αρθρικό υγρό ασθενών με ΟΑ έχουν συσχετιστεί με την κλινική έκβαση της ΟΑ^{84,85}. Θεωρείται ότι τα αρθρικά μακροφάγα ανταποκρίνονται σε μοριακά σχετιζόμενα μοτίβα

που σχετίζονται με τον κίνδυνο, συμπεριλαμβανομένων θραυσμάτων χόνδρου και ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών από νεκρωτικά κύτταρα, συμβάλλοντας κατά συνέπεια στη βλάβη του χόνδρου και τις αλλοιώσεις των οστών μέσω της απελευθέρωσης κυτοκινών όπως IL-1 β , TNF- α και TGF- β (Εικόνα 5). Σε αυτό το πλαίσιο, *in vitro* μελέτες έχουν τονίσει ότι η μείωση των μακροφάγων CD14 $^{+}$ από καλλιέργειες αρθρικών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των ενζύμων IL-1 β , TNF- α , MMPs και αγγρεκανάση που είναι ικανά να αποικοδομούν τον χόνδρο της άρθρωσης⁸⁶. Πρόσφατη μελέτη που διερεύνησε τα μακροφάγα μεταξύ OA και φυσιολογικής άρθρωσης οδήγησε στην ταυτοποίηση πολλαπλών υποομάδων αρθρικών μακροφάγων στην ίδια άρθρωση⁸⁷. Ωστόσο, οι αλληλεπιδράσεις των διαφορετικών τύπων κυττάρων στην άρθρωση και ο ρόλος του αρθρικού υμένα σε διάφορα στάδια της OA πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.



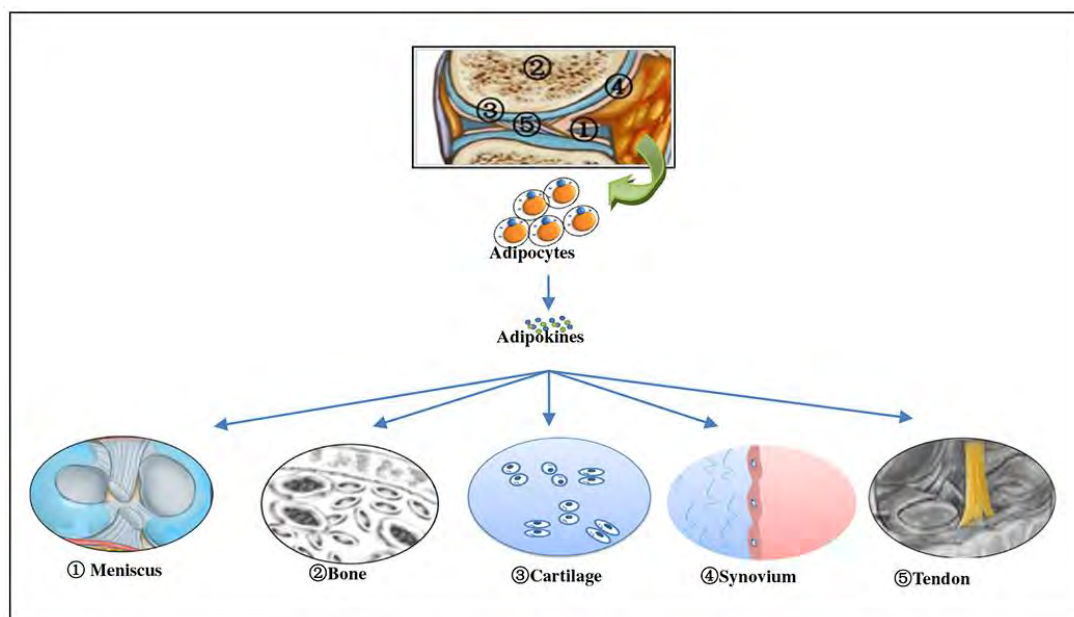
Εικόνα 5: Τα μακροφάγα στον αρθρικό υμένα συνεισφέρουν στην παθολογία της OA μέσω της απελευθέρωσης φλεγμονωδών μορίων τα οποία είναι ικανά να διεγείρουν πληθυσμούς ινοβλαστών για να παράγουν ένζυμα αποικοδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας του χόνδρου. Τα φλεγμονώδη μόρια είναι επίσης ικανά να ενεργοποιήσουν τα χονδροκύτταρα, προάγοντας έναν μη φυσιολογικό μοριακό και κυτταρικό φαινότυπο, το οποίο οδηγεί στην προοδευτική απώλεια του χόνδρου⁷⁷.

A.1.7.4 Παχυσαρκία και λιποκίνες

Η παχυσαρκία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την OA, εν μέρει μέσω της φόρτισης λόγω του αυξημένου σωματικού βάρους⁸⁸. Επιπλέον, η παχυσαρκία προκαλεί μεταβολική φλεγμονή, στην οποία διάφορες λιποκίνες που απελευθερώνονται από λιπώδεις ιστούς επάγουν τη παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από τον αρθρικό υμένα και τα χονδροκύτταρα, οδηγώντας τελικά σε βλάβη της μήτρας του χόνδρου και στην αναδιαμόρφωση του υποχόνδριου οστού⁸⁹, συνεισφέροντας στην παθογένεια της OA⁹⁰⁻⁹². Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται και από μελέτες ασθενών με OA, στις οποίες τα αυξημένα

επίπεδα λιποκινών στον ορό, όπως η λεπτίνη και η αδιψίνη, σχετίζονται με μεγαλύτερη απώλεια χόνδρου και υψηλότερη συχνότητα ολικής αρθροπλαστικής γόνατος^{93,94}. Εκτός από αυτές τις συστηματικές δράσεις της παχυσαρκίας, έχουν παρατηρηθεί επίσης και τοπικές δράσεις⁹⁵. Σε ασθενείς με συμπτωματική ΟΑ γόνατος, η διατήρηση του μυϊκού τόνου σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο αντικατάστασης των αρθρώσεων του γόνατος⁹⁶.

Μοντέλο ποντικού διαγονιδιακής λιπιδικής δυστροφίας (LD), με φυσιολογικό σωματικό βάρος, χρησιμοποιήθηκε σε μια μελέτη για να αναδείξει τη συμβολή του λιπώδους ιστού στην έναρξη και στην ανάπτυξη της ΟΑ. Ποντίκια LD με πλήρη έλλειψη λιπώδους ιστού εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην μετατραυματική ή στην αυθόρμητη ΟΑ. Η ευαισθησία στη μετατραυματική ΟΑ αποκαταστάθηκε μετά την εμφύτευση εναποθέσεων λίπους στα ποντίκια LD, υποδεικνύοντας ότι ο λιπώδης ιστός και οι παράγοντες που απελευθερώνονται από αυτόν προάγουν την ΟΑ⁹⁷. Από την άλλη πλευρά, ο λιπώδης ιστός θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως καλή πηγή ετερογενών πληθυσμών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων λεμφοειδών, στρωματικών/βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από το λιπώδη ιστό και μυελοειδών κυττάρων, για τη θεραπεία της ΟΑ⁹⁸.



Εικόνα 6: Σηματοδότηση λιποκινών στην άρθρωση. Μέσα στην άρθρωση, οι εναποθέσεις λίπους βρίσκονται σε άμεση γειτνίαση με άλλους ιστούς της άρθρωσης, όπως ο μηνίσκος, τα οστά, ο χόνδρος, ο αρθρικός υμένας και ο τένοντας. Ο λιπώδης ιστός του γόνατος εκκρίνει λιποκίνες επηρεάζοντας έτσι βιοχημικά τους γειτονικούς ιστούς. Αφού διαπεράσουν την αρθρική μεμβράνη, οι λιποκίνες εντοπίζονται στο αρθρικό υγρό. Στη συνέχεια μέσω της πρόσδεσης στους ειδικούς υποδοχείς, οι λιποκίνες μπορούν να ρυθμίσουν τις κυτταρικές λειτουργίες διαφορετικών τύπων αρθρικών ιστών,

συμπεριλαμβανομένου του μηνίσκου, των οστών, του χόνδρου, του αρθρικού υμένα και του τένοντα⁹².

A.1.8 Γενετική Προδιάθεση στην Οστεοαρθρίτιδα

Η Οστεοαρθρίτιδα είναι πολυπαραγοντικό νόσημα. Ανάμεσα στους παράγοντες κινδύνου για την ΟΑ, σημαντική θέση καταλαμβάνει η γενετική προδιάθεση. Η κληρονομικότητα της ΟΑ έχει βρεθεί ότι κυμαίνεται σε 40%-65%, και διαφέρει ανάλογα με το φύλο, την προσβεβλημένη άρθρωση και τη σοβαρότητα της νόσου^{99,100}. Οι Magnusson et al. χρησιμοποίησαν το μεγαλύτερο μητρώο διδύμων στον κόσμο για την εκτίμηση της γενετικής συμβολής του φύλου, σε άτομα με ΟΑ γόνατος που υπεβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση. Διαπίστωσαν ότι η συνολική κληρονομικότητα ήταν 53%, αλλά αυτό το ποσοστό ήταν υψηλότερο στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες. Οι άνδρες είχαν σχετικά χαμηλή γενετική συμβολή που ποικίλλει ανάλογα με το δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ) και την ηλικία¹⁰¹.

Την τελευταία δεκαετία, τα προγράμματα Human Genome και HarMap έχουν φέρει επανάσταση στην σύνθετη γενετική διερεύνηση των ασθενειών. Η προσέγγιση αυτή όπου διερευνώνται κοινές παραλλαγές (variations) σε ολόκληρο το γονιδίωμα, οδήγησε στην αναγνώριση πολλών νέων συσχετίσεων σε αρκετές πολύπλοκες ασθένειες και χαρακτηριστικά¹⁰². Οι πιο πρόσφατες μελέτες συνδυάζουν γενετικά δεδομένα μαζί με μεταγραφικά, πρωτεωμικά και επιγενωμικά δεδομένα.

Μέχρι τώρα, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σύνδεσης ολόκληρου του γονιδιώματος (genome-wide linkage studies-GWAS), όπου έχουν μελετηθεί εκατομμύρια αλληλόμορφα, και ιδιαιτέρως μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs), σε μεγάλους πληθυσμούς. Οι μελέτες GWAS στην ΟΑ ανέδειξαν πολύ σημαντικά αποτελέσματα. Αρκετοί γενετικοί τόποι έχουν έως σήμερα προσδιοριστεί στην ΟΑ αλλά η συνεισφορά τους στο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου είναι ακόμα υπό διερεύνηση¹⁰³⁻¹⁰⁸. Το γονίδιο του αυξητικού παράγοντα ανάπτυξης 5 (*GDF5*) εμφάνισε ισχυρή και επαναλαμβανόμενη συσχέτιση με την εμφάνιση της ΟΑ^{103,109-112}. Ο *GDF5*, είναι μέλος της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα TGF-β. Ο πολυμορφισμός rs143383 εντοπίζεται στην 5' UTR του *GDF5* και ευθύνεται για τη διαφοροποιημένη έκφραση του γονιδίου¹¹³. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα, υποδεικνύουν ότι ο γενετικός τόπος του *GDF5* συμβάλλει στο κίνδυνο εμφάνισης της ΟΑ μέσω του ελέγχου της έκφρασης του αυξητικού παράγοντα¹¹⁴. Σύμφωνα με μελέτη, ο πολυμορφισμός rs6060369 του *GDF5*, επηρεάζει το σχήμα του άρθρωσης του γονάτου και την εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας¹¹⁵.

Ανάμεσα στις μελέτες GWAS, σε μια μελέτη που περιλάμβανε ολόκληρη τη βιοτράπεζα του Ηνωμένου Βασιλείου, με 77.000 ασθενείς και 37.8000 άτομα χωρίς ΟΑ, ανακαλύφθηκαν 52 νέες συσχετίσεις γενετικών τόπων που προδιαθέτουν για ΟΑ¹⁰⁴. Μια άλλη GWAS μελέτη (arcOGEN Consortium), η οποία περιλαμβάνει δείγματα ατόμων από το Ηνωμένο Βασίλειο, ανέδειξε πολλαπλά αλληλόμορφα που συμβάλλουν με μικρή επίδραση στην εμφάνιση της ΟΑ¹¹⁶. Σε μια ολοκληρωμένη GWAS μελέτη που περιλάμβανε μια κοορτή 8.700 ατόμων με ΟΑ χεριού, το rs10916199 ήταν ο πιο σημαντικός γενετικός τόπος που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 κοντά στα γονίδια *ZNF678*, *WNT3A* και *WNT9A*. Περαιτέρω λειτουργική μελέτη σε ΟΑ ιστό, ανέδειξε έναν πιθανό λειτουργικό πολυμορφισμό rs1158850, ο οποίος εντοπίζεται σε ρυθμιστική περιοχή, που μέσω βρόγχου αλληλεπιδρά με τον υποκινητή του *WNT9A* και ρυθμίζει την έκφραση του¹¹⁷.

Η σημασία των μεγάλων μεγεθών κοόρτης και των ομοιόμορφων χαρακτηριστικών για την γενετική μελέτη περίπλοκων ασθενειών απεικονίζεται ξεκάθαρα σε μια ολοκληρωμένη αξιολόγηση των παραγόντων κινδύνου της ΟΑ, που περιλαμβάνεται σε μια πρόσφατη δημοσίευση. Αυτή η μετα-ανάλυση των δεδομένων GWAS αποτελούνταν από 177.517 ασθενείς με ΟΑ και 649.173 φυσιολογικά άτομα, από 9 πληθυσμούς. Περιείχε 11 ενδοφαινότυπους ΟΑ γόνατος, ισχίου, χεριού και σπονδυλικής στήλης. Από ένα σύνολο 13 συνδυασμένων κοορτών, 11 ήταν ευρωπαϊκής καταγωγής και 2 ήταν από την Ανατολική Ασία. Εντοπίστηκαν 100 πολυμορφισμοί, εκ των οποίων 60 συσχετίστηκαν με παραπάνω από έναν ενδοφαινότυπους και 52 νέοι πολυμορφισμοί που δεν είχαν αναφερθεί στο παρελθόν. Ανάμεσα τους, οι γενετικοί τόποι rs3771501 (*TGFA*), rs3993110 (*TEAD1/DKK3*), rs72979233 (*CHRD12*), και rs7967762 (*PFKM/WNT10B*), οι οποίοι ενέχονται στη σηματοδότηση των μονοπατιών TGFβ και Wnt και συμβάλλουν στη παθολογία της ΟΑ¹¹⁸.

Η επαλήθευση των γενετικών συσχετίσεων και των-ωμικών δεδομένων με περαιτέρω λειτουργικές μελέτες είναι απαραίτητες για τη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα συνδεδεμένα αλληλόμορφα ρυθμίζουν τα γονίδια ή τη λειτουργία των πρωτεϊνών. Μη φυσιολογική λειτουργία των παραπάνω μορίων λόγω των λειτουργικών πολυμορφισμών που φέρουν, συμβάλλει ενδεχομένως στην αλλαγή της λειτουργικότητας των κυττάρων μέσω της τροποποιημένης έκφρασης γονιδίων που συνεισφέρουν στον ΟΑ φαινότυπο.

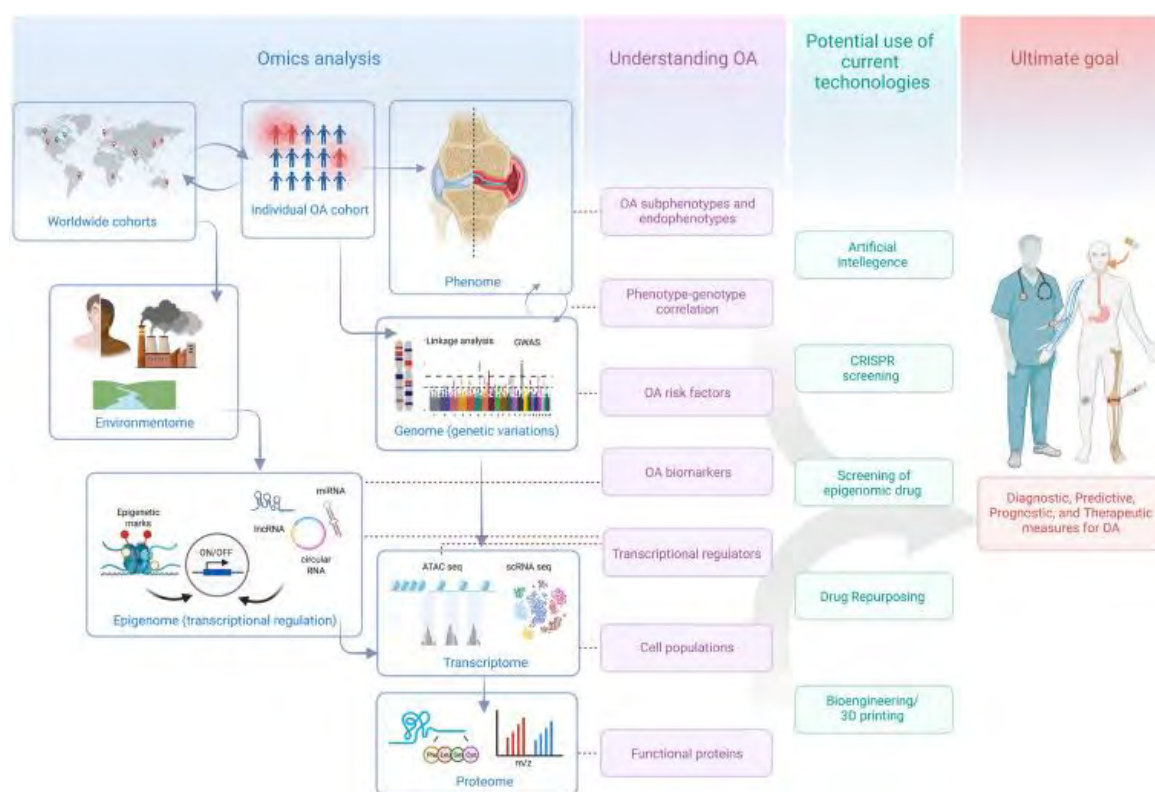
Στο πλαίσιο αυτό, υπάρχουν αρκετές πρόσφατες λειτουργικές μελέτες για τα αλληλόμορφα κινδύνου της ΟΑ. Πρόσφατα, οι Klein et al, πραγματοποίησαν λειτουργικό έλεγχο 1.605 πολυμορφισμών ενός μόνου νουκλεοτιδίου (SNP), οι οποίοι σχετίζονται με την ΟΑ. Ο σημαντικότερος πολυμορφισμός rs473022, εμπίπτει σε ένα εναλλακτικό σημείο έναρξης του γονιδίου *HBP1*. Αυτή η εναλλακτική μορφή της πρωτεΐνης, υποδεικνύει μια

διαφορετική πρόσδεση πυρηνικών πρωτεϊνών και αυξημένη έκφραση της εναλλακτικής ισομορφής του σε πολλαπλές κυτταρικές σειρές. Καθώς, το HBP1 είναι ένας μεταγραφικός καταστολέας του WNT, αυτή η ισομορφή θα μπορούσε να συμβάλει σε προδιάθεση των ατόμων για ανάπτυξη της ΟΑ¹¹⁹. Η συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου *IL1RN* (γονίδιο του ανταγωνιστή του υποδοχέα ιντερλευκίνης-1) με τη σοβαρότητα του φαινοτύπου της ΟΑ, περιγράφηκε σε μια μελέτη από τους Attur et al. Στη μελέτη αυτή δείχθηκε ότι ο απλότυπος *IL1RN* TTG (που προκύπτει από τρεις πολυμορφισμούς rs419598, rs315952, rs9005) σχετίζεται με μια σοβαρότερη μορφή της ΟΑ, η οποία εξαρτάται από την ηλικία, σύμφωνα με ακτινολογικά ευρήματα. Παράλληλα, τα επίπεδα της IL-1Ra στο πλάσμα ανευρέθηκαν χαμηλότερα στα άτομα της παραπάνω ομάδας και τα χονδροκύτταρα που προέρχονται από αυτά τα άτομα να εκκρίνουν λιγότερα μόρια IL-1Ra από ότι τα άτομα που δε φέρουν αντίγραφα των εν λόγω αλληλομόρφων¹²⁰.

Οι λειτουργικές μελέτες για την αξιολόγηση πιθανών γενετικών τρόπων αυξημένου κινδύνου, έχουν διευκολυνθεί λόγω της προσβασιμότητας σε αποτελεσματικά εργαλεία όπως η τεχνολογία CRISPR/Cas9. Οι Zao et al χρησιμοποίησαν αυτήν την τεχνολογία για τη διερεύνηση σημαντικών γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση της ΟΑ¹²¹. Ταυτόχρονη τροποποίηση των γονιδίων *NGF*, *IL-1β* και *MMP-13* οδήγησε σε μείωση του πόνου και της εξέλιξης της ΟΑ. Σύμφωνα με μια άλλη μελέτη, αποσιώπηση του γονιδίου *YAP* είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη κυτταρική γήρανση μέσω της μείωσης της ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου *FOXD1*. Παράλληλα, η γονιδιακή μεταφορά των *YAP* ή *FOXD1* μέσω ενδοαρθρικής έγχυσης μειώνει την εξέλιξη της ΟΑ σε ποντίκια¹²².

Όλες οι παραπάνω μελέτες αποτελούν παραδείγματα για την εξέλιξη της συστηματικής προσέγγισης για την εύρεση των γονιδίων που ενέχονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη της παθογένειας της ΟΑ. Αν και η βιολογική πολυπλοκότητα της ΟΑ είναι πολύ μεγάλη, η πρόοδος που σημειώνεται στη γενετική κατανόηση της νόσου προσδίδει τη δυνατότητα να επιταχυνθούν οι εξελίξεις στην ανάπτυξη προγνωστικών δεικτών και θεραπειών για την ΟΑ¹²³. Πράγματι, αρκετά φάρμακα τροποποίησης της οστεοαρθρίτιδας (disease modifying osteoarthritis drugs, DMOADs) που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές, συμπεριλαμβανομένων των ενδοαρθρικών θεραπειών με τους αυξητικούς παράγοντες TGF-β και FGF-18 και τους αναστολείς Wnt¹²⁴, στοχεύουν πρωτεΐνες των οποίων τα γονίδια έχουν αναδειχθεί να προδιαθέτουν σε εμφάνιση ΟΑ, από μελέτες GWAs^{103,104}. Καθώς, όλο και περισσότεροι γενετικοί τόποι αναδεικνύονται μέσω GWAS, ότι σχετίζονται με την εμφάνιση της ΟΑ, η πιθανότητα εμφάνισης μιας πολυπαραγοντικής ασθένειας ενός ατόμου θα μπορούσε να προβλεφθεί μελλοντικά με βάση τη συχνότητα και το μέγεθος επίδρασης των

Συνδυάζοντας τα δεδομένα που προκύπτουν από τις διαφορετικές μελέτες, είναι δυνατό να εντοπιστούν περαιτέρω πιθανά αιτιολογικά γονίδια ως φαρμακευτικοί στόχοι¹¹⁸. Για παράδειγμα η μελέτη των Boer και συνεργατών, παρέχει γενετικά και λειτουργικά δεδομένα που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν περαιτέρω⁴⁷. Εντούτοις, ο δρόμος για την υλοποίηση των δυνατοτήτων των ωμικών αναλύσεων στη κλινική διαχείριση των ασθενών είναι ακόμη πολύ μακριά (Εικόνα 7), αλλά η πρόοδος είναι ταχύτατη. Υπάρχει ανάγκη να εισαχθούν περισσότερες γενετικές μελέτες από ασιατικούς πληθυσμούς και επιπλέον, πρέπει να καταγραφούν σαφείς και ακριβείς ενδοφαινότυποι της ΟΑ. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με περισσότερα διαθέσιμα δεδομένα από ΟΑ ιστούς από ένα μόνο κύτταρο, τη καλύτερη κατανόηση των πολύπλοκων ρυθμιστικών μηχανισμών μέσω της μεθόδου ATAC-Seq και των δεδομένων από την ανάλυση των μη κωδικών RNA, θα συμβάλλουν στη δημιουργία μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας για τη νόσο. Επομένως, οι προοπτικές είναι αισιόδοξες για την πρόληψη και τη θεραπεία της ΟΑ.

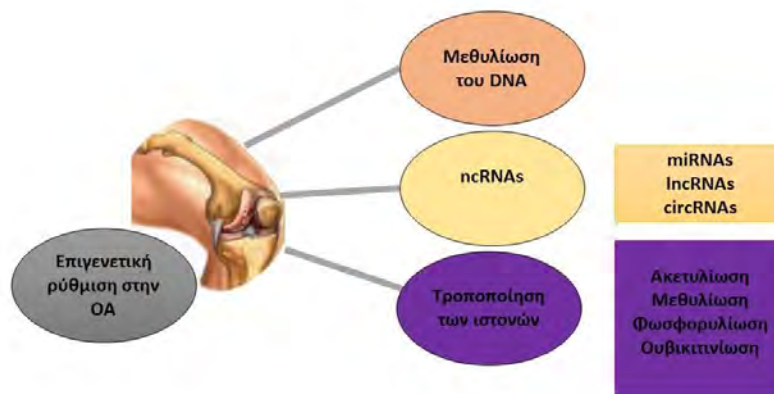


38

επομένως, τη παρατήρηση των μεταγραφικών, πρωτεωμικών και μεταβολομικών αλλαγών σε επίπεδο κυττάρου, ενώ είναι η αξιοσημείωτη η πρόοδος στην ανάπτυξη διαγνωστικών, προγνωστικών εργαλείων και θεραπευτικών μεθόδων για την ΟΑ¹²⁶.

A.2 Επιγενετική ρύθμιση στην Οστεοαρθρίτιδα

Η επιγενετική αναφέρεται στους μηχανισμούς με τους οποίους πραγματοποιούνται αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, χωρίς να μεταβάλλεται η αρχική αλληλουχία του DNA. Οι τρεις κύριοι μηχανισμοί της επιγενετικής ρύθμισης περιλαμβάνουν: 1) χημικές τροποποιήσεις στο DNA (όπως η μεθυλίωση που τροποποιεί τα νουκλεοτίδια κυτοσίνης-γουανίνης, CpGs), 2) μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών και 3) ρύθμιση με μη κωδικά μόρια RNAs (ncRNAs: τα miRNAs, τα lncRNAs και τα circRNAs). Και οι τρεις μηχανισμοί επιτρέπουν στα κύτταρα να ανταποκρίνονται στο περιβάλλον, μεταβάλλοντας την γονιδιακή τους έκφραση. Άλλοι ρόλοι αυτών των επιγενετικών μηχανισμών είναι να ρυθμίζουν την προσβασιμότητα της χρωματίνης, τη πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA και τη τρισδιάστατη οργάνωση του γονιδιώματος¹²⁷. Μέχρι σήμερα, έχει πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός επιγενετικών μελετών σε μυοσκελετικές ασθένειες συμπεριλαμβανομένης της ΟΑ.



Εικόνα 8: Επιγενετική ρύθμιση στην Οστεοαρθρίτιδα. Η μεθυλίωση του DNA, η έκφραση μη κωδικών RNAs (ncRNAs: miRNAs, lncRNAs και circRNAs) και οι τροποποιήσεις των ιστονών ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση στο επίπεδο της μεταγραφής ή/και μετά τη μεταγραφή. Η ακετυλίωση ιστόνης, η μεθυλίωση ιστόνης, η φωσφορυλίωση και η ουβικιτινίωση είναι σημαντικές τροποποιήσεις των ιστονών¹²⁸.

A.2.1 Βιογένεση των miRNAs.

Τα miRNAs είναι μικρά μη κωδικά μόρια RNA που ο κύριος ρόλος του είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της αναστολής της μετάφρασης είτε μέσω της προώθησης της

αποδόμησης των mRNA στόχων τους. Στοχεύοντας κυρίως στα μετάγραφα που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα miRNAs ενέχονται σε όλες σχεδόν τις αναπτυξιακές και παθολογικές διεργασίες. Η βιογένεση των miRNAs είναι υπό αυστηρό χρονικό και χωρικό έλεγχο. Τα miRNAs έχουν μήκος ~ 22 νουκλεοτίδια και παράγονται από δύο πρωτεΐνες RNase III, τη Drosha και Dicer. Κατά την αποσιώπηση του RNA, το miRNA λειτουργεί ως οδηγός που αναγνωρίζει τα συμπληρωματικά mRNA-στόχους του, ενώ οι πρωτεΐνες AGO στρατολογούν άλλους παράγοντες που προκαλούν τη μεταφραστική καταστολή, την αποαδενυλίωση του mRNA και αποικοδόμηση του¹²⁹. Οι θέσεις πρόσδεσης των miRNAs εντοπίζονται κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή (UTR) των mRNAs¹³⁰. Η περιοχή στο 5' άκρο των miRNAs που εκτείνεται από τη θέση των νουκλεοτιδίων 2 έως 7 είναι πολύ σημαντική για την αναγνώριση στόχου και έχει ονομαστεί «miRNA seed». Τα νουκλεοτίδια των miRNAs που εντοπίζονται καθοδικά συμβάλλουν επίσης στην αναγνώριση των στόχων του. Περισσότερο από το 60% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες περιέχουν τουλάχιστον μία συντηρημένη θέση πρόσδεσης miRNA και δεδομένου ότι υπάρχουν επίσης πολλές μη συντηρημένες θέσεις, η πλειοψηφία των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μπορεί να βρίσκονται υπό τον ρυθμιστικό έλεγχο των miRNAs¹³¹.

Επομένως, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η βιογένεση και η λειτουργία των miRNAs ρυθμίζονται στενά και η δυσλειτουργία τους συχνά συνδέεται με ασθένειες στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου¹³² και των νευροαναπτυξιακών διαταραχών. Η ρύθμιση των miRNAs συμβαίνει σε πολλαπλά στάδια, συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφής τους, της επεξεργασίας τους από τις Drosha και Dicer, τη φόρτωσή τους σε πρωτεΐνες AGO και τον κύκλο εργασιών των miRNAs.

Τα miRNAs υπό κανονικές συνθήκες κωδικοποιούνται ως μεμονωμένα γονίδια ή ως ομάδες που παράγουν λίγα έως αρκετές εκατοντάδες διαφορετικά μόρια. Οι ομάδες των miRNAs μεταγράφονται μαζί ως πολυκιστρονικά μετάγραφα, τα οποία μετατρέπονται μετά την επεξεργασία σε μεμονωμένα ώριμα miRNAs. Πολλά miRNAs είναι ενσωματωμένα σε ιντρόνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες^{133–135}.

Η διαδικασία της βιογένεσης των miRNAs περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια (Εικόνα 9) που περιλαμβάνουν ένα κανονικό μονοπάτι που εξαρτάται από την επεξεργασία της πρωτεΐνης Drosha και ένα μη κανονικό μονοπάτι στην οποία τα pre-miRNAs μπορούν εναλλακτικά να δημιουργηθούν μέσω μηχανισμού ματίσματος^{133,136–138}.

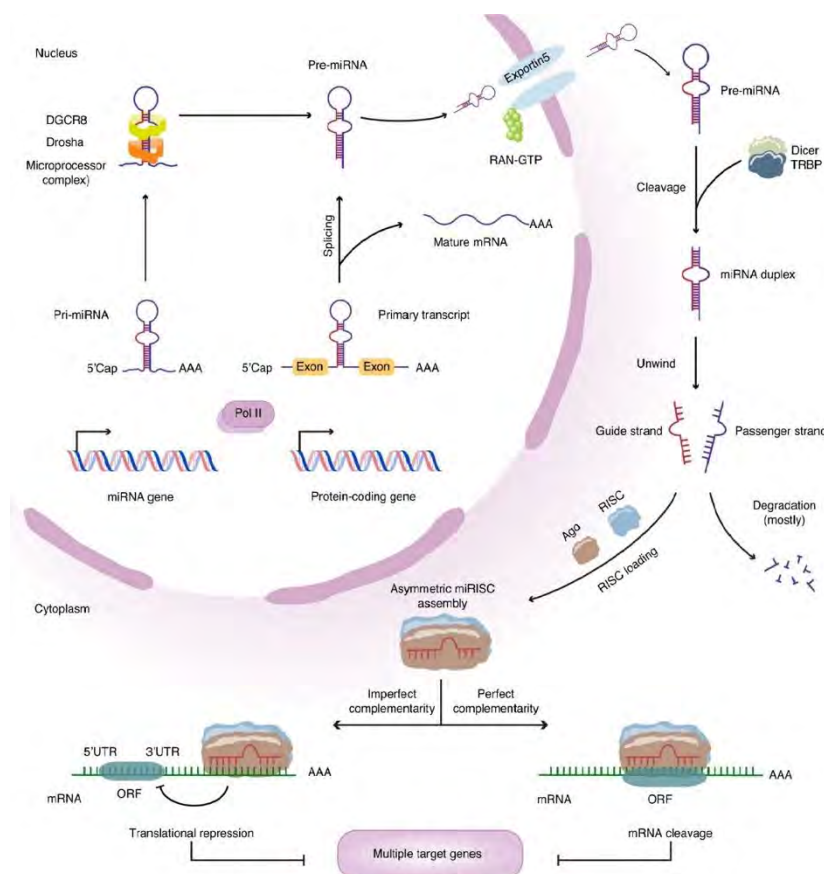
Στο κανονικό μονοπάτι, τα miRNAs μεταγράφονται από τη RNA πολυμεράση II (Pol II) και παράγονται πρώιμα miRNAs (pri-miRNAs). Τα πρώιμα microRNAs (pri-miRNAs), καλύπτονται με μια μεθυλιωμένη γουανίνη (5' cap) και πολυαδενυλιώνονται¹³⁹. Τα pri-

miRNAs, στο στέλεχος της δομής βρόχου-φουρκέτας που σχηματίζουν, περιέχουν τα νουκλεοτίδια 20–25 του ώριμου miRNA. Στην συνέχεια, στον πυρήνα, τα pri-miRNAs υποβάλλονται σε επεξεργασία και σχηματίζονται δομές φουρκέτας, μήκους 70 νουκλεοτιδίων που ονομάζονται πρόδρομα miRNAs (pre-miRNAs) από ένα σύμπλεγμα πυρηνικής πρωτεΐνης που ονομάζεται μικροεπεξεργαστής¹⁴⁰.

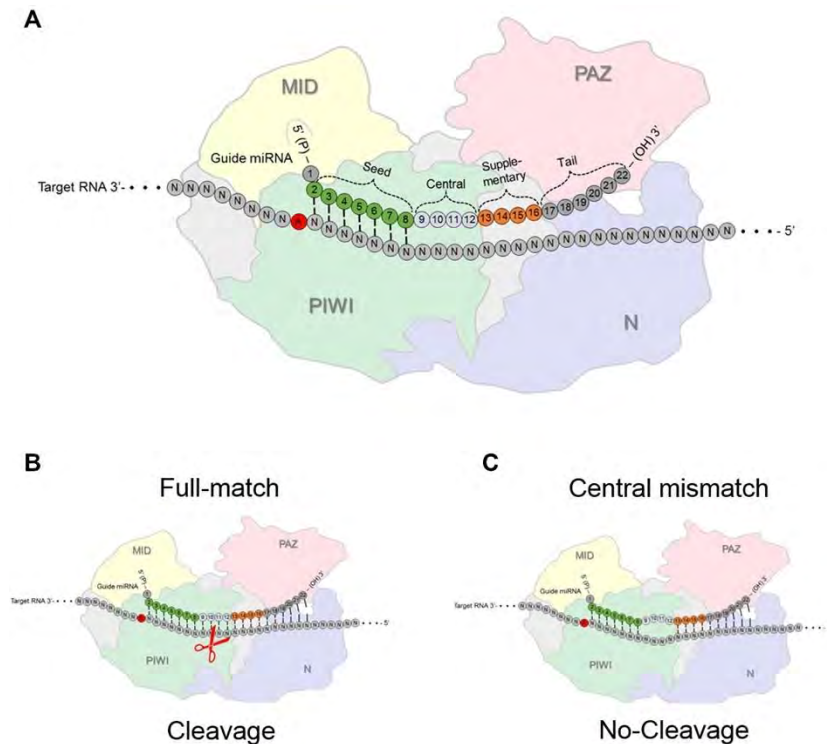
Ο μικροεπεξεργαστής περιλαμβάνει το ένζυμο RNase III Drosha, τη DGCR8 και αρκετούς βοηθητικούς παράγοντες όπως τις DEAD RNA ελικάσες p68 (επίσης γνωστές ως DDX5) και p72 (επίσης γνωστές ως DDX17)^{137,141–143}. Τα pre-miRNAs εξάγονται στο κυτταρόπλασμα, αφού προσδένονται στον υποδοχέα exportin 5 (Exp5)^{144–146}. Στο κυτταρόπλασμα, το ένζυμο RNase III Dicer επεξεργάζεται το pre-miRNA και παράγεται ένα dsRNA που έχει μήκος 20-25 νουκλεοτίδια, το οποίο αποτελεί τμήμα του στελέχους του pre-miRNA^{147,148}. Στους ανθρώπους, το Dicer δρα μαζί με την πρωτεΐνη dsRBP^{149,150}.

Τέλος, κατά την διαδικασία της φόρτωσης από το σύμπλοκο RISC (RNA- induced silencing complex), το δίκλωνο miRNA που παράγεται από το Dicer προσδένεται σε ένα μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Argonaute (AGO) (Εικόνα 10), το οποίο επιλέγει τη μια αλυσίδα για να γίνει το τελικό μονόκλωνο ώριμο miRNA¹⁵¹. Με την πρόσδεση του στο RISC, τα ώριμα miRNAs καθοδηγούνται στα mRNA στόχους μέσω του ζευγαρώματος των βάσεων, προωθώντας την αποδόμηση του mRNA στόχου ή την καταστολή της μετάφρασης τους¹⁵².

Εντούτοις, να αναφερθεί ότι η δράση των Drosha, Dicer και Exp5 στην βιογένεση των miRNAs έχει αναθεωρηθεί τα τελευταία χρόνια. Knockout της Drosha ανέστειλε τελείως την έκφραση των miRNAs, αντιθέτως πολλά miRNAs βρέθηκαν σε Exp5-knockout και σε Dicer-knockout κύτταρα, το οποίο υποδεικνύει ότι τα miRNAs μπορούν, τουλάχιστον σε κάποιο βαθμό, να υποβάλλονται σε βιογένεση μέσω πολλαπλών εναλλακτικών μονοπατιών¹⁵³.



Εικόνα 9: Απεικόνιση της βιογένεσης των miRNAs. Τα miRNAs που κωδικοποιούνται σε ιντρόνια γονιδίων και διαγονιδιακές περιοχές μεταγράφονται αρχικά από το ένζυμο RNA Pol II στον πυρήνα. Στο κανονικό μονοπάτι (αριστερά), τα pri-miRNAs αναγνωρίζονται και επεξεργάζονται από το σύμπλεγμα μικροεπεξεργαστή, που αποτελείται από δύο ένζυμα RNase III, Drosha και DGCR8, απελευθερώνοντας ένα πρόδρομο miRNA με δομή φουρκέτας. Στο μη κανονικό μονοπάτι (δεξιά), ωστόσο, οι φουρκέτες των πρόδρομων miRNAs δημιουργούνται από ιντρόνια που υφίστανται μάτισμα, παρακάμπτοντας το βήμα της διάσπασης από τη Drosha. Η πυρηνική εξαγωγή των πρόδρομων miRNAs, μεσολαβείται από το σύμπλοκο Exportin-5 και Ran-GTP. Τα κυτταροπλασματικά πρόδρομα miRNAs διασπώνται περαιτέρω από την ενδονουκλεάση Dicer, με τη βοήθεια του TRBP, για να δώσουν δίκλωνα miRNAs ~22 νουκλεοτιδίων. Ο ένας κλώνος του δίκλωνου μορίου διατηρείται ως ώριμο miRNA και ενσωματώνεται στο RISC (που περιέχει πρωτεΐνες AGO), ενώ ο άλλος κλώνος αποικοδομείται. Οι μηχανισμοί αποσιώπησης των γονιδίων μέσω των miRNAs, συμπεριλαμβανομένης της επιταχυνόμενης διάσπασης και της περιορισμένης μετάφρασης των mRNAs, φαίνεται να εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον βαθμό συμπληρωματικότητας μεταξύ των αλληλουχιών seed των miRNAs και της 3' UTR των mRNAs-στόχων¹⁵⁴.



Εικόνα 10: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης AGO, ενός κλώνου miRNA και ενός στόχου RNA. Οι πρωτεΐνες AGO αποτελούνται από τέσσερις τομείς: Την N-τελική περιοχή όπου υποστηρίζει τη φόρτωση του miRNA, τον τομέα PAZ όπου προσδένεται το 3 άκρο ενώ ο τομέας MID προσδένει το 5 άκρο του miRNA. (Α) Η Ago πρωτεΐνη, στην οποία προσδένεται το miRNA. (Β) Το PIWI είναι ο τομέας που είναι υπεύθυνος για τη διάσπαση υποστρωμάτων RNA από το AGO2 όταν υπάρχει πλήρης συμπληρωματικότητα. (Γ) Όταν δεν υπάρχει πλήρης συμπληρωματικότητα, οι κεντρικά αταίριαστες βάσεις θα μπλοκάρουν τη διάσπαση ενώ θα επιτρέψουν τη δέσμευση του miRNA σε έναν RNA στόχο¹⁵⁵.

A.2.2 In silico ανάλυση miRNAs με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής

Πολλά εργαλεία βιοπληροφορικής έχουν αναπτυχθεί για να διευκολύνουν τη διερεύνηση των miRNAs. Τέτοια εργαλεία περιλαμβάνουν το σχολιασμό (annotation) των miRNAs, τις βάσεις δεδομένων miRNAs, τους αλγορίθμους που προβλέπουν τους στόχους των miRNAs, τους αλγορίθμους που βρίσκουν τους επαληθευμένους στόχους των miRNAs, τη διερεύνηση ρυθμιστικών δικτύων miRNAs και μεταβολικών οδών, τη διερεύνηση των μεταγραφικών παραγόντων (TF) που σχετίζονται με miRNAs και τη σύνδεση των miRNAs με ασθένειες.

Η βάση δεδομένων miRBase περιλαμβάνει τις καταχωρήσεις όλων των miRNAs, και δημιουργήθηκε για τη διαχείριση του αυξανόμενου αριθμού νέων miRNAs που ανακαλύφθηκαν μέσω της αλληλούχισης υψηλής κλίμακας. Το miRBase αποτελεί μια διαδικτυακή βάση δεδομένων για όλα τα δημοσιευμένα πρόδρομα και ώριμα miRNAs και

τους σχετικούς σχολιασμούς¹⁵⁶. Το miRBase περιλαμβάνει 38.589 πρόδρομα miRNAs, 48.885 ώριμα miRNAs, σε 271 είδη (www.mirbase.org). Μια άλλη κατηγορία εργαλείων βιοπληροφορικής είναι τα εργαλεία που προβλέπουν τα γονίδια στόχους των miRNAs. Η διαδικτυακή βάση δεδομένων TargetScan προβλέπει τους βιολογικούς στόχους των miRNAs, αναζητώντας την παρουσία συντηρημένων περιοχών μήκους έξι και επτά νουκλεοτιδίων που ταιριάζουν με την seed περιοχή κάθε miRNA. Προβλέπει επίσης τη δευτεροταγή δομή με τον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας των προβλεπόμενων δίκλωνων μορίων. Γενικότερα, οι προβλέψεις βασίζονται σε κάποια χαρακτηριστικά όπως το 3' ζευγάρι των βάσεων, το περιεχόμενο των νουκλεοτιδίων AU και τη συμβολή της θέσης^{157,158}.

Το miRWalk, είναι μια διαδικτυακή πλατφόρμα, η οποία αποτελείται από τις προβλεπόμενες και πειραματικά επιβεβαιωμένες αλληλεπιδράσεις miRNA-mRNA στόχων που συνδυάζουν διάφορους αλγόριθμους για να ελαχιστοποιήσουν τα ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα. Το miRwalk βρίσκει τις πιθανές θέσεις πρόσδεσης των miRNAs σε ολόκληρη την αλληλουχία ενός γονιδίου και συνδυάζει αυτά τα δεδομένα με τις προβλεπόμενες θέσεις από άλλα προγράμματα πρόβλεψης στόχων miRNAs¹⁵⁹. Το miRTarBase περιέχει πληροφορίες σχετικά με τις πειραματικά επαληθευμένες αλληλεπιδράσεις των miRNA και των στόχων τους, που συλλέγονται χειροκίνητα¹⁶⁰. Το TarBase είναι μια άλλη βάση δεδομένων που περιλαμβάνει όλους τους πειραματικά επαληθευμένους στόχους των miRNAs¹⁶¹.

Τα miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν πολλά γονίδια και κάθε γονίδιο μπορεί να αποτελεί στόχο πολλών miRNAs, δημιουργώντας ένα ρυθμιστικό δίκτυο. Στο πλαίσιο αυτό, η μελέτη του δικτύου αλληλεπιδράσεων μεταξύ των γονιδίων στόχων και των miRNAs αποτελεί πρόκληση για τη κατανόηση του μηχανισμού ρύθμισης των miRNAs και τη συσχέτιση τους με τη παθογένεια της ΟΑ. Η ύπαρξη εργαλείων βιοπληροφορικής που προβλέπουν τέτοιες αλληλεπιδράσεις είναι μια πολύ χρήσιμη προσέγγιση, η οποία επιτρέπει τη δημιουργία ενός δικτύου αλληλεπιδράσεων, επιτρέποντας στη συνέχεια τη στοχευμένη επαλήθευση των miRNA-mRNA αλληλεπιδράσεων με in vitro μεθόδους. Τέτοια παραδείγματα βάσεων δεδομένων που περιλαμβάνουν αλγόριθμους είναι το miRNApath όπου χρησιμοποιεί τα γονίδια στόχους των miRNAs, προκειμένου να συσχετίσει τα miRNAs με συγκεκριμένα βιοχημικά μονοπάτια¹⁶² και το miRTar, μια βάση δεδομένων που αναλύει miRNAs που συμμετέχουν σε μεταβολικές οδούς¹⁶³.

A.2.3 Τα miRNAs της κυκλοφορίας ως πιθανοί βιοδείκτες για την ΟΑ

Τα miRNAs έχουν εντοπιστεί και στη κυκλοφορία. Ωστόσο, η προέλευση και οι βιολογικές λειτουργίες των miRNAs της κυκλοφορίας σε μια ασθένεια δεν είναι πλήρως κατανοητές.

Τα στοιχεία δείχνουν ότι τα κυκλοφορούντα miRNAs θα μπορούσαν να έχουν μεταφερθεί στην κυκλοφορία μέσω μικροκυττάρων, εξωσωμάτων, συμπλόκων Argo πρωτεϊνών ή HDL και ότι είναι είτε υποπροϊόντα των κυττάρων είτε διαμεσολαβούν τη διακυτταρική σηματοδότηση (Εικόνα 11), γεγονότα που αντικατοπτρίζουν την παθοφυσιολογική κατάσταση του κυττάρου¹⁶⁴⁻¹⁶⁸.

Τα miRNAs θεωρούνται ελκυστικά μόρια για να διερευνηθούν περαιτέρω προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη πρόγνωση ή/ και εξέλιξη της νόσου, διότι τα επίπεδα έκφρασης τους μεταβάλλονται σε μη φυσιολογικές συνθήκες, είναι αρκετά σταθερά στην κυκλοφορία και έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής (περίπου 5 ημέρες στο πλάσμα)¹⁶⁹. Τα miRNAs της κυκλοφορίας έχουν αποδειχθεί ως σημαντικοί βιοδείκτες σε πολλές ασθένειες, όπως ο διαβήτης τύπου II¹⁷⁰, το μεταβολικό σύνδρομο¹⁷⁰, η νόσος Αλτσχάιμερ, η υπέρταση, η οστεοπόρωση, η νόσος του Πάρκινσον και ο καρκίνος¹⁷¹. Διάφορες μελέτες έχουν εξετάσει το προφίλ των miRNAs σε διαφορετικά σωματικά υγρά όπως αρθρικό υγρό, ορό, πλάσμα ή σε κύτταρα αίματος με σκοπό την εύρεση νέων βιοδεικτών για τη πρόβλεψη και καλύτερη θεραπεία της Οστεοαρθρίτιδας (Εικόνα 12).

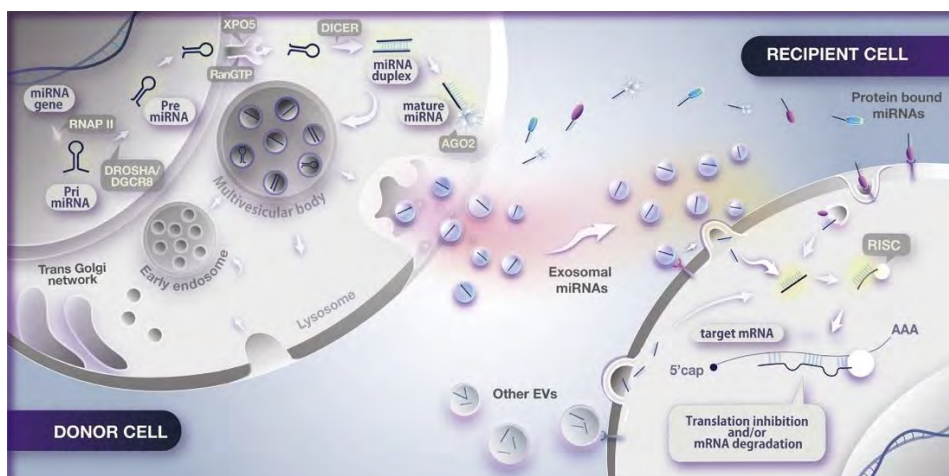
Οι Cuadra et al, πραγματοποίησαν ανάλυση των προφίλ έκφρασης 384 miRNAs στο πλάσμα ασθενών με ΟΑ έναντι της ομάδας ελέγχου και διαπίστωσαν ότι 12 miRNAs (συγκεκριμένα, τα miR-16, miR-20b, miR-29c, miR-30b, miR-93, miR-126, miR-146a, miR-184, miR-186, miR-195, miR-345 και miR-885-5p) υπερεκφράζονται σε ασθενείς με ΟΑ. Οι αναλύσεις *in silico*, που πραγματοποιήθηκαν για αυτά τα miRNAs, προέβλεψαν τα πιθανά γονίδια στόχους των miRNAs που σχετίζονται με ομοιόσταση χόνδρου και την παθογένεια της ΟΑ¹⁷². Σε μια άλλη πρόσφατη μελέτη, η έκφραση των miR-146a, miR-155, miR-181a και miR-223 ελέγχθηκε με τη μέθοδο qPCR και διαπιστώθηκε ότι ήταν υψηλότερη στα μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) ασθενών με ΟΑ σε σύγκριση με υγιή άτομα¹⁷³. Οι Murata et al., ποσοτικοποίησαν τα επίπεδα έκφρασης των miR-16, miR-132, miR-146a, miR-155 και miR-223 σε αρθρικό υγρό από ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ) και ΟΑ και στο πλάσμα ασθενών με ΡΑ, ΟΑ και υγιών ατόμων με τη μέθοδο RT-PCR. Τα επίπεδα των miR-16, miR-146a, miR-155 και miR-223 στο αρθρικό υγρό βρέθηκαν διαφοροποιημένα μεταξύ των ασθενών με ΡΑ και ΟΑ¹⁷⁴.

Οι Li et al, μελέτησαν το προφίλ των miRNAs στο αρθρικό υγρό και ευρέθησαν 7 miRNAs με αυξημένη έκφραση (miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-29c-3p, miR-34a-5p και miR-186-5p) σε ασθενείς με προχωρημένη ΟΑ σε σύγκριση με ασθενείς με ΟΑ σε αρχικό στάδιο και το miR-378a-5p αναγνωρίστηκε ως το miRNAs με τη μεγαλύτερη διαφοροποιημένη έκφραση σε προχωρημένη ΟΑ¹⁷⁵. Επιπλέον, οι Beyer et al. μελέτησαν το προφίλ έκφρασης 374 miRNAs μεταξύ ατόμων που χρειάστηκαν μια ή περισσότερες

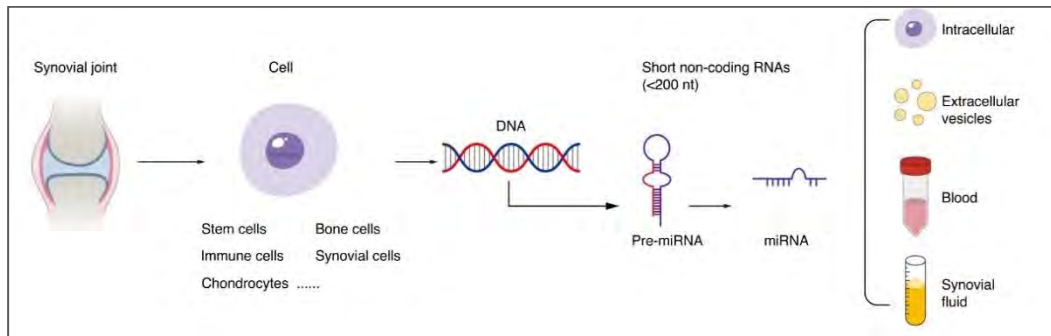
επεμβάσεις αρθροπλαστικής και ατόμων που δε χρειάστηκαν αρθροπλαστική, και βρήκαν ότι 12 από αυτά τα miRNAs παρουσίασαν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε qPCR για επαλήθευση αυτών των αποτελεσμάτων και έδειξε ότι τα let-7e, miR-454 και miR-885-5p θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως δυνητικοί προγνωστικοί παράγοντες για σοβαρή ΟΑ των αρθρώσεων του γόνατος και του ισχίου. Σε μια μελέτη που περιλάμβανε γυναίκες από την κοόρτη OFELY (Os des Femmes de Lyon), τα miR-146a-5p και miR186-5p, εμφάνισαν αυξημένη έκφραση σε άτομα με ΟΑ γόνατος σε σχέση με υγιή άτομα. Η προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη, περιλάμβανε next-generation sequencing και επαλήθευση με qPCR πραγματικού χρόνου για 19 miRNAs¹⁷⁶. Οι Ali et al, ανίχνευσαν 11 miRNAs, τα οποία διαφοροποιούνται στο πλάσμα μεταξύ ασθενών με πρώιμη και πιο προχωρημένη φάση της ΟΑ γονάτου σύμφωνα με ακτινογραφικά ευρήματα¹⁷⁷.

Πρόσφατα, miRNAs που έχουν βρεθεί στη κυκλοφορία είναι τα miR-200c-3p, miR-100-5p, miR-1826, miR-29 b-3p και miR-582-5p¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Ενώ τα επίπεδα του miR-210 στο αρθρικό υγρό (SF) έχουν επίσης αναδειχθεί ως δυνητικός διαγνωστικός βιοδείκτης λόγω της αύξησής τους στην πρώιμη ΟΑ, ενώ τα επίπεδα του miR-30c-5p βρέθηκαν σχετίζονται με μετεγχειρητικό πόνο^{181,182}.

Οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των αποτελεσμάτων στις μελέτες μπορεί να αποδοθούν στο διαφορετικό σχεδιασμό κάθε μελέτης, όπως το τύπο του σωματικού υγρού, τη μέθοδο απομόνωσης των miRNAs, την έλλειψη συγκεκριμένου ενδογενούς control, τη μέθοδο ελέγχου του προφίλ των miRNAs¹⁸³ ή ακόμη και το στάδιο της νόσου (πρώιμου ή προχωρημένου σταδίου) και το φαινότυπο της ΟΑ. Ωστόσο, για να διαπιστωθεί η χρήση η κλινική χρησιμότητα των παραπάνω μορίων θα πρέπει επαληθευτεί η διαφοροποιημένη έκφραση τους σε πολλαπλές μελέτες, με μεγαλύτερα μεγέθη δειγμάτων.



Εικόνα 11: Διακυτταρική επικοινωνία μέσω των miRNAs¹⁶⁸.



Εικόνα 12: Σχηματικό διάγραμμα παραγωγής των miRNAs της κυκλοφορίας που προέρχονται από τους ιστούς της άρθρωσης. Στις αρθρώσεις, πολλοί τύποι κυττάρων χρησιμεύουν ως κύριες πηγές miRNAs. Τα πρόδρομα miRNAs μετατρέπονται σε ώριμα miRNA, τα οποία εκκρίνονται σε βιολογικά υγρά όπως το αίμα και το αρθρικό υγρό ως ελεύθερα μόρια ή σε εξωκυττάρια κυστίδια¹⁵⁴.

A.2.4 Τα miRNAs στην Οστεοαρθρίτιδα

Οι μελέτες για τη διερεύνηση των miRNAs στην Οστεοαρθρίτιδα θα μπορούσαν να διαχωριστούν σε 3 κατηγορίες, α) μελέτες προφίλ έκφρασης β) λειτουργικές μελέτες in vitro και γ) in vivo μελέτες με τη χρήση μοντέλων ζώων της ΟΑ.

Έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες ανάλυσης του προφίλ των miRNAs, από τις οποίες έχουν αναδειχθεί αρκετά miRNAs που εμφανίζουν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των ατόμων που πάσχουν από ΟΑ και φυσιολογικών ατόμων¹⁸⁴. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μετα-ανάλυση από ένα σύνολο 191 μελετών που αναλύθηκαν, αναδείχθηκαν 162 miRNAs. Εκ των οποίων 36 εμφάνισαν το ίδιο μοτίβο διαφοροποίησης στην έκφραση τους σε τουλάχιστον 2 μελέτες (13 με αυξημένα επίπεδα έκφρασης και 23 με μειωμένα επίπεδα έκφρασης). Ο μεγαλύτερος αριθμός μελετών διεξήχθη στον αρθρικό χόνδρο, όπου τα miRNAs όπου εμφάνισαν τα πιο αυξημένα επίπεδα έκφρασης ήταν τα miR-146a-5p και miR-34a-5p, και τα miRNAs με τα πιο μειωμένα επίπεδα έκφρασης ήταν τα miR-127-5p και miR-140-5p¹⁸⁵. Η ερευνητική μας ομάδα ήταν μεταξύ των πρώτων που πρότειναν τη συμμετοχή των miRNAs στην παθογένεια της ΟΑ, δείχνοντας τη διαφοροποιημένη έκφραση 16 miRNAs, σε ΟΑ σε σχέση με υγιή αρθρικό χόνδρο¹⁸⁶ (miR-483, miR-22, miR-377, miR-103, miR-16, miR-223, miR-30b, miR-23b and miR-509, miR-29a, miR-140, miR-25, miR-337, miR-210, miR-26a and miR-373).

Τα miRNAs έχουν συσχετιστεί με αρκετές διεργασίες που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΟΑ, όπως την φλεγμονή, την αποικοδόμηση χόνδρου, τη σύνθεση της ECM, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση¹²⁶ (Εικόνα 13).

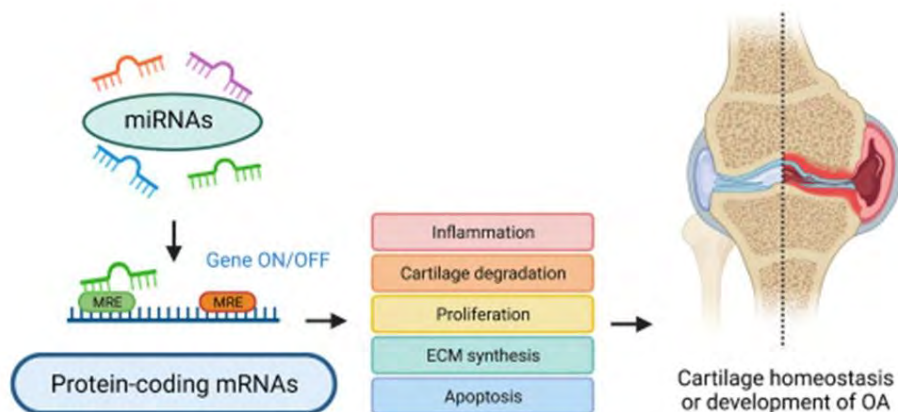
Η πυρόπτωση, ένα είδος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από φλεγμονοσώματα (inflammasomes), είναι μια διαδικασία που συνδέεται με την παθολογία της ΟΑ^{187,188}. Η ενεργοποίηση του NLRP3 (NOD-like receptor containing a pyrin domain 3) οδηγεί στην παραγωγή της IL-1β, προκαλώντας πυρόπτωση. Οι Zhang και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η καθεψίνη Β (CTSB) ως ρυθμιστής της ενεργοποίησης του φλεγμονώδους NLRP3, μπορεί να κατασταλεί από το miR-140-5p, μειώνοντας την πυρόπτωση των χονδροκυττάρων στην ΟΑ. Έτσι, η αύξηση των επιπέδων του miR-140-5p μπορεί να έχει θεραπευτικά αποτελέσματα¹⁸⁹.

Σε μονοπάτια κυτταρικού στρες, ο Ito και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι οι δυο μορφές του miR-455, -5p και -3p, αλληλεπιδρούν με το μονοπάτι της υποξίας, καταστέλλοντας τον HIF-2α¹⁹⁰. Επιπλέον, τα miR-455-5p και -3p αυξάνουν την έκφραση του SOX9^{191,192}. Το miR-128-3p έχειδειχθεί ότι σχετίζεται με τη φλεγμονή και τον εκφυλισμό της εξωκυττάριας μήτρας, αλληλεπιδρώντας με τη SIRT1 για να επάγει τη δράση του TNF-α σε μια φλεγμονώδη απόκριση¹⁹³. Το miR-128-3p μπορεί να μειώσει την απόπτωση των χονδροκυττάρων, την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας και τη φλεγμονή, στοχεύοντας το *WISP1* (Wnt-induced secreted protein 1) στην ΟΑ¹⁹⁴. Μια μελέτη της έκφρασης των miRNAs σε πρόσθιους χιαστούς συνδέσμους ασθενών με ΟΑ έδειξε ότι το miR-503-5p εμφάνισε χαμηλή έκφραση¹⁹⁵. Η SGK1 (serum/glucocorticoid regulated kinase 1), εκφράζεται επίσης σε αυξημένα επίπεδα σε ΟΑ χόνδρο, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο σε μια επαγόμενη από την IL-1β αναβολική και καταβολική ανισορροπία σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα¹⁹⁶. Είναι ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα του miR-503-5p μπορεί να μειωθούν μετά τη πρόσδεση των αποακετυλασών ιστονών (HDACs) στον υποκινητή του miR-503-5p, αναστέλλοντας την έκφραση του H3K27ac¹⁹⁶. Μια μελέτη από τον Wang et al. έδειξε ότι το *SGK1* είναι στόχος του miR-503-5p και ότι η HDAC2 θα μπορούσε να προωθήσει την εξέλιξη της ΟΑ μέσω του miR-503-5p/*SGK1*¹⁹⁷. Έτσι, η ενισχυμένη έκφραση της HDAC2 οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα του miR-503-5p και επακόλουθη αύξηση της έκφρασης SGK1 κατά την εξέλιξη της ΟΑ. Πρόσφατα, ο Zhang και οι συνεργάτες του έδειξαν διπλές λειτουργίες του miR-17 στη διατήρηση της ομοιόστασης του χόνδρου και στην προστασία από την ΟΑ¹⁹⁸. Το miR-17 μέσω της επαγωγής του GDF5 διατηρεί την ομοιόσταση του χόνδρου και προστατεύει από την εξέλιξη της ΟΑ.

Μια άλλη διαδικασία η οποία έχει συσχετιστεί με αρκετά miRNAs στην ΟΑ, είναι η αυτοφαγία. Στην αυτοφαγία, κατεστραμμένα κυτταροπλασματικά συστατικά αποικοδομούνται και ανακυκλώνονται, γεγονός που αποτελεί σημαντικό μέρος της διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης. Στην ΟΑ, η διαδικασία της αυτοφαγίας αναστέλλει τη φλεγμονή και μειώνει την απόπτωση. Από την άλλη ενώ η αυτοφαγία είναι

απαραίτητη για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης στον χόνδρο, διαταραχή των διαδικασιών της αυτοφαγίας μπορεί να επιφέρει επιβλαβή αποτελέσματα που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της ΟΑ. Τα miRNAs που έχει δειχθεί ότι προάγουν την αυτοφαγία στην ΟΑ, είναι τα miR-140-5p, miR-146a, miR-34a-5p, miR-335-5p και το let-7e^{199–202}. Ενώ στα miRNAs που σχετίζονται με μείωση της αυτοφαγίας περιλαμβάνονται τα miR-206, miR-375, miR-411 και miR-449^{203–206}.

Οι δυσκολίες πρόσβασης στους ιστούς των αρθρώσεων έχουν δημιουργήσει την ανάγκη για μελέτες που διερευνούν τη δυνατότητα της χορήγησης θεραπευτικών μορίων στο χόνδρο. Οι Liang et al. αναζήτησαν μια λύση σε αυτή τη «μεγάλη πρόκληση» με τη χρήση εξωσωμάτων για τη χορήγηση miRNAs στα χονδροκύτταρα²⁰⁷. Ειδικότερα, οι συγγραφείς μπόρεσαν να παράγουν εξωσώματα, με τα οποία επιτυγχάνεται η επιλεκτική χορήγηση του miR-140 στα ανθρώπινα χονδροκύτταρα, αλλά όχι σε MSCs, με επακόλουθη καταστολή των στόχων του miR-140, ADAMTS5 και MMP13²⁰⁷. Σε μια μελέτη όπου διερεύνουν τον ρόλο του miR-34a-5p στην ΟΑ, μετά από χορήγηση του miR-34a-5p και του αναστολέα του σε χονδροκύτταρα και υμενοκύτταρα, δείχθηκε η ρύθμιση αναβολικών και καταβολικών δεικτών της ΟΑ όπως COL2A1 και MMP13. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν in vivo, όπου η έγχυση αναστολέων του miR-34a-5p έδειξε αναστολή της ΟΑ σε ποντίκια. Επιπλέον, οι Cao et al. παρατήρησαν μειωμένα επίπεδα του miR-214-3p σε ΟΑ χονδροκύτταρα ανθρώπων και ποντικών. Το miR-214-3p ανέστειλε την IL-1-διαμεσολαβούμενη ενεργοποίηση του προγράμματος έκφρασης καταβολικών γονιδίων σε χονδροκύτταρα, στοχεύοντας τη κινάση IKKB και αναστέλλοντας το μονοπάτι NF-κB. Ενδοαρθρική έγχυση του miR-214-3p ή του αναστολέα ήταν σε θέση να καταστείλει ή να προάγει αντίστοιχα την εκφύλιση του χόνδρου σε ένα μοντέλο ΟΑ που προκαλείται από DMM σε ποντίκια²⁰⁸.



Εικόνα 13: Διάγραμμα που αναπαριστά το ρόλο των miRNAs στη ρύθμιση των επιπέδων των mRNAs και των πρωτεϊνών που ενέχονται σε σημαντικές διαδικασίες για την ομοιόσταση του χόνδρου και την ανάπτυξη της OA.

A.2.5 Το miR-140 και ο ρόλος του στην OA.

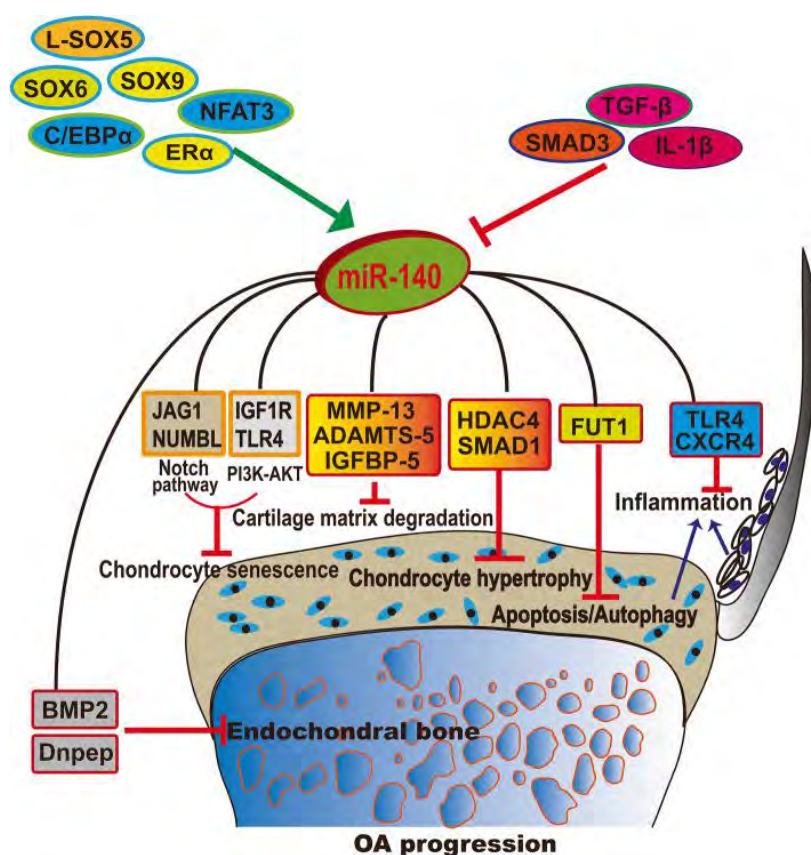
Το miR-140 βρίσκεται στο ιντρόνιο του γονιδίου *WWP2* (WW domain-containing E3 ubiquitin-protein ligase 2)¹⁸² και παράγει δύο ώριμα microRNAs: miR-140-5p και miR-140-3p. Το miR-140 είναι συντηρημένο μεταξύ των σπονδυλωτών και εκφράζεται στα χονδροκύτταρα²⁰⁹. Τα ποντίκια, στα οποία απουσιάζει το miR-140 εμφανίζουν εκφυλιστικές βλάβες OA που σχετίζονται με την ηλικία, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αποδόμηση των πρωτεογλυκανών και ίνωση του αρθρικού χόνδρου²¹⁰. Επομένως, το miR-140 είναι ένας ρυθμιστής της ομοιόστασης του χόνδρου, και οι αλλαγές στην έκφραση του και στη λειτουργικότητα του διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ασθένειες που έχουν ως κύριο χαρακτηριστικό τους την αποδόμηση του χόνδρου.

Υπάρχουν πολλά δεδομένα που υποδηλώνουν ότι τόσο ο 5p κλώνος (miR-140-5p) όσο και ο 3p κλώνος (miR-140-3p) είναι σημαντικοί για τη χονδρογένεση και τη βιογένεση της OA^{211,212}. Και οι δύο κλώνοι εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα σε υγιή χόνδρο²¹³. Ωστόσο, η έκφραση των miR-140-3p και miR-140-5p είναι σημαντικά μειωμένη στα χονδροκύτταρα και στο αρθρικό υγρό (SF) ατόμων με OA γονάτου^{214,215}. Μέχρι σήμερα, πολλαπλοί στόχοι του miR-140-5p έχουν αναγνωριστεί, οι οποίοι ενέχονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια φλεγμονής, υπερτροφίας χονδροκυττάρων, γήρανσης και εκφυλισμού του χόνδρου κατά την εξέλιξη της OA. Ειδικότερα, το miR-140-5p βρέθηκε ότι αναστέλλει τη φλεγμονή, στοχεύοντας άμεσα τα γονίδια *TLR-4* (Toll-like receptor 4), *CXCR4* (C-X-C motif chemokine

receptor 4), *SMAD3* (mothers against decapentaplegic homologue)²¹⁶, *IL-1β* (interleukin-1 beta)²¹⁷.

Επιπλέον, η ανασταλτική δράση του miR-140-5p έχει δειχθεί στην υπερτροφία των χονδροκυττάρων μέσω στόχευσης του *HDAC4* (histone deacetylase 4)²¹⁸ και του *SMAD1*²¹⁹. Κατά την αναστολή της γήρανσης των χονδροκυττάρων, το miR-140-5p στοχεύει τα *JAG1* (Jagged1) και *NUMBL* (NUMBlike endocytic adaptor protein) στο Notch μονοπάτι και το *IGF1R* (insulin-like growth factor 1 receptor), καθώς και το *TLR4* στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-AKT²²⁰. Το miR-140-5p αναστέλλει την αποδόμηση της μήτρας του χόνδρου μέσω στόχων όπως τα *MMP-13*, *ADAMTS-5*, και *IGFBP-5*²²¹ (

Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Απεικόνιση του δικτύου του miR-140 που ενέχεται στη παθογένεια της OA²²².

A.2.5.1 Ο ρόλος του miR-140-3p

Σε σχέση με τους πολλούς στόχους που έχουν ανακαλυφθεί για το miR-140-5p, έχουν εντοπιστεί λιγότεροι στόχοι για το miR-140-3p, συμπεριλαμβανομένου του *CXCR4*, το οποίο σχετίζεται με την εξέλιξη της OA²²³.

Εκτός της Οστεοαρθρίτιδας, ο ρόλος του miR-140-3p έχει διερευνηθεί και σε άλλες ασθένειες, ρυθμίζοντας μοριακούς στόχους που ενέχονται στη παθοφυσιολογία τους. Στο καρκίνο, έχει βρεθεί ότι το miR-140-3p ρυθμίζει το αντιγηραντικό μόριο FOXQ1 (forkhead

box Q1)²²⁴. Ένας άλλος στόχος του miR-140-3p, είναι η MAPK1 (mitogen activated protein kinase) που κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/ θρεονίνης που ανήκει στην οικογένεια των MAP κινασών, σε μια κυτταρική σειρά ανθρώπινων στεφανιαίων ενδοθηλιακών κυττάρων (HCAECs). Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης της MAP κινάσης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών μέσω του NF-κΒ μονοπατιού^{225,226}. Οι Fushimi et al έδειξαν ότι η υπερέκφραση του miR-140-3p ενεργοποιεί τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών στοχεύοντας το γονίδιο *TGFβ3* (Transforming Growth Factor 3) σε MC3T3-E1 κύτταρα²²⁷. Επιπλέον, σε μια προγονική κυτταρική σειρά οστεοβλαστικών (κύτταρα C2C12), η αποσιώπηση του miR-140-3p είχε ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων και ανέστειλε την απόπτωση, μέσω της αναστολής του γονιδίου *PTEN* (Phosphatase and TENSin homolog)²²⁸.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ανακάλυψη νέων γονιδίων στόχων του miR-140-3p σε ΟΑ χονδροκύτταρα, που ενέχονται σε διαφορετικά μονοπάτια και έχουν συσχετιστεί με τη παθογένεια της ΟΑ, θα συντελέσει στη περαιτέρω στη κατανόηση του ρόλου του miR-140-3p στην εμφάνιση και εξέλιξη της Οστεοαρθρίτιδας.

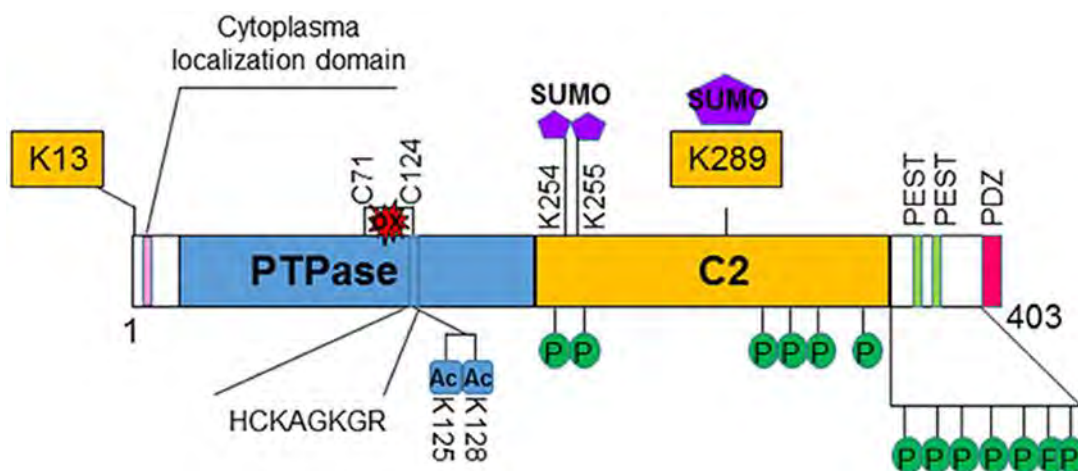
A.3 Το γονίδιο PTEN

Το γονίδιο PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) ανακαλύφθηκε το 1997 ανεξάρτητα από τρία εργαστήρια ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο του οποίου η έκφραση συχνά χάνεται σε όγκους²²⁹⁻²³¹. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι το *PTEN* ρυθμίζει αρνητικά ένα σημαντικό σηματοδοτικό μονοπάτι κυτταρικής ανάπτυξης και επιβίωσης των κυττάρων, συγκεκριμένα το μονοπάτι PI3K/AKT^{232,233}. Τα τελευταία χρόνια, μελέτες έδειξαν τον ρόλο του *PTEN* στη μεταβολική ρύθμιση^{234, 235} και στη γήρανση²³⁶.

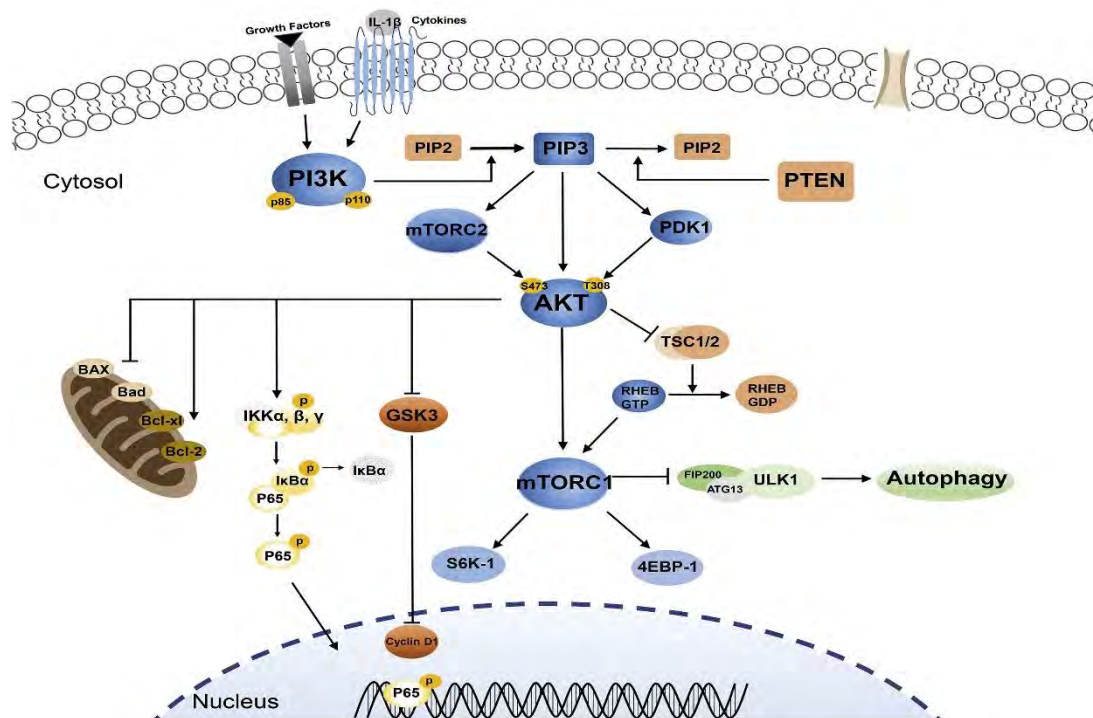
Το *PTEN* κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 10q23²³⁷ και η πρωτεΐνη του περιέχει 403 αμινοξέα^{229,235}. Η κρυσταλλική δομή του *PTEN* αποκάλυψε μια επικράτεια C2 που έχει συγγένεια για φωσφολιπίδια στη μεμβράνη και έναν τομέα φωσφατάσης που περιέχει το μοτίβο CX5R, χαρακτηριστικό για φωσφατάσες (Εικόνα 15). *In vitro*, το PTEN αποφωσφορυλιώνει φωσφοπεπτίδια καθώς και φωσφολιπίδια. Έτσι, το PTEN είναι μια διπλή λιπιδική και πρωτεϊνική φωσφατάση. Μια από τις κύριες δράσεις του PTEN, είναι να αποφωσφορυλιώνει το λιπιδικό υπόστρωμα 3, 4, 5-τριφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP3), ενώ υπάρχουν και άλλα πρωτεϊνικά υποστρώματα για το PTEN^{233,235,238}. Ειδικότερα, το μοτίβο λιπιδικής φωσφατάσης των PTEN αποφωσφορυλιώνει το PIP3 στη θέση 3 και το μετατρέπει ξανά σε PIP2²³³ οδηγώντας σε μειωμένη παραγωγή του PIP3 και της σηματοδότησης που εξαρτάται από το PIP3²³⁹. Το PI3K καταλύει την αντίδραση από το PIP2 στο PIP3, φωσφορυλιώνοντας την ομάδα υδροξυλίου της 3ης θέσης στον δακτύλιο ινοσιτόλης των φωσφατιδυλοσινολών²⁴⁰. Επομένως, το PTEN δρα ως αρνητικό ρυθμιστικό

σήμα για το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K (Εικόνα 16). Το PTEN ρυθμίζεται σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Έχουν αναφερθεί αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες για τον έλεγχο της μεταγραφής του PTEN, συμπεριλαμβανομένου του όγκοκατασταλτικού γονιδίου *p53*, της πρωτεΐνης EGR-1, ενός μεταβολικού ρυθμιστικού γονιδίου του *PPARγ*²³⁴ και του γονιδίου *ATF2*²⁴¹. Το PTEN καταστέλλεται επίσης μεταγραφικά από τους SNAIL και SLUG²⁴². Αυτοί οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες ανταγωνίζονται το *p53* για πρόσδεση στον υποκινητή του *PTEN*. Επιπλέον, ο πυρηνικός παράγοντας kappa B (NFkB), η υπομονάδα παράγοντα μεταγραφής AP-1 c-Jun και Notch CBF-1 δεσμεύονται επίσης στον υποκινητή του PTEN για τη ρύθμιση της μεταγραφής του^{243,244}.

Επιπλέον, η ρύθμιση της έκφρασης του *PTEN* πραγματοποιείται και μέσω miRNAs και μακρών μη κωδικών RNAs (long noncoding RNAs). Αρκετά miRNAs συμπεριλαμβανομένων των miR-205, miR-122, miR-21 ταυτοποιήθηκαν ότι συνδέονται στη 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA του PTEN. Τα αυξημένα επίπεδα πολλών miRNAs συσχετίζονται με την ταυτόχρονη μείωση του mRNA του PTEN^{132,245–247}.



Εικόνα 15: Δομή του PTEN. Το PTEN είναι μια πρωτεΐνη 403 αμινοξέων που έχει κοινή ομολογία αλληλουχίας με την τενσίνη και την αυξίνη στο αμινοτελικό της άκρο. Η περιοχή PTPάσης περιέχει το μοτίβο CX5R (HCKAGKGR), δομή βρόχου p για φωσφατάσες. Η περιοχή C2 περιέχει τη συγγένεια για τα φωσφο-λιπίδια. Το PTEN περιέχει επίσης δύο τομείς PEST και έναν τομέα PDZ που μπορεί να ρυθμίζει τη σταθερότητα και τον υποκυτταρικό εντοπισμό του, αντίστοιχα²⁴⁸.



Εικόνα 16: Το σηματοδωτικό μονοπάτι PTEN/PI3K/Akt²⁴⁹.

A.3.1 PTEN και Οστεοαρθρίτιδα

Σύμφωνα με μια μελέτη, βρέθηκε ότι το PTEN εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε OA ιστούς και σχετίζεται με την έναρξη και την ανάπτυξη της OA, ρυθμίζοντας την απόκριση των χονδροκυττάρων και την ομοιοστάση της ECM²⁵⁰. Εν αντιθέσει, σε αρθρικά χονδροκύτταρα στα οποία απουσίαζε το PTEN, παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα τα επίπεδα p-mTOR και p-FoxO1/3a, μαζί με αυξημένο οξειδωτικό στρες και γήρανση, υποδεικνύοντας το ρόλο που διαδραματίζει το οξειδωτικό στρες στην OA σε ποντίκια απουσία του PTEN. Εντούτοις, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη κατανόηση της σχέσης μεταξύ του γονιδίου PTEN και της οστεοαρθρίτιδας.

A.4 Ο ρόλος των γονιδίων *TGFα*, *BCL-2*, *SIRT-1*, *HMGCR*, και *HDAC4* στην Οστεοαρθρίτιδα.

Σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν, η Οστεοαρθρίτιδα είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια με μεγάλη ετερογένεια, όπου γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες οδηγούν στον εκφυλισμό του χόνδρου. Μελέτες έχουν δείξει ότι αρκετά γονίδια, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με περιβαλλοντικούς παράγοντες για να επηρεάσουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη της Οστεοαρθρίτιδας, συμπεριλαμβανομένων των *TGFα*, *BCL-2*, *SIRT-1*, *HMGCR* και *HDAC4*.

Το γονίδιο *TGFα* κωδικοποιεί το μετασχηματιστικό αυξητικό παράγοντα α. Ένας νέος μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP), rs2862851 του γονιδίου *TGFα* βρέθηκε ότι σχετίζεται ισχυρά με την OA ισχίου σε μια μελέτη μετα-ανάλυσης GWAS σε Ευρωπαίους και

Αμερικανούς²⁵¹. Μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TGFA* έχει ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα σηματοδότησης EGFR το οποίο αυξάνει το κίνδυνο εκφυλιστικών διαταραχών στις αρθρώσεις του γόνατος²⁵². Οι Usmani et al, μελέτησαν τα αποτελέσματα της απαλοιφής του γονιδίου του *TGFA*, το οποίο έχει δειχθεί ότι προάγει τη μετατραυματική ΟΑ σε μοντέλο αρουραίου²⁵³, και σχετίζεται με ΟΑ ισχίου και γόνατος στους ανθρώπους^{251,254}. Προκαλώντας μετατραυματική (DMM) ΟΑ σε ποντίκια 10 εβδομάδων και 6 μηνών²⁵⁵, έδειξαν ότι η απώλεια του *TGFA* ήταν προστατευτική κατά της μετατραυματικής ΟΑ σε νεαρά ποντίκια, αλλά όχι στα ποντίκια μέσης ηλικίας. Η σκελετική ωριμότητα μεταβάλλει τις μηχανικές ιδιότητες των οστών και του χόνδρου, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει εν μέρει αυτές τις επιδράσεις.

Σύμφωνα με κάποιες μελέτες οι αλλαγές στη δραστηριότητα, στην έκφραση και στην κατανομή των αποακετυλασών ιστονών (HDACs) συμβάλλει στην έναρξη και την εξέλιξη της ΟΑ. Οι αναστολείς HDAC (HDACi) μπορούν να προστατεύσουν τα χονδροκύτταρα και να αποτρέψουν τις βλάβες του χόνδρου²⁵⁶. Οι HDAC, είναι πυρηνικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες της μεταγραφής που ρυθμίζουν τη δομή των χρωμοσωμάτων και τη δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων αφαιρώντας ακετυλομάδες από τις ιστόνες²⁵⁷. Η HDAC4 είναι το πιο μελετημένο μέλος της οικογένειας των αποακετυλασών των ιστονών στην παθογένεια της ΟΑ αλλά ο ρόλος της είναι αμφιλεγόμενος. Σε μια μελέτη βρέθηκε ότι, η πρωτεΐνη PKCε προάγει την έκφραση του SOX9 και την εναπόθεση GAGs στα χονδροκύτταρα μέσω της ανοδικής ρύθμισης HDAC4²⁵⁸. Το μονοπάτι PTHrPZfp521-HDAC4 θα μπορούσε να ρυθμίσει αρνητικά την υπερτροφία των χονδροκυττάρων. Το *Zfp521* είναι ένα καθοδικός γονίδιο-στόχος της PTHrP και σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με HDAC4 και Runx2, οδηγώντας στην καταστολή της ενεργοποίησης γονιδίου στόχου μέσω του Runx2²⁵⁹. Οι αλλαγές στην έκφραση της HDAC4 και στον κυτταρικό εντοπισμό της μπορούν να ρυθμίσουν την υπερτροφία των χονδροκυττάρων και την εξέλιξη της ΟΑ. Η PTHrP προάγει την πυρηνική μετατόπιση της HDAC4 και την αναστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του MEF2 για την πρόληψη της υπερτροφίας των χονδροκυττάρων²⁶⁰. Επιπλέον, το HDAC4 είναι μια μηχανική πρωτεΐνη. Η έκφρασή της μπορεί να ρυθμιστεί με μηχανική συμπίεση στα χονδροκύτταρα. Η υδροστατική πίεση (1–5 Hz) μειώνει σημαντικά την έκφραση HDAC4 στα χονδροκύτταρα ΟΑ για να διατηρήσει τον φαινότυπο των χονδροκυττάρων²⁶¹. Ένας άλλος ρόλος της HDAC4 στην ΟΑ, είναι η λειτουργία του ως ανοδικός μεσολαβητής της MAPK, προάγοντας την έκφραση των ADAMTS4, ADAMTS5 και κυκλοοξυγενάσης 2 (Cox-2) σε αρθρικά χονδροκύτταρα αρουραίου που διεγείρονται με IL-1β²⁶².

Πολυάριθμες μελέτες αναφέρουν ότι η απόπτωση των χονδροκυττάρων είναι ένα κεντρικό χαρακτηριστικό της παθογένειας της ΟΑ^{263–267}. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από την οικογένεια γονιδίων *Bcl-2* (B-cell CLL/lymphoma 2) είναι κύρια ρυθμιστικά στοιχεία της

αποπτωτικής οδού^{268,269}. Τα μέλη της οικογένειας, συμπεριλαμβανομένου της Bcl-2, είναι ενσωματωμένες πρωτεΐνες της μιτοχονδριακής μεμβράνης, οι οποίες μπορούν να αναστείλουν την απόπτωση. Τα προ-αποπτωτικά προϊόντα BAX (BCL2-associated X protein), εντοπίζονται στον κυτταροσκελετό σε υγιή κύτταρα, ωστόσο, μετά από ένα σήμα θανάτου, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με αποτέλεσμα τον ετεροδιμερισμό και την αναστολή των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, ξεκινώντας έτσι την απόπτωση²⁷⁰⁻²⁷². Η αναλογία έκφρασης του BCL2 προς το BAX φαίνεται να είναι ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας της ευαισθησίας των κυττάρων στην απόπτωση^{268,273}. Μελέτες έχουν ενοχοποιήσει την οικογένεια αποπτωτικών γονιδίων *BCL2* στη ρύθμιση της απόπτωσης των χονδροκυττάρων και της αποικοδόμησης του χόνδρου^{265,266}. Τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του BAX και του BCL2 είναι ανιχνεύσιμα σε χονδροκύτταρα οστεοαρθρικού και φυσιολογικού χόνδρου. Επιπλέον, τα επίπεδα πρωτεΐνης τους στην ΟΑ αναφέρεται ότι διαφοροποιούνται σε σύγκριση με εκείνα του φυσιολογικού χόνδρου, με διαφορές στα πρότυπα έκφρασής τους μεταξύ βλαβών και μη βλαβών περιοχών του ίδιου οστεοαρθρικού χόνδρου²⁷⁴.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό των αρθρικών χονδροκυττάρων είναι ότι παρουσιάζουν μείωση στην πολλαπλασιαστική και στη συνθετική τους ικανότητα που σχετίζεται με τη γήρανση. Η Sirtuin 1 (SIRT1) είναι μια εξαρτώμενη από το NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) απακετυλάση ιστονών. Η SIRT-1, έχει συσχετιστεί με πολλές ασθένειες της γήρανσης²⁷⁵ και θεωρείται ως ένας πολύ σημαντικός μεταβολικός ρυθμιστής²⁷⁶. Μαζί με το φυσικό ενεργοποιητή της, τη ρεσβερατρόλη, έχει βρεθεί να συμμετέχει στη παθογένεια της ΟΑ²⁷⁷. Η έκφραση της SIRT1 σε ΟΑ χόνδρο μειώνεται στην εξέλιξη της νόσου^{278,279} ενώ μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (ECM)²⁷⁹⁻²⁸² του χόνδρου, να προωθήσει τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων σε χονδροκύτταρα, να έχει αντικαταβολικό, αντιφλεγμονώδη^{283,284}, αντιοξειδωτικό²⁸⁵ και αντι-αποπτωτικό ρόλο, να συμμετέχει στην διαδικασία της αυτοφαγίας²⁸⁶ και να ρυθμίζει την ομοιόσταση των οστών στην ΟΑ²⁸⁷. Η ρεσβερατρόλη μπορεί να ενεργοποιήσει τη SIRT-1 προκειμένου να αναστείλει την εξέλιξη της νόσου της ΟΑ²⁸⁸. Επιπλέον, μελέτες έχουν αναδείξει ότι η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι μια μεταβολική νόσος που συνδέεται με την απορρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων και την έξοδο της χοληστερόλης²⁸⁹.

Το γονίδιο της αναγωγάσης του μεβαλονικού οξέος (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase, *HMGCR*), παράγει ένα ένζυμο που καταλύει το κυριότερο στάδιο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης χοληστερόλης²⁹⁰. Η έκφραση της *HMGCR*, παρατηρήθηκε ότι ήταν αυξημένη σε ΟΑ χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Σε μια προηγούμενη μελέτη, η ερευνητική μας ομάδα έδειξε ότι ανοδική ρύθμιση του ITGAV και του TGF-β οδηγεί σε

ενεργοποίηση φωσφο-PI3K και φωσφο-Akt που με τη σειρά τους προκαλούν υπερέκφραση του SREBP-2 και του γονιδίου στόχου του HMGCR που συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα MMP-13, στην ΟΑ²⁹¹.

Η αναστολή της αναγωγής HMG-CoA οδηγεί σε μειωμένη σύνθεση ενός μεταβολίτη που ονομάζεται μεβαλονικό, μειώνοντας έτσι τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης στα επόμενα στάδια. Οι στατίνες δρουν ως ανταγωνιστικός αναστολέας της αναγωγής β-υδροξυ β-μεθυλγλουταρυλ-CoA (HMG-CoA) και χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διαχείριση της υπερχοληστερολαιμίας. Με αυτόν τον μηχανισμό, μελέτες με στατίνες όπως η ατορβαστατίνη και η σιμβαστατίνη πραγματοποιούνται ώστε να αξιολογηθεί αν η χορήγηση συμβάλλει στη πρόσληψη της οστεοαρθρίτιδας²⁹².

Συνοψίζοντας, τα παραπάνω γονίδια διαδραματίζουν πολύπλοκο ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της Οστεοαρθρίτιδας και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους αλλά και με περιβαλλοντικούς παράγοντες δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητές. Η εύρεση μορίων που ρυθμίζουν πολλαπλά γονίδια σημαντικά για την ΟΑ, αποτελεί μια προσέγγιση που θα συνεισφέρει στη κατανόηση του μηχανισμού της ΟΑ και θα αναδείξει νέους θεραπευτικούς στόχους για την αντιμετώπιση της.

A.5 Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση miRNAs που ενέχονται σε σημαντικές διαδικασίες σχετικές με την παθογένεια της ΟΑ και η ανεύρεση του πιθανού μηχανισμού δράσης τους προκειμένου να αναδειχθούν miRNAs που θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς σημαντικούς προγνωστικούς ή θεραπευτικούς στόχους για την ΟΑ.

Συγκεκριμένα, στη παρούσα διατριβή μελετήθηκαν:

- Τα προφίλ έκφρασης miRNAs στον ορό ατόμων με ΟΑ σε σχέση με υγιή άτομα με τη χρήση μικροσυστοιχιών (microarrays) υψηλής ευκρίνειας (arrayCGH).
- Η διαγνωστική αξία των διαφοροποιημένων miRNAs στον ορό, με τον υπολογισμό καμπύλων ROC.
- Τα προβλεπόμενα μονοπάτια και γονίδια στόχοι των διαφοροποιημένων miRNAs με εργαλεία βιοπληροφορικής.
- Η έκφραση συγκεκριμένων miRNAs (hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p, and hsa-miR-671-3p) με διαφοροποιημένη έκφραση στον ορό ατόμων με ΟΑ και υγιών ατόμων με την μέθοδο qRT-PCR
- Η έκφραση συγκεκριμένων miRNAs (hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p, and hsa-miR-671-3p) με την μέθοδο qRT-PCR σε χονδροκύτταρα προερχόμενα από άτομα με ΟΑ και υγιή άτομα.
- Τα γονίδια στόχοι, τα σηματοδοτικά μονοπάτια και τα δίκτυα που ρυθμίζει το miR-140-3p και σχετίζονται με την ΟΑ, με εργαλεία βιοπληροφορικής.
- Η έκφραση του γονιδίου *PTEN* σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων.
- Ο ρόλος του miR-140-3p στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου στόχου *PTEN* μετά από τη χορήγηση του miR-140-3p mimic σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων.
- Ο ρόλος του miR-140-3p στη ρύθμιση της έκφρασης των πιθανών γονιδίων στόχων *TGFα*, *BCL-2*, *SIRT-1*, *HMGCR* και *HDAC4* μετά από τη χορήγηση του miR-140-3p mimic σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων.
- Ο ρόλος του miR-140-3p στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου μέσω της μελέτης της έκφρασης μοριακών δεικτών της ομοιοστασίας του χόνδρου μετά από τη χορήγηση του miR-140-3p mimic σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1.1 Συλλογή δειγμάτων

Στη συγκεκριμένη μελέτη, συλλέχθηκαν δείγματα αρθρικού χόνδρου και ορού από περιφερικό αίμα από άτομα που προσήλθαν στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Συμμετέχοντες στη μελέτη:

Η μελέτη περιλάμβανε δύο ομάδες συμμετεχόντων: την ομάδα ασθενών με ΟΑ γόνατος ή/και ισχίου και την ομάδα ελέγχου (υγιή άτομα).

Α) Η ομάδα των ΟΑ ασθενών αποτελούνταν από 12 άτομα (3 άνδρες και 9 γυναίκες) με μέση ηλικία $69,83 \pm 4,83$ έτη, τα οποία είχαν υποβληθεί σε ολική αρθροπλαστική γόνατος ή ισχίου λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ. Ασθενείς που είχαν διαγνωστεί με ρευματοειδή αρθρίτιδα, αυτοάνοσα νοσήματα, σηπτική αρθρίτιδα και μετατραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Β) Η ομάδα ελέγχου περιλάμβανε 12 άτομα (6 άνδρες και 6 γυναίκες) με μέση ηλικία $64,25 \pm 5,04$ έτη, που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική αποκατάσταση κατάγματος ή ακρωτηριασμό και δεν είχαν ιστορικό παθήσεων των αρθρώσεων ή ΟΑ αλλοιώσεων, όπως επιβεβαιώθηκε από την ακτινολογική εξέταση.

Συλλογή δεδομένων:

Τα κλινικά δεδομένα από τις δύο ομάδες καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας μια εξειδικευμένη φόρμα. Οι πληροφορίες που συλλέχθηκαν περιλάμβαναν, φύλο, ηλικία, Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ), φυσική κατάσταση, δυσκαμψία στις αρθρώσεις, οίδημα, παρουσία πόνου, παρουσία οστεοφύτων και τη ύπαρξη άλλων ασθενειών.

Ακτινογραφική αξιολόγηση:

Για να εκτιμηθεί η βαρύτητα της ΟΑ, όλοι οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε ακτινολογική εξέταση των προσβεβλημένων αρθρώσεων. Οι ακτινογραφίες βαθμολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το σύστημα Kellgren-Lawrence^{293,294}, το οποίο κατηγοριοποιεί τη σοβαρότητα της ΟΑ σε πέντε κατηγορίες: 0: φυσιολογική άρθρωση, 1: ελάχιστα οστεόφυτα, 2: σαφή οστεόφυτα, 3: οστεόφυτα και στένωση μεσαρθρίου διαστήματος, 4: οστεόφυτα, στένωση μεσαρθρίου διαστήματος και σκλήρυνση υποχόνδριου οστού. Όλα τα άτομα από την ομάδα ΟΑ είχαν βαθμολογία Kellgren-Lawrence τουλάχιστον 3. Συγκεκριμένα, 3 ασθενείς

στην ομάδα ΟΑ ταξινομήθηκαν στη κατηγορία 3, ενώ 9 ασθενείς ταξινομήθηκαν στη κατηγορία 4. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ατόμων με ΟΑ και της ομάδας ελέγχου περιέχονται στο **πίνακα 1**.

Δεοντολογία:

Η συγκατάθεση ελήφθη μεμονωμένα από όλους τους συμμετέχοντες που συμμετείχαν στη μελέτη. Όλα τα άτομα που συμπεριλήφθηκαν στην έρευνα ήταν Ελληνικής καταγωγής. Το πρωτόκολλο μελέτης τηρεί τον κώδικα ηθικής και δεοντολογίας που περιγράφεται στη Διακήρυξη του Ελσίνκι (1975) και έλαβε έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Δείγμα	Ομάδα	Φύλο	Ηλικία	BMI	K-L score
01OA	OA	F	68	29	4
02OA	OA	M	69	29	4
03OA	OA	F	64	33,3	4
04OA	OA	F	77	33	3
05OA	OA	F	70	28	3
06OA	OA	M	71	28,5	4
07OA	OA	M	63	34,59	3
08OA	OA	F	66	27,6	4
09OA	OA	F	77	28	3
10OA	OA	F	66	32,4	4
11OA	OA	F	76	30,5	4
12OA	OA	F	71	39,1	4
1A	Control	F	65	23,79	0
2A	Control	M	75	23,5	0
3A	Control	F	63	22	0
4A	Control	M	68	29,74	0
5A	Control	M	66	29,38	0
6A	Control	F	60	23	0
7A	Control	F	68	28	0
8A	Control	M	64	29	0
9A	Control	M	63	27	0
10A	Control	F	54	30	0
11A	Control	F	63	21,6	0
12A	Control	F	62	20,2	0

Πίνακας 1: Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ατόμων με ΟΑ και της ομάδας ελέγχου (Control).

B.1.2 Συλλογή ορού από δείγματα περιφερικού αίματος

I. Βασικές αρχές της μεθόδου:

Το πλάσμα αίματος είναι το υγρό συστατικό του αίματος, στο οποίο αιωρούνται κύτταρα του αίματος. Αποτελείται κυρίως από νερό (90% κατ'όγκο) και περιέχει διαλυμένες πρωτεΐνες, γλυκόζη, παράγοντες πήξης, ανόργανα ιόντα, ορμόνες και διοξείδιο του άνθρακα. Το πλάσμα προέρχεται από το υπερκείμενο υγρό που παράγεται μετά την φυγοκέντρηση του αίματος. Το αίμα, μετά την αιμοληψία τοποθετείται σε ειδικό φιαλίδιο το οποίο περιέχει ένα αντιπηκτικό όπως ηπαρίνη, οξαλικό ή αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA). Αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητη για να αποφευχθεί η πήξη του αίματος. Ο ορός του αίματος αποτελείται από το πλάσμα χωρίς το ινωδογόνο ή άλλους παράγοντες πήξης. Ο ορός είναι καθαρότερος από το πλάσμα γιατί περιέχει λιγότερες πρωτεΐνες. Προκειμένου να συλλεχθούν δείγματα ορού, από το περιφερικό αίμα των ατόμων που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη, ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο.

II. Πρωτόκολλο συλλογής ορού από περιφερικό αίμα

Η συλλογή του ολικού περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε σε Sarstedt S-Monovette® Serum-Gel 9 ml φιαλίδια (cat. no. 02.1388), τα οποία περιέχουν ενεργοποιητές πήξης.

1. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά στις 1500 rpm, στους 4^ο C.
2. Μεταφορά του ανώτερου υδατικού στρώματος σε ένα νέο φιαλίδιο, (τύπου Eppendorf) χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση στιβάδα (η οποία θα περιέχει λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια).
3. Τα δείγματα ορού, φυλάσσονται στους -80^ο C μέχρι το επόμενο στάδιο.

B.1.3 Απομόνωση RNA από δείγματα ορού περιφερικού αίματος

Η απομόνωση καθαρού και ακέραιου ολικού RNA καθώς και των μικρών μη κωδικών. RNAs (miRNAs) από τον ορό του αίματος των ατόμων με ΟΑ και των υγιών ατόμων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του RiboEX™LS (GeneAll, Seoul, Korea).

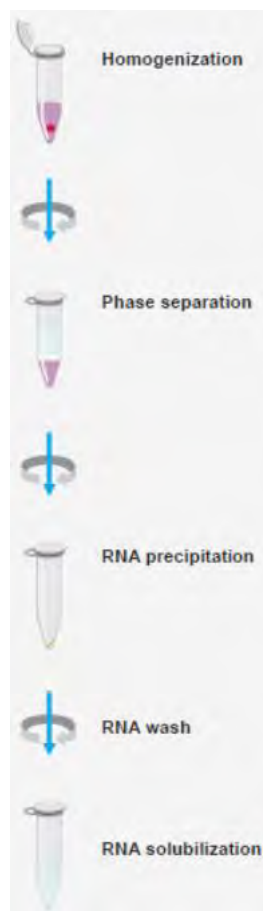
I. Υλικά απομόνωσης RNA (δείγματα ορού):

- ✓ RiboEXTMLS (GeneAll, Seoul, Korea)
- ✓ Nuclease-free Water
- ✓ RNase-free centrifuge tubes
- ✓ 100% ισοπροπανόλη

✓ 100% αιθανόλη

II. Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA δειγμάτων ορού:

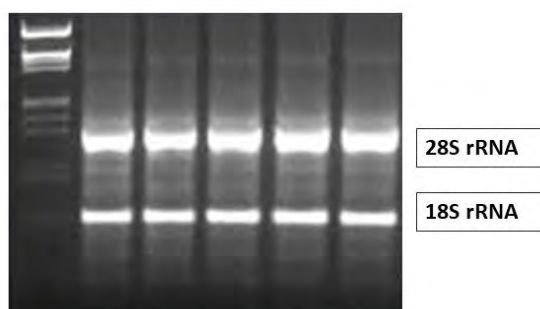
1. Ανάμιξη 0,25 ml δείγμα ορού με 0,75 ml RiboEx™ LS με και vortex.
2. Επώαση του ομογενοποιημένου για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προσθήκη 0,2 ml χλωροφορμίου. Ανάμιξη για 15 sec και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Φυγοκέντρηση στα 12,000 x g για 15 λεπτά στους 4°C, μεταφορά της ανώτερης υδατικής φάσης σε νέο eppendorf. Το μείγμα διαχωρίζεται σε κατώτερη φάση, ενδιάμεση φάση και μια άχρωμη ανώτερη υδατική φάση.
5. Προσθήκη 0,2 ml ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση του διαλύματος.
6. Επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Φυγοκέντρηση στους 12.000 x g για 10 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια πραγματοποιείται προσεκτική απόρριψη του υπερκείμενου, χωρίς να διαταραχθεί η το ίζημα. Το κατακρημνισμένο RNA σχηματίζει ίζημα στο πάτο του eppendorf.
8. Προσθήκη 75% αιθανόλης για να καθαριστεί το ίζημα, στο οποίο περιέχεται το RNA.
9. Φυγοκέντρηση στις 7.500 x g για 5 λεπτά στους 4°C. Προσεκτική απόρριψη του υπερκείμενου και τοποθέτηση για 5 λεπτά στο κλίβανο για να στεγνώσει η αιθανόλη.
10. Διάλυση RNA σε RNAase free water με επώαση για 15 λεπτά στους 56°C.
11. Αποθήκευση του RNA στους -80 °C.



Εικόνα 17: Τα στάδια της απομόνωσης του RNA από δείγματα ορού με το kit RiboEXTMLS.

III. Έλεγχος της ποσότητας και της ποιότητας του RNA.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας και της ποιότητας του RNA πραγματοποιήθηκε με την χρήση του φωτόμετρου (NanoDrop® ND-1000 UV-vis, Nanogen Inc). Επίσης πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ποιότητας του RNA μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 2% .



Εικόνα 18: Απεικόνιση των δειγμάτων RNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε gel 2%.

B.1.4 Μικροσυστοιχίες miRNA (miRNA microarrays)

Η ανεύρεση miRNAs σε ευρεία κλίμακα, με διαφοροποιημένη έκφραση στον ορό ασθενών με ΟΑ σε σχέση με υγιή άτομα πραγματοποιήθηκε με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (microarrays).

I. Βασικές αρχές της μεθόδου:

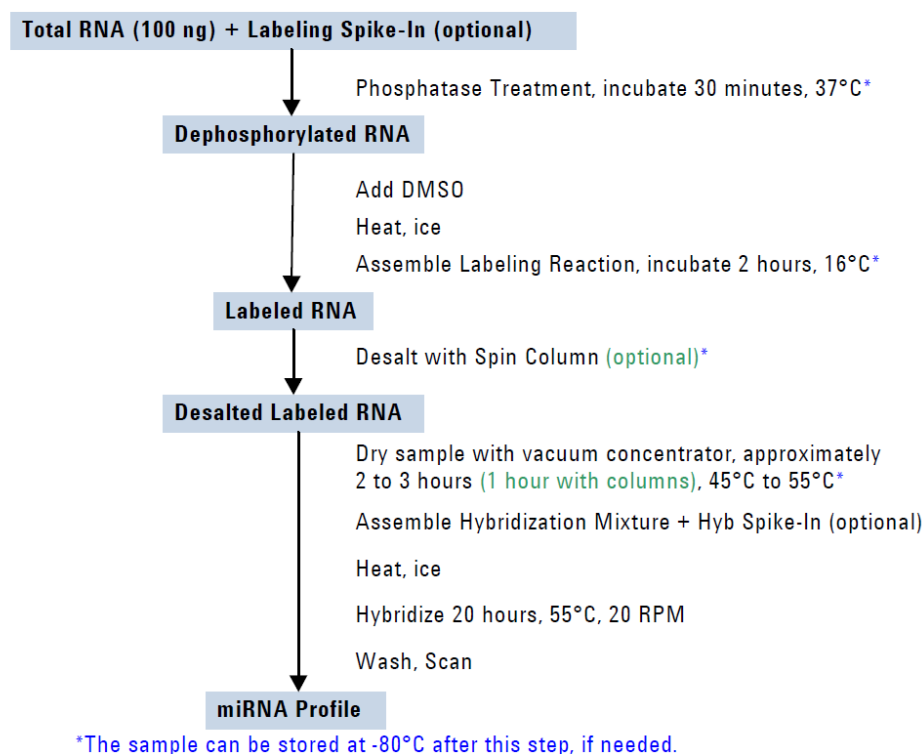
Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών είναι μια υψηλής απόδοσης τεχνολογία που επιτρέπει τη παραγωγή δεδομένων σε μεγάλη κλίμακα από γενετικούς τόπους, μεταγραφικά επίπεδα, CNVs, SNPs και επιγενετικές τροποποιήσεις. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην συμπληρωματικότητα μεταξύ νουκλεϊκών οξέων (DNA-DNA ή DNA-RNA) ή μεταξύ αμινοξέων-πρωτεϊνών, υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και χρησιμοποιώντας φθορίζουσες ουσίες. Οι μικροσυστοιχίες γονιδίων ουσιαστικά είναι μια διάταξη χιλιάδων μικροσκοπικών σημείων που αντιπροσωπεύουν ολιγονουκλεοτίδια που ονομάζονται ανιχνευτές. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά, ακινητοποιούνται με ομοιοπολικούς δεσμούς σε μία στερεή επιφάνεια και μπορούν να υβριδοποιηθούν με cDNA ή RNA δείγματα. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση του υβριδισμού πραγματοποιείται με τη χρήση φθορίζουσών ουσιών και ειδικά σχεδιασμένων βιοπληροφορικών αλγορίθμων²⁹⁵.

Πρόσφατα, έχει αναπτυχθεί η τεχνολογία μικροσυστοιχιών για την ανίχνευση miRNAs όπου βασίζεται στις ίδιες αρχές και χρησιμοποιείται σε πολλούς ερευνητικούς τομείς. Αρκετές πλατφόρμες μέτρησης του προφίλ έκφρασης των miRNAs είναι διαθέσιμες στο εμπόριο και κάθε κατασκευαστής έχει αναπτύξει τις δικές του τεχνικές διαδικασίες για τη μεγιστοποίηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας.

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα της Agilent (SurePrint G3 platform, 8x60K, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) η οποία περιέχει probes για την ανίχνευση ανθρώπινων 2.549 miRNAs.

II. Πρωτόκολλο miRNA μικροσυστοιχιών:

Στα δείγματα του RNA, που απομονώθηκαν από τον ορό, προστέθηκε spike-in με την χρήση του microRNA Spike-In Kit (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA) για την αξιολόγηση της απόδοσης της σήμανσης και της υβριδοποίησης. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σήμανση και υβριδισμός του RNA (miRNA Complete Labeling and Hybridization Kit Technologies, Agilent) σε πλατφόρμα της Agilent (SurePrint G3 platform, 8x60K, Agilent Technologies). Η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 55° C για 20 ώρες (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Διάγραμμα ροής της διαδικασίας ανεύρεσης miRNAs με τη τεχνική των μικροσυστοιχιών (miRNA microarrays).

Αναλυτικότερα:

Για τη διαδικασία των miRNA microarrays, χρησιμοποιήθηκαν τα microRNA Spike-In Kit και miRNA Complete Labeling and Hyb kit (Agilent Technologies, Inc). Το miRNA Complete Labeling and Hyb kit παρέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για τη σήμανση των δειγμάτων και την προετοιμασία το υβριδισμού. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει τη σύνδεση ενός μορίου κυανίνης 3-pCp στο 3' άκρο ενός μορίου RNA με αποτελεσματικότητα μεγαλύτερη από 90%.

A. Προετοιμασία των δειγμάτων και σήμανση

Βήμα 1. microRNA Spike-In Kit

Το microRNA Spike-In Kit αποτελείται από δύο microRNA Spike-In διαλύματα. Η χρήση των διαλυμάτων συμβάλλει στην διάκριση των βιολογικών δεδομένων από διαφορές που οφείλονται στο πειραματικό χειρισμό. Το Labeling Spike-In διάλυμα χρησιμοποιείται κατά τη

σήμανση ενώ το Hyb Spike-In διάλυμα χρησιμοποιείται κατά τον υβριδισμό. Για τη προετοιμασία των spike-in διαλυμάτων πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Βήμα 2. Αποφωσφορυλίωση των δειγμάτων

1. Διαλύουμε το συνολικό δείγμα RNA σε 50 ng/μL με DNase/RNase-free απεσταγμένο νερό.
2. Προσθήκη 2 μL (100 ng) του διαλυμένου συνολικού RNA σε ένα 1.5 mL eppendorf και διατήρηση στο πάγο.
3. Προσθήκη των συστατικών όπως φαίνεται και στο πίνακα για τη δημιουργία του CIP Master Mix (Πίνακας 2).
4. Διατήρηση στο πάγο.

Υλικά	Όγκος/ αντίδραση (μl)
10x Calf Intestinal Phosphatase buffer	0,4
3o Dilution labeling spike-in διάλυμα/ nuclease free water	1,1
Calf intestinal phosphatase	0,5
Συνολικός όγκος	2,0

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια για την αποφωσφορυλίωση των δειγμάτων (miRNA microarrays).

5. Προσθήκη 2 μL του CIP Master Mix σε κάθε δείγμα, ώστε ο τελικός όγκος του μίγματος να είναι of 4 μl. Ήπια ανάδευση με vortex.
6. Επώαση του μίγματος στους 37°C σε υδατόλουτρο με ανάδευση για 30 λεπτά, προκειμένου να αποφωσφορυλιωθεί το δείγμα.

Βήμα 3. Αποδιάταξη του δείγματος

1. Προσθήκη 2.8 μl DMSO σε κάθε δείγμα.
2. Επώαση των δειγμάτων στους 100°C σε υδατόλουτρο με ανάδευση για 5-10 λεπτά.
3. Άμεση μεταφορά στο πάγο.

Βήμα 4. Σύνδεση των μορίων RNA με μόρια κυανίνης 3-pCp

1. Θέρμανση του ρυθμιστικού διαλύματος 10x T4 RNA λιγάσης στους 37 ° C και ανάμιξη στο vortex μέχρι να διαλυθεί όλο το ίζημα.
2. Αμέσως πριν τη χρήση, προετοιμασία του Ligation Master Mix.

Υλικά	Όγκος/ αντίδραση (μl)
10x T4 RNA Ligase buffer	1
Cyanine 3-pCp	3
T4 RNA Ligase	0.5
Συνολικός Όγκος	4.5

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια για σύνδεση των μορίων RNA με μόρια κυανίνης 3-pCp (ligation) (miRNA microarrays).

3. Προσθήκη 4.5 μl του Ligation Master Mix σε κάθε δείγμα ώστε να έχω τελικό όγκο 11.3 μL.
4. Ήπια ανάδευση με τη πιπέτα και φυγοκέντρηση
5. Επώαση στους 16°C σε υδατόλουτρο με ανάδευση για 2 ώρες.

Βήμα 6. Στέγνωμα του δείγματος

1. Στη συνέχεια πραγματοποιείται στέγνωμα των δειγμάτων στους 55°C για 1-3 ώρες.

B. Υβριδοποίηση των microarrays:

Βήμα 1. Προετοιμασία του 10x Blocking Agent

Προσθήκη 125 μL ddH₂O στο φιαλίδιο του λυοφιλοποιημένου 10x Gene Expression Blocking Agent που περιέχεται μέσα miRNA Complete Labeling and Hyb kit και vortex.

Βήμα 2. Προετοιμασία των δειγμάτων υβριδισμού

1. Ρύθμιση του το υδατόλουτρου στους 100°C
2. Επαναδιάλυση του αποξηραμένου δείγματος σε 17 μl νερό χωρίς RNase.
3. Για κάθε μικροσυστοιχία, προστίθεται το καθένα από τα συστατικά όπως υποδεικνύεται στον πίνακα, σε ένα 1,5 ml σωλήνα, τύπου Eppendorf (Πίνακας 4).
4. Καλή ανάμιξη με vortex.
5. Επώαση στους 100 ° C για 5 λεπτά.
6. Άμεση μεταφορά στο πάγο για 5 λεπτά.

Υλικά	Όγκος/ αντίδραση (μl)
Σημασμένο δείγμα miRNA	17
3ο διάλυμα Hyb Spike-in	1
10x Gene expression blocking agent	4,5
2x Hi-RPM Hybridization Buffer	22,5
Συνολικός όγκος	45

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια για τον υβριδισμό (miRNA microarrays).

Βήμα 3. Προετοιμασία της συσκευής υβριδισμού

1. Τοποθέτηση ενός ειδικού πλακιδίου υβριδισμού στο θάλαμο Agilent SureHyb με την ετικέτα στραμμένη προς τα πάνω και ευθυγραμμισμένη με το ορθογώνιο τμήμα της βάσης του θαλάμου.
2. Διαμοιράζουμε τον δείγμα υβριδισμού πάνω στο πηγαδάκι του πλακιδίου υβριδισμού.

Βήμα 4. Υβριδισμός

1. Τοποθετούνται τα πλακίδια υβριδισμού στο περιστρεφόμενο αναδευτήρα του κλιβάνου.
2. Υβριδισμός στους 55 ° C για 20 ώρες.

Γ. Πλύσεις των μικροσυστοιχιών

Βήμα 1. Προσθήκη 0.005% Triton X-102 (10%) στα Gene Expression wash buffer 1 και 2.

Βήμα 2. Θέρμανση του Gene Expression Wash Buffer 2 και του slide-staining dish στους 37°C.

Βήμα 3. Πλύση των πλακιδίων (slides) των μικροσυστοιχιών. Σύμφωνα με τις συνθήκες που αναγράφονται παρακάτω (Πίνακας 5).

1. Προσθήκη του Gene Expression Wash buffer 1 στο πιάτο # 1 σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προσθήκη του Gene Expression Wash buffer 1 στο πιάτο # 2 σε θερμοκρασία δωματίου. Τοποθέτηση του πιάτου #2 σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης.
3. Τοποθέτηση ενός προθερμασμένου γυάλινου δοχείου με 1,5 Lt νερό που περιέχει το πιάτο # 3 σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης με θέρμανση. Προσθήκη του Gene Expression

Wash Buffer 2 (θερμαίνεται στους 37 °C) στο πιάτο # 3 με μια μαγνητική ράβδο ανάδευσης. Διατήρηση της θερμοκρασίας του Gene Expression Wash Buffer 2 στους 37 °C.

4. Αφαίρεση του sandwich από το θάλαμο υβριδισμού και τοποθέτηση του στο πιάτο # 1 που περιέχει Gene Expression Wash Buffer 1.
5. Στη συνέχεια, αφαίρεση του πλακιδίου του microarray από το sandwich και τοποθέτηση του στο πιάτο #2 που περιέχει το Wash buffer 1 σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιείται για όλα τα πλακίδια των microarrays και ανάδευση για 5 λεπτά.
7. Μεταφορά όλων των πλακιδίων στο πιάτο # 3 που περιέχει το Gene Expression Wash Buffer 2 στους 37° C . Ανάδευση για 5 λεπτά.
8. Προσεκτική αφαίρεση των πλακιδίων των microarrays από το πιάτο #3.

Πιάτο	Wash buffer	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχικό ξέπλυμα	Gene Expression Wash buffer 1	Θερμοκρασία δωματίου	
1η πλύση	Gene Expression Wash buffer 1	Θερμοκρασία δωματίου	5 λεπτά
2η πλύση	Gene Expression Wash buffer 2	37° C	5 λεπτά

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια για τις πλύσεις (miRNA microarrays).

Βήμα 4. Τοποθέτηση των πλακιδίων στην ειδική τους θήκη

Α. Σκανάρισμα των πλακιδίων και εξαγωγή των αποτελεσμάτων

Τα σήματα του φθορισμού ανιχνεύτηκαν από το Agilent Microarray Scanner (G2565CA) με το Agilent Scan Control 7.0 software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

B.1.5 Ανάλυση των δεδομένων των microarrays

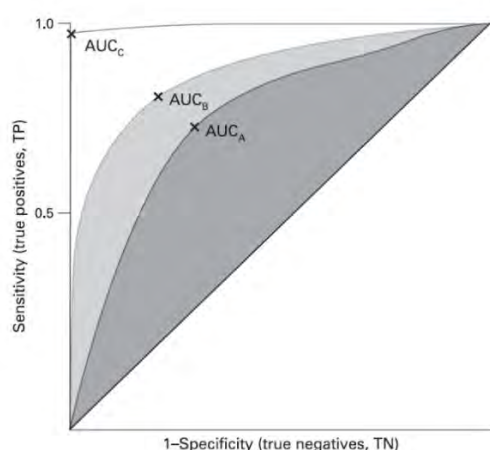
Οι παραμετρικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό της MATLAB® (The Mathworks, Inc, Natick, MA). Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλογα με την ένταση του σήματος. Με την χρήση του αλγορίθμου quantile πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των δεδομένων. Το two-tailed student t-test χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστούν οι μέσες διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Οι

συνεχείς μεταβλητές εκφράστηκαν ως η διάμεση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. Σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση εμφάνισαν τα miRNAs για τα οποία ίσχυε $p\text{-value} < 0,05$ και $FDR \leq 0,05$.

B.1.6 ROC Ανάλυση

I. Βασικές αρχές της μεθόδου

Η καμπύλη ROC είναι ένα εργαλείο για την αξιολόγηση της διαγνωστικής ικανότητας ενός βιοδείκτη. Παρέχει πληροφορίες για τη σχέση μεταξύ της ευαισθησίας και της ειδικότητας του βιοδείκτη. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC (AUC- Area Under the Curve), αποτελεί το κύριο κριτήριο που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του βιοδείκτη. Ειδικότερα, η περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC (AUC) μετράει την ικανότητα ενός μοντέλου να διακρίνει μεταξύ δυαδικών κλάσεων, όπως μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων. Όσο πιο κοντά είναι η AUC στο 1, τόσο καλύτερη είναι η ταξινόμηση που επιτυγχάνεται από το μοντέλο ²²⁰.



Εικόνα 20: Χαρακτηριστικά παραδείγματα ROC καμπύλης. Η διαγνωστική ακρίβεια του δείκτη C (λευκή περιοχή) είναι καλύτερη από αυτή του B και του A ²⁹⁶.

II. Μέθοδος

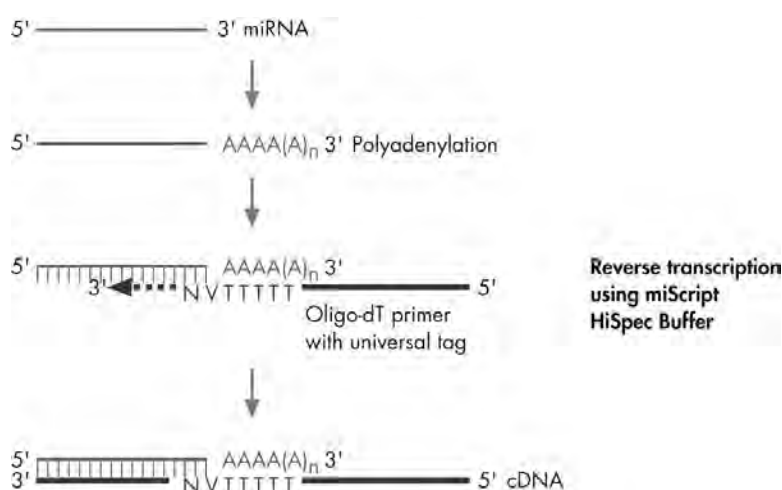
Η ROC (Receiver Operating Characteristic curves) ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο προγραμματιστικό περιβάλλον MATLAB® προκειμένου να υπολογιστεί η τιμή AUC με τυπικό σφάλμα (standard error) και 95% διάστημα εμπιστοσύνης (confidence intervals). Οι καμπύλες ROC θεωρήθηκαν σημαντικές με τιμή $AUC > 0,8$ και τιμή $p < 0,05$.

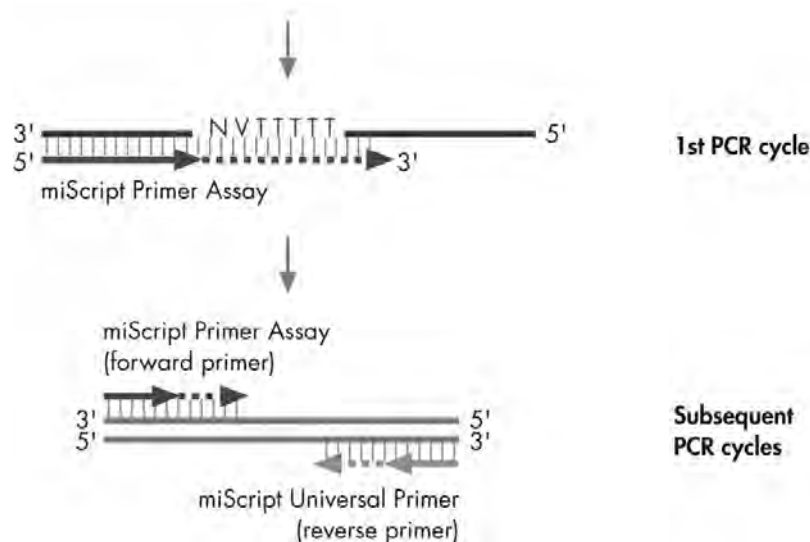
B.1.7 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) από RNA δειγμάτων ορού

Το συνολικό RNA που απομονώθηκε από τα δείγματα ορού μετατράπηκε σε συμπληρωματικό DNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής *in vitro*, χρησιμοποιώντας MiScript II Reverse Transcription Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA).

I. Βασικές αρχές της μεθόδου

Τα ώριμα miRNAs έχουν μήκος, περίπου 22 νουκλεοτιδίων. Σε αντίθεση με τα mRNAs, τα miRNAs δεν είναι πολυαδενυλιωμένα από τη φύση τους. Κατά την αντίστροφη μεταγραφή με το miScript HiSpec Buffer που περιέχεται στο MiScript II Reverse Transcription Kit, τα ώριμα miRNA μετατρέπονται επιλεκτικά σε cDNA. Ειδικότερα, τα ώριμα πολυαδενυλιώνονται με τη πολυ-A πολυμεράση και στην συνέχεια μεταγράφονται σε cDNA με τη χρήση oligo-dT εκκινήτων (Εικόνα 21). Η πολυαδενυλίωση και η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιούνται παράλληλα. Οι oligo-dT εκκινήτες έχουν μια 3' εκφυλισμένη άγκυρα και μια γενική αλληλουχία ετικέτας στο 5' άκρο (universal tag sequence) επιτρέποντας την ενίσχυση του ώριμου miRNA κατά το στάδιο της PCR πραγματικού χρόνου. Κατά το επόμενο στάδιο, οι miScript primer assays, που χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με το MiScript SYBR Green PCR Kit, επιτρέπουν την ποσοτικοποίηση του ώριμου miRNA με το miScript PCR System. Ο συνδυασμός πολυαδενυλίωσης και η καθολική προσθήκη ετικετών εξασφαλίζει ότι οι miScript Primer Assays δεν ανιχνεύουν γενωμικό DNA (Εικόνα 21).





Εικόνα 21: Επιλεκτική μετατροπή ώριμων miRNAs σε cDNA με miScript HiSpec Buffer. Σε μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με miScript HiSpec Buffer, τα ώριμα miRNAs πολυαδενυλώνονται με τη πόλυ(A) πολυμεράση και μετατρέπονται σε cDNA από την αντίστροφη μεταγραφάση. Στη συνέχεια, το cDNA χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του ώριμου miRNA με τη μέθοδο της Real Time PCR.

II. Υλικά για τη σύνθεση cDNA από RNA δειγμάτων ορού

- MiScript II Reverse Transcription Kit (QIAGEN Inc)
 - 10x miScript Nucleics mix
 - 5x miScript HiSpec Buffer/ HiFlex Buffer
 - miScript Reverse Transcriptase Mix
- RNase free water

III. Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA από RNA δειγμάτων ορού

Για τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, χρησιμοποιήθηκαν 100 ng ολικού RNA και ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20 μl.

Διαδικασία

1. Ξεπαγώνουμε το RNA, το 10x miScript Nucleics Mix και το RNase free water στο πάγο.
2. Προσθήκη των RNA δειγμάτων σε κάθε σωληνάριο που περιέχει το mix της αντίστροφης μεταγραφής (reverse-transcription master mix). Ακολουθεί προσθήκη του RNase free water και του 5x miScript HiSpec Buffer/ HiFlex Buffer σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C). Ήπια ανάδευση των φιαλιδίων τοποθέτηση στο πάγο.
3. Προετοιμασία του mix, και διαμοιρασμός σε σωληνάρια 500 μl.

4. Ανάμιξη και τοποθέτηση στο πάγο.
5. Τοποθέτηση των σωληναρίων στο θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις συνθήκες που αναγράφονται παρακάτω (Πίνακας 6, Πίνακας 7).

Υλικά	Όγκος
5x miScript HiSpec Buffer	4 μ l
10x miScript Nucleics Mix	2 μ l
RNase-free water	9 μ l
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 μ l
RNA	3 μ l
Συνολικός όγκος	4 μl

Πίνακας 6: Ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη σύνθεση του cDNA από RNA δειγμάτων ορού.

Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια
37°C	60 min
95°C	5 min
4°C	∞

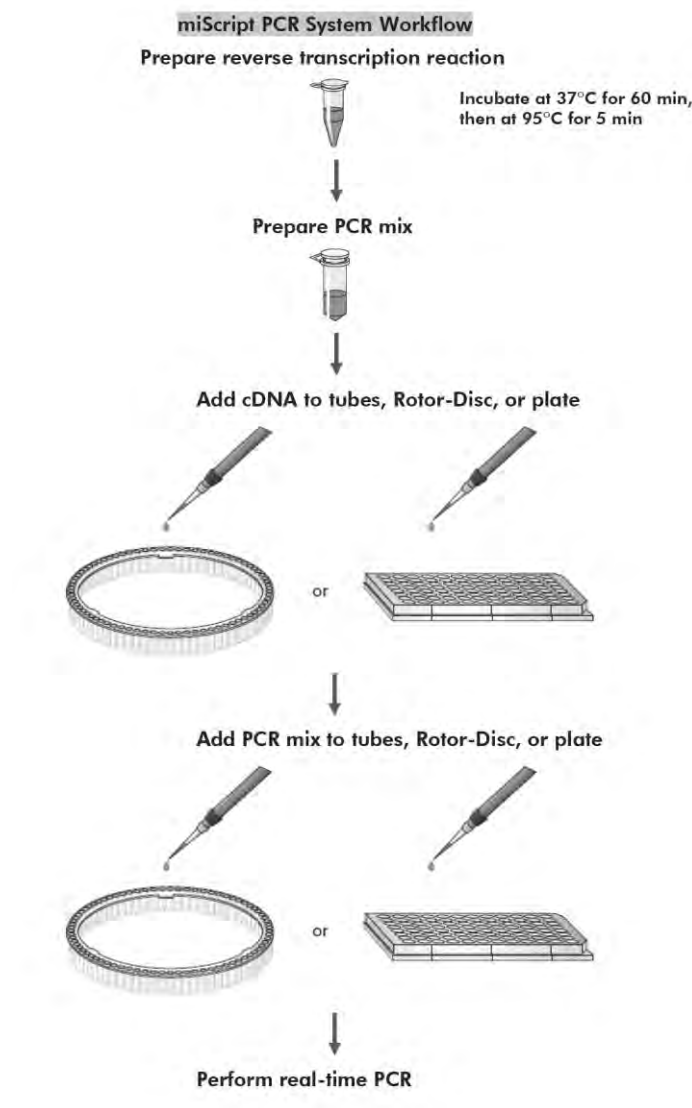
Πίνακας 7: Συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή για τη σύνθεση του cDNA από RNA δειγμάτων ορού.

B.1.9 Σχετική ποσοτικοποίηση miRNAs με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) με τη χρήση του miScript SYBR® Green PCR Kit σε δείγματα ορού.

Η έκφραση των ώριμων miRNAs, hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p and hsa-miR-671-3p), τα οποία βρέθηκαν διαφοροποιημένα με την τεχνική των miRNA μικροσυστοιχιών, ελέγχθηκε στον ορό 12 ΟΑ ατόμων και 12 ατόμων της ομάδας ελέγχου, με τη μέθοδο Real Time PCR.

Η σχετική ποσοτικοποίηση των miRNAs των hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p and hsa-miR-671- 3p πραγματοποιήθηκε τη χρήση του miScript SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) and MiScript Primer Assays (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA), στο ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Οι αντιδράσεις διεξήχθησαν εις διπλούν. Το hsa-miR-25-1 χρησιμοποιήθηκε ως ενδογενής μάρτυρας, καθώς παρουσίαζε ελάχιστη διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων των φυσιολογικών ατόμων και των ασθενών στην ανάλυση της miRNA μικροσυστοιχίας. Επίσης επιβεβαιώθηκε η σταθερότητά του χρησιμοποιώντας το λογισμικό NormFinder²⁹⁷. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta CT}$.



Εικόνα 7: Απεικόνιση της διαδικασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) με τη χρήση του miScript SYBR® Green PCR Kit.

I. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των επιλεγμένων miRNAs σε δείγματα ορού με τη Real-time PCR

- cDNA
- miScript Primer Assay
- miScript SYBR Green PCR Kit
 - miScript Universal Primer
 - QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix

- RNase-free water

II. Πρωτόκολλο Real-time PCR τη χρήση του miScript SYBR® Green PCR:

1. Προετοιμασία μείγματος αντίδρασης (Πίνακας 8).
2. Μοίρασμα 8 μl από το μείγμα σε κάθε πηγαδάκι και 2 μl cDNA.
3. Καλή ανάμιξη
4. Σφράγισμα με ειδική ταινία
5. Φόρτωση του plate στο μηχάνημα, με τις συνθήκες που αναγράφονται παρακάτω (Πίνακας 9).

Υλικά	Όγκος
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	5 μl
10x miScript Universal Primer	1 μl
10x miScript Primer Assay	1 μl
RNase-free water	1 μl
cDNA	2 μl
Συνολικός όγκος	10 μl

Πίνακας 8: Ποσότητες των αντιδραστηριών για τη real-time PCR των ώριμων miRNAs με τη χρήση 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix.

Στάδιο	Χρόνος	Θερμοκρασία
PCR Initial activation step	15 min	95°C
3-step cycling:		
Αποδιάταξη	15 s	94°C
Annealing	30 s	55°C
Επέκταση	30 s	70°C
Κύκλοι PCR	40 κύκλοι	

Πίνακας 9: Συνθήκες της real-time PCR των ώριμων miRNAs με τη χρήση του 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix.

B.1.10 Καλλιέργειες οστεοαρθριτικών και φυσιολογικών χονδροκυττάρων

I. Συνθήκες της καλλιέργειας

Τα δείγματα αρθρικού χόνδρου που ελήφθησαν άσηπτα κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης, τεμαχίστηκαν και υπέστησαν ενζυμική διάσπαση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας με προνάση και κολλαγενάση.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μεταφορά των χονδροκυττάρων σε φλάσκα 25cm³ ή 75 cm³ και προσθήκη θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε κλίβανο (Heraus Group), σε κατάλληλες σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (37° C), υγρασίας και CO₂ (5 %). Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε στείρο χώρο και όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

II. Υλικά για την απομόνωση και καλλιέργεια των χονδροκυττάρων

- Προνάση (Roche)
- Κολλαγενάση (Roche)
- Θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F-12 (DMEM/F-12, GIBCO BRL, UK)
- Ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco), όπου προστίθενται σε αναλογία 10% του όγκου του θρεπτικού DMEM, οι παράγοντες που περιέχει συμβάλλουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό
- Αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin (P/S)) σε αναλογία 1% του όγκου του θρεπτικού DMEM.
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (HyClone)

III. Πρωτόκολλο απομόνωσης και καλλιέργειας των χονδροκυττάρων

- Έκλυση του ιστού με PBS για απαλλαγή από υπολείμματα του χειρουργείου και τεμαχισμός με αποστειρωμένο νυστέρι.
- Προσθήκη 5mg/ml προνάσης σε 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο για 30 λεπτά.

- Αφαίρεση του υπερκειμένου, προσθήκη 5mg/ml κολλαγενάσης σε 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο για 90 λεπτά.
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε falcon των 15 ml και φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού.
- Επαναιώρηση του ιζήματος, μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα των 25cm³ και επώαση στον κλίβανο.
- Οι φλάσκες παρατηρούνται στο μικροσκόπιο. Στην αρχή, τα χονδροκύτταρα έχουν στρογγυλή όψη και αιωρούνται στο θρεπτικό υλικό. Μετά από 2 ημέρες, τα χονδροκύτταρα αρχίζουν να προσκολλώνται στην επιφάνεια της φλάσκας και εμφανίζουν διαφορετικό σχήμα.
- Όταν ο αριθμός των χονδροκυττάρων αυξηθεί τόσο ώστε να καλύψει την επιφάνεια της φλάσκας, πραγματοποιείται είτε ανακαλλιέργεια είτε τα χονδροκύτταρα χρησιμοποιούνται για την απομόνωση RNA, πρωτεϊνών και επιδράσεων με διάφορες χημικές ουσίες/ miRNAs mimics.
- Στη περίπτωση της ανακαλλιέργειας των χονδροκυττάρων, η διαδικασία πραγματοποιείται στις 7 ημέρες περίπου, ανάλογα με το μέγεθος του αρχικού ιστού και τον αριθμό των κυττάρων. Μετά την ολοκλήρωση 1-2 ανακαλλιεργειών, πραγματοποιείται ψύξη των κυττάρων για μελλοντική χρήση.
- Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, αρχικά πρέπει να γίνει αποκόλλησή τους από τη φλάσκα. Συγκεκριμένα, αφαιρούμε το καλλιεργητικό υλικό από τη φλάσκα, πραγματοποιείται έκπλυση με 5ml PBS w/o Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ και προσθήκη θρυψίνης (1ml). Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο, το οποίο έχει την ικανότητα να διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησής τους, προκαλώντας την αποκόλληση των κυττάρων. Ο χρόνος που οι φλάσκες επωάζονται στο κλίβανο, προκειμένου να δράσει η θρυψίνη είναι περίπου τα 5 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο, για να ελεγχθεί η αποκόλληση τους και προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης.
- Διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και εκπλύσεις πραγματοποιούνται για τη τελική συλλογή των κυττάρων.
- Τα κύτταρα μετρούνται στο μικροσκόπιο με πλάκα Newbauer: όπου αναμιγνύονται 20μl από το κυτταρικό εναιώρημα με 20μl Trypan Blue και τοποθετούνται πάνω στην πλάκα. Το Trypan Blue βάφει μπλε τα κύτταρα των οποίων η κυτταρική μεμβράνη έχει υποστεί αλλοιώσεις, όπως τα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα. Τα υγιή

κύτταρα δεν βάζονται και είναι αυτά που μετρούνται. Τελικά, πραγματοποιείται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του κυτταρικού εναιωρήματος και τα κύτταρα μοιράζονται σε νέες φλάσκες, με συγκέντρωση $1-2 \times 10^6$ κύτταρα/ml φρέσκου θρεπτικού υλικού.

- Για την κατάψυξη των κυττάρων, τα κύτταρα τοποθετούνται σε ειδικό κρυοφιαλίδιο σε συγκέντρωση $4-5 \times 10^6$ /ml θρεπτικού υλικού το οποίο περιέχει 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich) και 30% FBS χωρίς προσθήκη αντιβιοτικών. Το DMSO συμβάλλει στην σταδιακή ψύξη των κυττάρων και του θρεπτικού υλικού, συντελώντας στην αποφυγή τη δημιουργίας κρυστάλλων που θα οδηγούσε σε καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης. Επομένως, η ψύξη των κυττάρων είναι σημαντικό να πραγματοποιείται σταδιακά. Αρχικά, το κρυοφιαλίδιο τοποθετείται στους -20°C για 4 ώρες, στη συνέχεια στους -80°C για 24 ώρες και τελικά στους -150°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί ξανά.
- Η απόψυξη των κυττάρων, πραγματοποιείται γρήγορα με την τοποθέτηση του κρυοφιαλιδίου στο υδατόλουτρο στους 37°C και άμεση μεταφορά του περιεχομένου του φιαλιδίου σε falcon ων 15ml το οποίο περιέχει 5ml πλήρες θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρύνεται. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τοποθετούνται σε φλάσκα των 25 cm^3 και στη συνέχεια στον επωαστικό κλίβανο.

B.1.8 Απομόνωση RNA από χονδροκύτταρα

I. Υλικά απομόνωσης RNA

- Θρυψίνη (Life Technologies)
- PBS (HyClone)
- Trizol
- Χλωροφόρμιο (Merck)
- Ισοπροπυλική αλκοόλη (Honeywell)
- 70% αιθανόλη (Honeywell)
- RNase-free water (Qiagen)

II. Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA από χονδροκύτταρα

1. Συλλογή των κυττάρων:
 - ✓ Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα.
 - ✓ Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS (x2).
 - ✓ Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση για 5 λεπτά στον κλίβανο.

- ✓ Αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης.
 - ✓ Μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας σε πλαστικό σωληνάριο.
 - ✓ Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 - ✓ Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS.
 - ✓ Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 - ✓ Αφαίρεση υπερκείμενου και διατήρηση ιζήματος.
2. Λύση των κυττάρων και διαχωρισμός των φάσεων:
- ✓ Προσθήκη 1-3 ml Trizol στο σωληνάριο με το ίζημα, ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος των κυττάρων.
 - ✓ Διαλυτοποίηση του ιζήματος με vortex.
 - ✓ Επώαση για 5 λεπτά στο κλίβανο (37°C).
 - ✓ Προσθήκη 0,2ml χλωροφόρμιου για κάθε 1 ml Trizol.
 - ✓ Καλή ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα.
 - ✓ Επώαση για 2-3 λεπτά στο κλίβανο.
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 2500 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C.
 - ✓ Μετά τη φυγοκέντρηση σε κάθε σωληνάριο υπάρχουν 3 φάσεις, η υποκείμενη φάση που περιέχει φαινόλη/ χλωροφόρμιο, η μεσόφαση και η ανώτερη υδατική φάση που περιέχει το RNA.
3. Κατακρήμνιση του RNA και έκπλυση
- ✓ Μεταφορά υπερκείμενου, με προσοχή ώστε να μην ανακατευθούν οι φάσεις, σε erpendorf των 2 ml.
 - ✓ Προσθήκη 0,5ml Ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε 1 ml Trizol.
 - ✓ Επώαση για 10 λεπτά στους -20 °C σε υδατόλουτρο.
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C.
 - ✓ Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα του RNA με 1ml 70% αιθανόλης.
 - ✓ Ανάδευση με vortex.
 - ✓ Φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C.
 - ✓ Απομάκρυνση υπερκείμενου και στέγνωμα RNA σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό μέχρι να στεγνώσει η αιθανόλη.
4. Επαναδιάλυση του RNA:

- ✓ Διάλυση του RNA σε RNase-free water (περίπου 30μl).
- ✓ Επώαση για 10 λεπτά στους 55 °C στο υδατόλουτρο.
- ✓ Αποθήκευση του RNA στους -80 °C.

5. Έλεγχος ποιότητας/ ποσότητας του RNA:

- ✓ Για τον έλεγχο της ποσότητας του RNA πραγματοποιείται φωτομέτρηση κάθε δείγματος στα 260 και 280 nm, αφού πρώτα κάθε δείγμα αραιώνεται 1:100. Η συγκέντρωση του RNA υπολογίζεται ως εξής: συγκέντρωση RNA = αραιώση x OD260 x 40 (mgr/ml).
- ✓ Για τον έλεγχο της ποιότητας του RNA πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 2%.

B.1.9 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) από RNA χονδροκυττάρων

Το RNA που απομονώθηκε μετατράπηκε σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής με τη χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific Inc, USA).

1. Για τη μετατροπή σε απλό cDNA των δειγμάτων RNA, χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας.
2. Για τη μετατροπή σε cDNA ειδικό για miRNAs των δειγμάτων RNA, χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές τύπου stem loop για κάθε miRNA.

I. Υλικά για τη σύνθεση cDNA

- Random hexamers (Invitrogen)/ stem loop primers-miRNA specific
- Κιτ αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript III (200U/μl, Invitrogen)
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs 50mM, Invitrogen)
- ddH₂O

II. Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA

- Προσθήκη 1μgr RNA δείγματος.
- Προσθήκη 1μl από τυχαίους εκκινητές ή stem loop εκκινητές σε τελικό όγκο 15 μl
- Το διάλυμα RNA με τα τυχαία εξανουκλεοτίδια θερμάνθηκε στους 65°C για 5 min για την αποδιάταξη δευτεροταγών δομών του RNA.
- Ακολούθησε προσθήκη των υπολοίπων αντιδραστηρίων ως εξής:

Ρυθμιστικό διάλυμα 5x:	4μl
Δεοξυριβονουκλεοτίδια:	2μl
Χλωριούχο Μαγνήσιο:	2μl
DTT:	2μl
Super Script III (200U/μl):	0,5μl

- Μετά την προσθήκη και των υπολοίπων αντιδραστηρίων τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή του θερμοκυκλοποιητή στις ακόλουθες συνθήκες:

20 °C, 10 λεπτά

42 °C, 45 λεπτά

99 °C, 3 λεπτά

18 °C, 5 λεπτά

4°C, τελική θερμοκρασία:

III. Έλεγχος του cDNA με την τεχνική της απλής PCR

Η ύπαρξη ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων δύναται να ελαχιστοποιηθεί με την ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Το μετάγραφο “αναφοράς” που χρησιμοποιείται είναι το mRNA του γονιδίου **GAPDH** (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) για το απλό cDNA, που παράχθηκε με εκκινητές τυχαία εξαμερή. Το cDNA κάθε δείγματος ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο GAPDH. Οι ποσότητες του διαλύματος της αντίδρασης (Πίνακας 10) και οι συνθήκες της PCR παρατίθενται παρακάτω.

Υλικά	Όγκος/ αντίδραση
cDNA	3 μl

AmpriTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems)	12,5 μ l
Εκκινητής Forward (50p/mol)	1 μ l
Εκκινητής Reverse (50p/mol)	1 μ l
RNAase free water	7,5 μ l

Πίνακας 10: Ποσότητες των αντιδραστηρίων για την τεχνική της απλής PCR.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	10 λεπτά	1
Αποδιάταξη	95°C	30''	35
Υβριδοποίηση	60°C	30''	35
Επιμήκυνση	72°C	1 λεπτό	35
Τελική επιμήκυνση	72°C	7 λεπτά	1

Πίνακας 11: Συνθήκες της απλής PCR για την ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων cDNA.

Προκειμένου να ελεγχθεί η παρουσία ή όχι του τμήματος που ενισχύθηκε με τη τεχνική της PCR, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% με μάρτυρα προτύπων μοριακών βαρών 100 bp (Fermentas).

Στη περίπτωση, του cDNA που είναι ειδικό για συγκεκριμένα miRNAs, η ύπαρξη των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με την ίδια τεχνική της απλής PCR και εκκινητές ειδικούς για το εκάστοτε miRNA.

B.1.10 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης miRNAs και mRNA μεταγράφων σε χονδροκύτταρα καλλιέργειας μεταξύ ατόμων με OA και φυσιολογικών ατόμων με την χρήση της μεθόδου Real-Time qPCR.

I. Βασικές αρχές της μεθόδου

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA *in vitro*, χρησιμοποιώντας το ένζυμο πολυμεράση Taq και εξειδικευμένους εκκινητές. Η πολυμεράση Taq είναι ένα ανθεκτικό στη θερμότητα ένζυμο που προέρχεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Οι εκκινητές είναι σύντομες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές θέσεις των δύο κλώνων DNA στα άκρα του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Το μείγμα αντίδρασης PCR περιέχει: 1) ένα δίκλωνο DNA, 2) ένζυμο πολυμεράσης Taq, 3) ένα ρυθμιστικό διάλυμα, 4) το ζεύγος των εκκινητών, 5) ένα διάλυμα ελεύθερων 5'-τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και 6) ένα διάλυμα MgCl₂ που διευκολύνει τη δράση της πολυμεράσης.

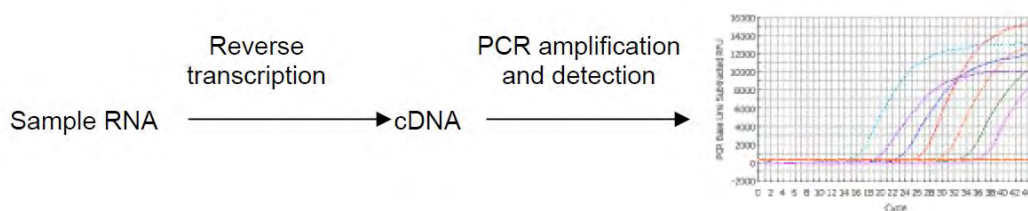
Στην ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, ο πολλαπλασιασμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός ενός μορίου DNA στόχου συμβαίνουν ταυτόχρονα. Το ενισχυμένο DNA ποσοτικοποιείται σε πραγματικό χρόνο καθώς συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, μετά από κάθε κύκλο ενίσχυσης, κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης (Εικόνα 22).

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ABI 7300 (Applied Biosystems), το οποίο στηρίζεται στη χρήση συγκεκριμένων φθορίζουσών χρωστικών και ανιχνεύει τον φθορισμό που εκπέμπεται κατά την ενσωμάτωσή τους στο DNA του δείγματος. Η φθορίζουσα χρωστική SYBR Green χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης. Η SYBR Green συνδέεται στα δίκλινα μόρια DNA, ενισχύοντας τον φθορισμό της. Το σήμα ανιχνεύεται στο τέλος κάθε σταδίου επιμήκυνσης κάθε κύκλου. Η μέγιστη απορρόφηση της χρωστικής εμφανίζεται στα 497 nm. Η SYBR Green μπορεί να συνδεθεί με όλα τα μόρια δίκλωνου DNA αλλά μόνο σε μια συγκεκριμένη περιοχή κάθε φορά, αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου. Ο υπολογισμός του φθορισμού σε αυξανόμενες θερμοκρασίες μειώνει την ανίχνευση μη ειδικών προϊόντων. Επιπλέον, η ειδικότητα των προϊόντων μπορεί να επιβεβαιωθεί με τη δημιουργία της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve). Αυτή η καμπύλη προκύπτει με τη μέτρηση του φθορισμού καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται προοδευτικά πάνω από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) του ενισχυμένου μορίου (amplicon). Καθώς η T_m εξαρτάται από τη σύσταση των νουκλεοτιδίων, μπορεί να αναγνωριστεί το σήμα που λαμβάνεται από το σωστό προϊόν.

Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους (30-40), όπου υπάρχει διακύμανση της θερμοκρασίας, οι οποίοι αποτελούνται από τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 95°C
- Σύνδεση των ευκίνητων στα δύο αντίθετα άκρα της μονόκλωνης πια ακολουθίας-στόχου.
Η θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από τη αλληλουχία των εκκινητών
- Αντιγραφή της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA με τη χρήση των dNTPs από τη DNA πολυμεράση, στους 72°C.

Η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου εξαρτάται από το μήκος (σε bp) του υπό ενίσχυση τμήματος DNA και με την παραπάνω διαδικασία επιτυγχάνεται η συλλογή ενός εκατομμυρίου περίπου αντιγράφων της επιθυμητής ακολουθίας, καθώς ο κάθε κύκλος διπλασιάζει το προϊόν του προηγούμενου κύκλου.



Εικόνα 22: Η Real Time PCR 2 σταδίων (two step Real Time-PCR), αποτελείται από το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής που πραγματοποιείται σε ξεχωριστή αντίδραση και παράγεται το cDNA και το κυρίως στάδιο της Real time PCR. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα που παράγονται από τη συσκευή της Real-time PCR (thermal cycler/detector) οπτικοποιούνται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή και γίνεται περαιτέρω επεξεργασία αυτών.

Υλικά για την αντίδραση της qPCR

- cDNA
- Ρυθμιστικό διάλυμα με SYBR Green (Applied Biosystems)
- Εκκινητές των γονιδίων/ miRNAs (5 μM)
- ddH₂O (Qiagen)

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων/ miRNAs περιείχε:

Υλικά	Όγκος
cDNA:	2 μl
SYBR Green:	5 μl

Εκκινητής forward:	0,5 µl
Εκκινητής reverse:	0,5 µl
ddH2O:	2 µl

Πίνακας 12: Υλικά και ποσότητες του διαλύματος της αντίδρασης για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων/ miRNAs με τη μέθοδο της Real Time PCR από RNA δειγμάτων χόνδρου.

miRNA		Εκκινητές	Tm	Κύκλοι
hsa-miR-33b-3p	F R	5'-GCGTGCATTGCTGTTGCAT-3' 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	56°C	40
hsa-miR-4284	F R	5' - TGTTTTTTTGGGGCTCACATCA - 3' 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	56°C	40
hsa-miR-663a	F R	5'-GTGCGTGTCTGGAG-3' 5'-TTTAGGCGGGGCG-3'	56°C	40
hsa-miR-150-5p	F R	5'-GCTCTCCCAACCCTTGTACC-3' 5'-CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT-3'	56°C	40
hsa-miR-1233-3p	F R	5'-TGAGCCCTGTCTCCC-3' 5'- GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	56°C	40
hsa-miR-140-3p	F R	5' - GGTGTGTACCACAGGGTAGAA - 3' 5'- GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	56°C	40
hsa-miR-671-3p	F R	5' - TGGTCCGGTCTCAGGG - 3' 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'	56°C	40

U6	F R	5'- GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT -3' 5'- CTCACACCGTGTCTGTTCCA-3'	56°C	40
Γονίδιο		Εκκινητές	Tm	Κύκλοι
PTEN	F R	5'- TTGGCGGTGTCATAATGTCT-3' 5'-GCAGAAAGACTTGAAGGCGTA-3'	60°C	40
COL2A1	F R	5'- ATGACAATCTGGCTCCCAACTGC- 3' 5'- GACCGGCCCTATGTCCACACCGAAT -3'	60°C	40
MMP-13	F R	5'-TGGCATTGCTGACATCATGA-3' 5'-GCCAGAGGGCCCATCAA-3'	56	40
TGFα	F R	5'-TAAAATGGTCCCCTCGGCTG-3' 5'-CTCCTGCACCAAAACCTGC-3'	60°C	40
BCL2	F R	5'- AAATACAACATCACAGAGGAAGT-3' 5'-TCCCGGTTATCGTACCCTGT-3'	60°C	40
SIRT-1	F R	5'-TGCTGGCCTAATAGAGTGGCA-3' 5'-CTCAGCGCCATGGAAAATGT-3'	60°C	40
HMGCR	F R	F: 5'-GTCATTCCAGCCAAGGTTGT- 3' R: 5'-TCCTGTCCACAGGCAATGTA- 3'	60°C	40
HDAC-4	F R	5'-GGTTTGAGAGCAGGCAGAAC 3'- -5' CAGAGAATGAGGCCAAGGAG 3'-	60°C	40

TNFA	F R	5'-GGGAGCTCACAAGTGCTTTC-3' 5'-AGGGTGGGAGACAGACAATG-3'	60°C	40
GAPDH	F R	5'-ACCACTGTCCACGCCATCAC-3' 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	60°C	40

Πίνακας 13: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική Real Time PCR για τη μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των παραπάνω γονιδίων/ miRNAs καθώς και τα μεγέθη των προϊόντων, τα Tm των εκκινητών και οι κύκλοι ενίσχυση. Το stock διάλυμα των εκκινητών είχε συγκέντρωση 100pmol ενώ η συγκέντρωση στην τελική αντίδραση ήταν 20pmol.

Οι συνθήκες PCR ήταν οι εξής

- Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 10 λεπτά
- Για 45 κύκλους:
 - ✓ Αποδιάταξη στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα.
 - ✓ Υβριδοποίηση των εκκινητών στους 60°C για 60 δευτερόλεπτα.
 - ✓ Επιμήκυνση στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα.
- Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά.

B.1.11 Αποσιώπηση γονιδίων με τη χρήση miRNAs

I. Βασικές αρχές της μεθόδου

Η χρήση των μικρών παρεμβατικών μορίων RNAs επιτρέπει την επιλεκτική αναστολή της έκφρασης γονιδίων. Εξαιτίας του ρόλου τους αυτού στη γονιδιακή ρύθμιση, τόσο τα siRNAs (small interfering RNAs) όσο και τα miRNAs (microRNAs) αποτελούν σημαντικούς πιθανούς στόχους για τη θεραπευτική αντιμετώπιση διάφορων ασθενειών όπως ο καρκίνος.

Ειδικότερα, η χρήση των miRNA mimics, αποτελεί μια στρατηγική γονιδιακής αποσιώπησης μέσω συνθετικών παρεμβατικών μορίων RNA (RNAi), η οποία εκμεταλλεύεται την ικανότητα τους να συνδέονται στο σύμπλοκο RISC και να προσδένουν τα mRNAs των γονιδίων στόχων και να προκαλούν καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, με αποτέλεσμα την αποδόμηση τους και την μείωση της παραγόμενης πρωτεΐνης.

Συνοπτικά, τα miRNA mimics αποτελούν ένα πολύτιμο εργαλείο για την κατανόηση της λειτουργίας συγκεκριμένων γονιδίων και δίνουν τη δυνατότητα ανάπτυξης νέων θεραπειών.

Για την διαμόλυνση των κυττάρων με εξωγενή μόρια miRNAs ή siRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι όπως ιικοί φορείς ή ηλεκτροπόρωση. Ωστόσο, η διαμόλυνση των miRNA mimics με τη χρήση των λιπωμάτων αποτελεί την απλούστερη και πιο σταθερή τεχνική. Συγκεκριμένα, η διαμόλυνση των χονδροκυττάρων με το miRNA mimic, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της λιποφεκταμίνης 2000. Η λιποφεκταμίνη 2000 είναι μια κατιονική σύνθεση λιποσωμάτων που λειτουργεί δεσμεύοντας μόρια νουκλεϊκών οξέων, επιτρέποντάς τους να ξεπεράσουν την ηλεκτροστατική απώθηση από την κυτταρική μεμβράνη και να απορροφηθούν από το κύτταρο²⁹⁸.

II. Επίδραση με miR-140-3p mimic σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων

Προκειμένου να επαληθευθεί ο ρόλος του miR-140-3p στην αναστολή της έκφρασης των προβλεπόμενων γονιδίων στόχων του, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των ΟΑ χονδροκυττάρων με το miR-140-3p miR mimic (QIAGEN). Στη συνέχεια διερευνήθηκαν τα mRNA επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων στόχων του miR-140-3p, μετά από την επίδραση με miR-140-3p mimic σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων.

III. Υλικά:

- Lipofectamine TM 2000 (Invitrogen)
- Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen)
- Hsa-miR-140-3p (QIAGEN) mimic: 5' UACCACAGGGUAGAACCACGG 3'

IV. Πρωτόκολλο αποσιώπησης γονιδίων με microRNAs:

Τα χονδροκύτταρα μεταφέρονται 24h, πριν την επιμόλυνση με το miR-140-3p mimic σε 6-well plate, όπου προστίθενται 2ml θρεπτικού υλικού DMEM/F χωρίς FBS και αντιβιοτικά. Στην συνέχεια, τα χονδροκύτταρα επάζονται σε στείρες συνθήκες σε κλίβανο (37 °C, 5% CO₂). Στα κύτταρα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα ελέγχου, δεν προστέθηκε miR mimic. Η συγκέντρωση του microRNA και της λιποφεκταμίνης ήταν 100 pmol/ml.

Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για την επιμόλυνση ήταν η εξής:

- Προσθήκη 3 μl λιποφεκταμίνης σε 497 μl DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Καλή ανάδευση

- Προσθήκη 3 μl microRNA σε 497 μl DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά.
Καλή ανάδευση
- Επώαση των δύο παραπάνω διαλυμάτων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Ανάμειξη των διαλυμάτων της λιποφεκταμίνης και του microRNA.
- Επώαση του μίγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από τα πηγαδάκια και ξέπλυμα με PBS.
- Μεταφορά 1 ml του μίγματος λιποφεκταμίνη / microRNA σε κάθε πηγαδάκι.
- Προσθήκη 1,5 ml DMEM/F χωρίς FBS και αντιβιοτικά.
- Τα κύτταρα επώαστηκαν στον κλίβανο για 72 ώρες και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA.

B.1.12 Βιοπληροφορική ανάλυση

Στάδιο 1:

Στο 1^ο στάδιο, αναλύθηκαν με τη χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων τα 77 miRNAs που βρέθηκαν διαφοροποιημένα με τη τεχνική των miRNA microarrays και αξιολογήθηκαν ως σημαντικά στη ROC ανάλυση. Η πρόβλεψη των γονιδίων στόχων των miRNAs πραγματοποιήθηκε με το TargetScan v.7.0¹⁵⁷ και το DIANA Tools²⁹⁹. Ο λειτουργικός σχολιασμός πραγματοποιήθηκε με τα εργαλεία Webgestalt³⁰⁰ και τα εργαλεία DIANA. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση εμπλουτισμού των μονοπατιών κατά KEGG για τα γονίδια-στόχους χρησιμοποιώντας τα βιοπληροφορικά διαδικτυακά εργαλεία της βάσης δεδομένων (DAVID)³⁰¹ και το κριτήριο $p < 0,05$. Τα διαγράμματα Venn δημιουργήθηκαν με το διαδικτυακό εργαλείο του υπολογιστή Διαγραμμάτων Venn από την Ομάδα Βιοπληροφορικής, Evolutionary Genomics του Πανεπιστημίου του Gent.

Στάδιο 2:

Κατά το στάδιο αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκε η εύρεση των επαληθευμένων γονιδίων στόχων του miR-140-3p, με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής (Tarbase v8.0, miRTarbase v9.0 και miRWALK v3.0). Από τα οποία επιλέχθηκαν γονίδια, τα οποία έχουν συσχετιστεί με την ΟΑ, σύμφωνα με την βάση δεδομένων Open Targets³⁰² με τη βοήθεια του υπολογιστή διαγραμμάτων Venn. Το miR-140-3p και τα γονίδια στόχοι του απεικονίστηκαν σε δίκτυα με το λογισμικό Cytoscape v3.9.1. Στη συνέχεια, στο περιβάλλον του Cytoscape, με τη χρήση της βάσης δεδομένων STRING (<http://www.string-db.org>), το δίκτυο του miR-140-3p και των στόχων του εμπλουτίστηκε με τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Protein-protein interaction

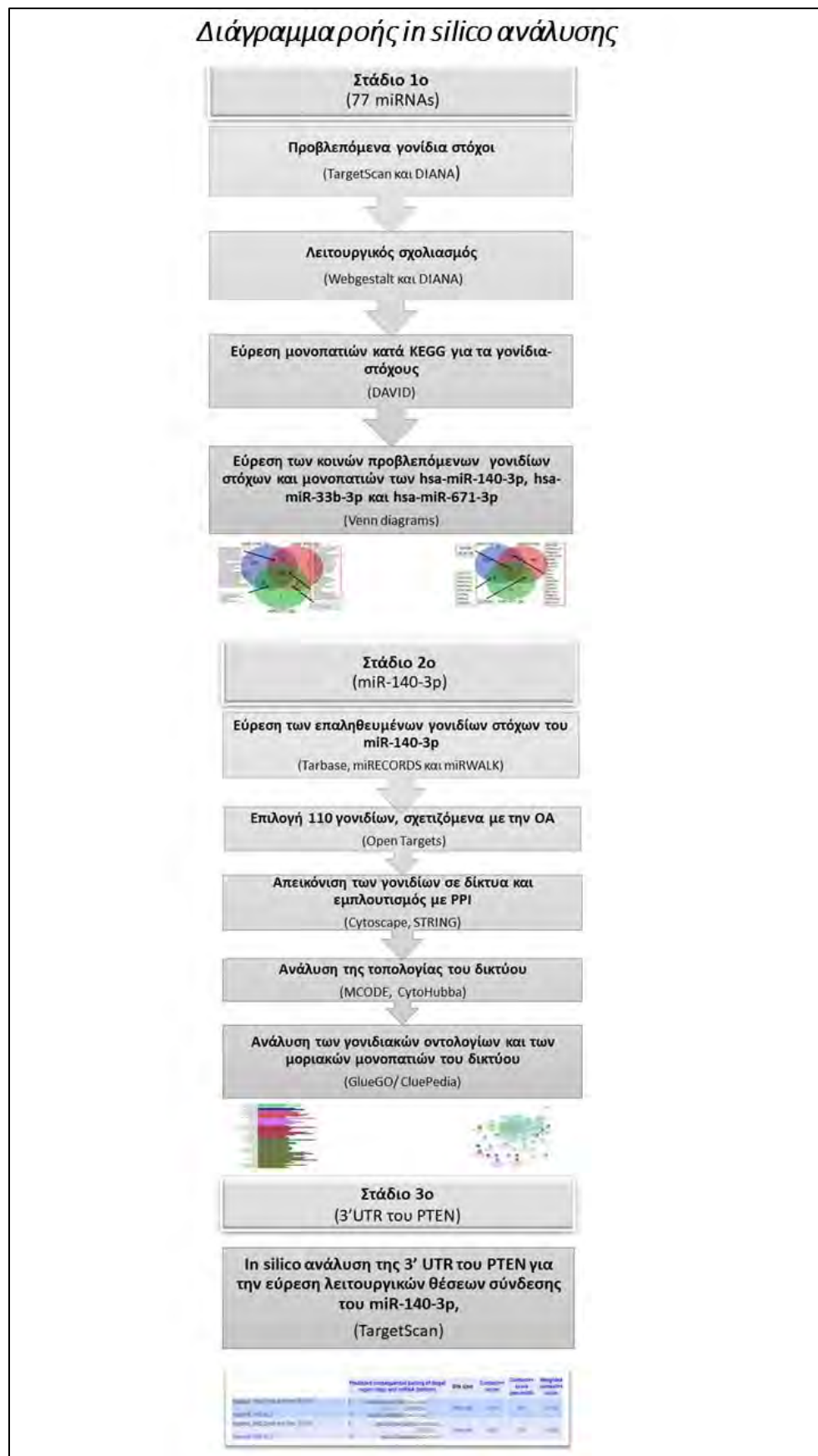
network, PPI network) τους. Προκειμένου να βρεθούν μόνο οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις επιλέχθηκε Confidence score > 0.4.

Στη συνέχεια, αναλύθηκε η τοπολογία του δικτύου ώστε να προσδιοριστούν οι σημαντικότερες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μεγαλύτερη σημασία για το δίκτυο. Το MCODE είναι μια plug-in εφαρμογή στο Cytoscape που εντοπίζει συμπλέγματα (clusters), δηλαδή υψηλά διασυνδεδεμένες περιοχές, σε ένα δίκτυο. Τα συμπλέγματα σε ένα δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων αποτελούν τις περισσότερες φορές είτε σύμπλοκα πρωτεϊνών είτε τμήματα μονοπατιών³⁰³. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για το MCODE ήταν Node score cut-off ήταν 0.2 και K-score 2. Ενώ το plug-in CytoHubba χρησιμοποιήθηκε για να αναγνωριστούν οι σημαντικότερες (hub) πρωτεΐνες του δικτύου μέσω του αλγορίθμου degree³⁰⁴.

Προκειμένου να διερευνηθούν οι κύριες λειτουργίες και τα μονοπάτια που ρυθμίζει το miR-140-3p μέσω των στόχων του, πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση εμπλουτισμού με τις βάσεις δεδομένων Gene ontology (GO)³⁰⁵ και Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)³⁰⁶ αντίστοιχα. Ειδικότερα, τα γονίδια αναλύθηκαν ως προς τη βάση δεδομένων GO, για τις κατηγορίες της βιολογικής διαδικασίας, των κυτταρικών συστατικών και της μοριακής λειτουργίας. Η εύρεση των γονιδιακών οντολογιών (GO) και των μοριακών μονοπατιών κατά KEGG, πραγματοποιήθηκε με το GlueGO v2.5.9/ CluePedia v1.5.9^{307,308}, ένα plug-in εργαλείο του Cytoscape. Οι συσχετίσεις, στις οποίες το p-value ήταν μικρότερο του 0,05 και η βαθμολογία kappa ήταν μεγαλύτερη από 0,4, θεωρήθηκαν ως σημαντικές.

Στάδιο 3^ο:

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA του γονιδίου PTEN για την εύρεση λειτουργικών θέσεων σύνδεσης του miR-140-3p, με τη χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής TargetScanHuman 8.0.



Εικόνα 23: Διάγραμμα ροής που απεικονίζει τα στάδια της *in silico* ανάλυσης.

B.1.13 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη τεχνική της Real Time

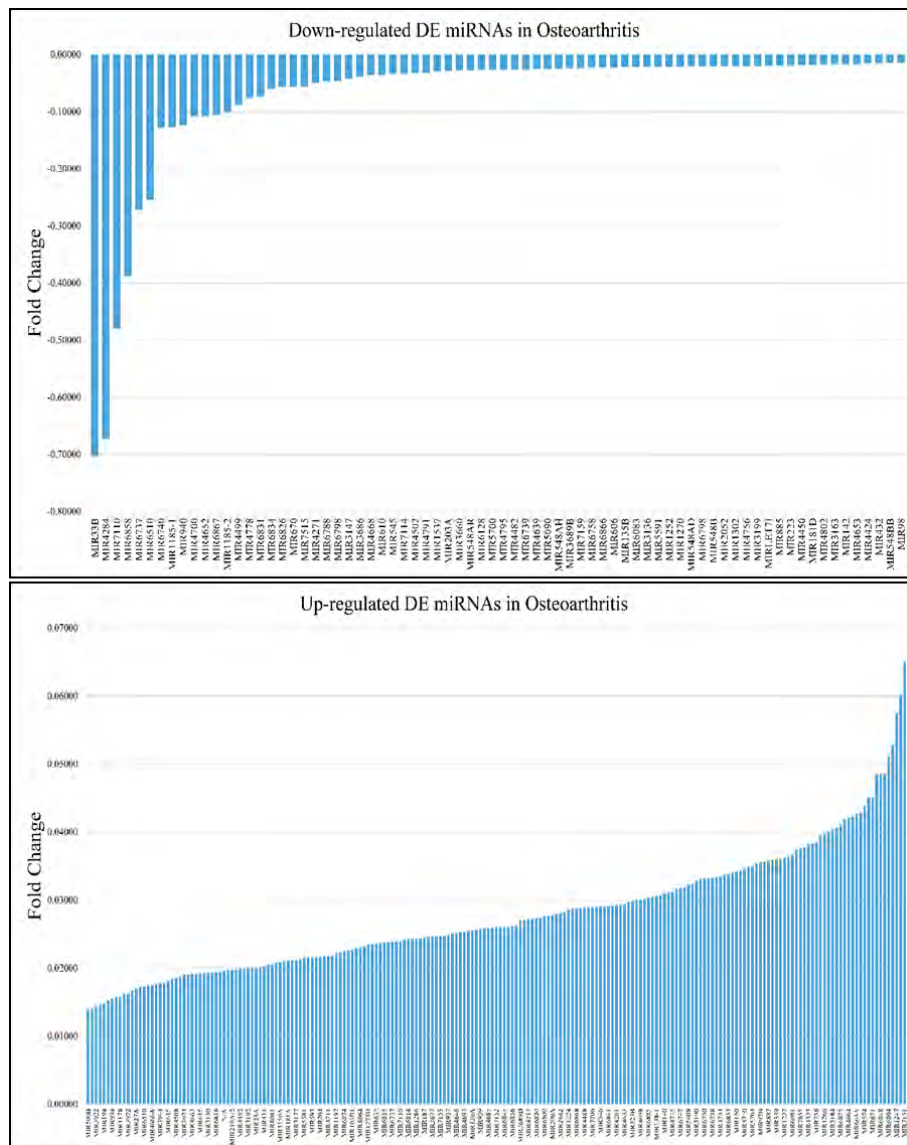
Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη τεχνική της Real Time, χρησιμοποιήθηκαν τα στατιστικά προγράμματα Microsoft Excel, IBM SPSS Statistics 26 και GraphPadPrism 8.4.2. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες δοκιμασίες: Two-tailed student T-test, independent-samples T-test, paired T-test, One-way ANOVA. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή $p < 0,05$ και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με την τυπική απόκλιση (mean +/- standard deviation, SD) ή το τυπικό σφάλμα (mean +/- standard error, SE).

B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

B.2.1 Ανεύρεση miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στον ορό ατόμων με ΟΑ σε σχέση με υγιή άτομα με χρήση μικροσυστοιχιών miRNAs

Μετά από στατιστική ανάλυση των δεδομένων των miRNA microarrays με τη χρήση της miRNA-array πλατφόρμας της Agilent 8×60K, παρατηρήθηκε ότι από τα 2.549 miRNAs που ελέγχθηκαν συνολικά, 279 miRNAs παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στον ορό ασθενών με ΟΑ σε σχέση με υγιή άτομα ($p < 0.05$ και $FDR < 0.05$). Από το σύνολο των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση, 205 (73.5%) miRNAs παρουσίασαν αυξημένη έκφραση, ενώ 74 (26,5%) miRNAs παρουσίασαν μειωμένη έκφραση ($p < 0.05$ και $FDR < 0.05$) (Εικόνα 24).

Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι ταξινόμησης για την ανίχνευση μοτίβων στην έκφραση των miRNAs. Οι μέθοδοι Unsupervised two-way hierarchical clustering (HCL) with Euclidian distance ανάλυση και k-means ανάλυση (HCL) δεν μπόρεσαν να διακρίνουν μοτίβα miRNAs μεταξύ ΟΑ και φυσιολογικών δειγμάτων ορού.



Εικόνα 24: Ραβδόγραμμα όπου απεικονίζονται τα 279 miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση (DE) μεταξύ ασθενών με OA και υγιών ατόμων.

B.2.2 Αξιολόγηση της διαγνωστικής αξίας των διαφοροποιημένων miRNAs στον ορό, με τον υπολογισμό καμπύλων ROC.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η διαγνωστική αξία των διαφοροποιημένων miRNAs στον ορό ατόμων με OA σε σχέση με φυσιολογικά άτομα, υπολογίστηκαν οι καμπύλες Receiver Operating Characteristic (ROC) για την αξιολόγηση της διαγνωστικής αξίας των διαφοροποιημένων miRNAs κατά τη διάκριση μεταξύ ατόμων με OA και υγιών ατόμων. Η ανάλυση ROC ανέδειξε ότι 77 miRNAs είχαν τιμή του δείκτη Area under the Curve (AUC) > 0,8 και $p < 0,01$, το οποίο σημαίνει ότι υπάρχει διάκριση μεταξύ των δειγμάτων από άτομα με OA με τα δείγματα από την ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα ανάλυσης ROC συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (

Πίνακας 14). Μεταξύ των 77 miRNAs, 7 miRNAs, hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-671-3p και hsa-miR-140-3p επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη διότι βρίσκονται στα 20 πρώτα miRNAs με τη μεγαλύτερη διαφοροποιημένη έκφραση με τη τεχνική μικροσυστοιχιών miRNAs. Η ανάλυση καμπύλης ROC των 7 επιλεγμένων miRNAs φαίνεται στη παρακάτω εικόνα (Εικόνα 25).

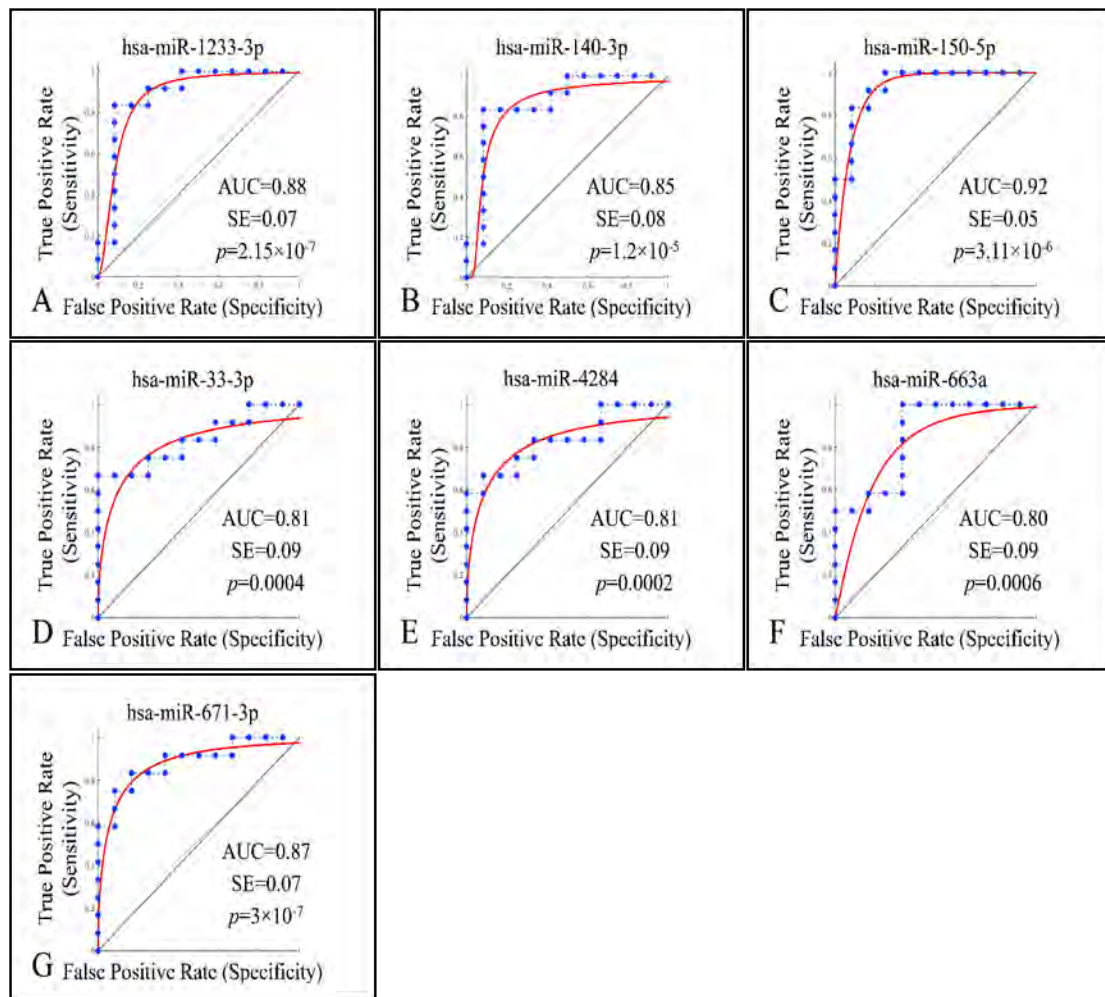
Inv.	ID	SYMBOL	AUC	SE	95% CI Lower	95% CI Upper
1	hsa-miR-6816-5p	MIR6816	0.80082	0.09247	0.61959	0.98205
2	hsa-miR-3660	MIR3660	0.80100	0.09243	0.61983	0.98216
3	hsa-miR-326	MIR326	0.80245	0.09214	0.62186	0.98304
4	hsa-miR-4673	MIR4673	0.80275	0.09208	0.62228	0.98322
5	hsa-miR-5008-3p	MIR5008	0.80325	0.09198	0.62297	0.98352
6	hsa-miR-4778-5p	MIR4778	0.80450	0.09172	0.62472	0.98427
7	hsa-miR-6747-3p	MIR6747	0.80472	0.09168	0.62503	0.98441
8	hsa-miR-33b-3p	MIR33B	0.80532	0.09156	0.62587	0.98477
9	hsa-miR-2682-3p	MIR2682	0.80540	0.09154	0.62598	0.98482
10	hsa-miR-567	MIR567	0.80569	0.09148	0.62639	0.98499
11	hsa-miR-3074-5p	MIR3074	0.80669	0.09128	0.62780	0.98559
12	hsa-miR-6798-3p	MIR6798	0.80697	0.09122	0.62818	0.98575
13	hsa-miR-6788-3p	MIR6788	0.80886	0.09083	0.63084	0.98688
14	hsa-miR-4695-3p	MIR4695	0.80943	0.09071	0.63164	0.98722
15	hsa-miR-6823-3p	MIR6823	0.81035	0.09052	0.63294	0.98777
16	hsa-miR-6866-5p	MIR6866	0.81040	0.09051	0.63300	0.98779
17	hsa-miR-4482-5p	MIR4482	0.81160	0.09026	0.63469	0.98850
18	hsa-miR-1260b	MIR1260B	0.81197	0.09018	0.63522	0.98872
19	hsa-miR-1284	MIR1284	0.81206	0.09016	0.63534	0.98877
20	hsa-miR-4700-3p	MIR4700	0.81340	0.08988	0.63725	0.98956

21	hsa-miR-4284	MIR4284	0.81372	0.08981	0.63770	0.98974
22	hsa-miR-6128	MIR6128	0.81396	0.08976	0.63804	0.98988
23	hsa-miR-670-5p	MIR670	0.81400	0.08975	0.63809	0.98991
24	hsa-miR-7155-3p	MIR7155	0.81644	0.08923	0.64156	0.99133
25	hsa-miR-4652-3p	MIR4652	0.81692	0.08913	0.64224	0.99160
26	hsa-miR-548b-5p	MIR548B	0.81700	0.08911	0.64235	0.99165
27	hsa-miR-6833-3p	MIR6833	0.81724	0.08906	0.64269	0.99179
28	hsa-miR-6840-5p	MIR6840	0.81921	0.08863	0.64550	0.99292
29	hsa-miR-545-5p	MIR545	0.81980	0.08850	0.64633	0.99326
30	hsa-miR-6750-3p	MIR6750	0.82135	0.08816	0.64856	0.99415
31	hsa-miR-23a-3p	MIR23A	0.82142	0.08815	0.64866	0.99419
32	hsa-miR-200a-5p	MIR200A	0.82189	0.08804	0.64932	0.99445
33	hsa-miR-3136-5p	MIR3136	0.82237	0.08794	0.65002	0.99473
34	hsa-miR-1224-3p	MIR1224	0.82263	0.08788	0.65039	0.99487
35	hsa-miR-675-5p	MIR675	0.82284	0.08783	0.65069	0.99499
36	hsa-miR-6834-3p	MIR6834	0.82322	0.08775	0.65123	0.99521
37	hsa-miR-4711-5p	MIR4711	0.82339	0.08771	0.65147	0.99530
38	hsa-miR-664a-3p	MIR664A	0.82439	0.08749	0.65291	0.99587
39	hsa-miR-5193	MIR5193	0.82526	0.08730	0.65416	0.99636
40	hsa-miR-4740-5p	MIR4740	0.82709	0.08688	0.65680	0.99738
41	hsa-miR-6737-5p	MIR6737	0.82904	0.08644	0.65962	0.99847
42	hsa-miR-6808-3p	MIR6808	0.82968	0.08630	0.66054	0.99882
43	hsa-miR-4488	MIR4488	0.83088	0.08602	0.66228	0.99948
44	hsa-miR-4761-5p	MIR4761	0.83110	0.08597	0.66259	0.99960
45	hsa-miR-6788-5p	MIR6788	0.83261	0.08562	0.66480	1.00000

46	hsa-miR-4639-3p	MIR4639	0.83313	0.08550	0.66555	1.00000
47	hsa-miR-6858-3p	MIR6858	0.83386	0.08533	0.66661	1.00000
48	hsa-miR-1296-5p	MIR1296	0.83518	0.08503	0.66853	1.00000
49	hsa-miR-7855-5p	MIR7855	0.83579	0.08488	0.66942	1.00000
50	hsa-miR-1227-5p	MIR1227	0.83761	0.08445	0.67209	1.00000
51	hsa-miR-5011-5p	MIR5011	0.83837	0.08427	0.67319	1.00000
52	hsa-miR-548ao-5p	MIR548A	0.83976	0.08394	0.67524	1.00000
53	hsa-miR-3130-3p	MIR3130	0.83984	0.08392	0.67536	1.00000
54	hsa-miR-1537-3p	MIR1537	0.84468	0.08275	0.68249	1.00000
55	hsa-miR-3714	MIR3714	0.84621	0.08237	0.68476	1.00000
56	hsa-miR-140-3p	MIR140	0.84695	0.08219	0.68586	1.00000
57	hsa-miR-6081	MIR6081	0.84710	0.08215	0.68609	1.00000
58	hsa-miR-6798-5p	MIR6798	0.85202	0.08092	0.69341	1.00000
59	hsa-miR-346	MIR346	0.85548	0.08003	0.69862	1.00000
60	hsa-miR-185-3p	MIR185	0.85916	0.07908	0.70417	1.00000
61	hsa-miR-4492	MIR4492	0.86282	0.07810	0.70974	1.00000
62	hsa-miR-7515	MIR7515	0.86687	0.07701	0.71593	1.00000
63	hsa-miR-6814-3p	MIR6814	0.86709	0.07695	0.71627	1.00000
64	hsa-miR-758-5p	MIR758	0.86979	0.07621	0.72042	1.00000
65	hsa-miR-3686	MIR3686	0.86984	0.07619	0.72050	1.00000
66	hsa-miR-4800-3p	MIR4800	0.86993	0.07617	0.72064	1.00000
67	hsa-miR-6781-3p	MIR6781	0.87169	0.07568	0.72337	1.00000
68	hsa-miR-671-3p	MIR671	0.87430	0.07494	0.72741	1.00000
69	hsa-miR-1233-3p	MIR1233	0.87616	0.07441	0.73032	1.00000
70	hsa-miR-3147	MIR3147	0.88243	0.07259	0.74016	1.00000

71	hsa-miR-6868-5p	MIR6868	0.88530	0.07174	0.74470	1.00000
72	hsa-miR-138-1-3p	MIR1381	0.88717	0.07117	0.74768	1.00000
73	hsa-miR-7151-5p	MIR7151	0.89624	0.06835	0.76229	1.00000
74	hsa-miR-4734	MIR4734	0.90554	0.06529	0.77758	1.00000
75	hsa-miR-4668-5p	MIR4668	0.90738	0.06467	0.78064	1.00000
76	hsa-miR-6875-3p	MIR6875	0.92001	0.06018	0.80207	1.00000
77	hsa-miR-150-5p	MIR150	0.92200	0.05943	0.80551	1.00000

Πίνακας 14: Ανάλυση των τιμών ROC των miRNAs μεταξύ δειγμάτων απόμων με ΟΑ και της ομάδας ελέγχου. AUC: Area under the Curve, SE: Standard Error, CI: Confidence Interval.



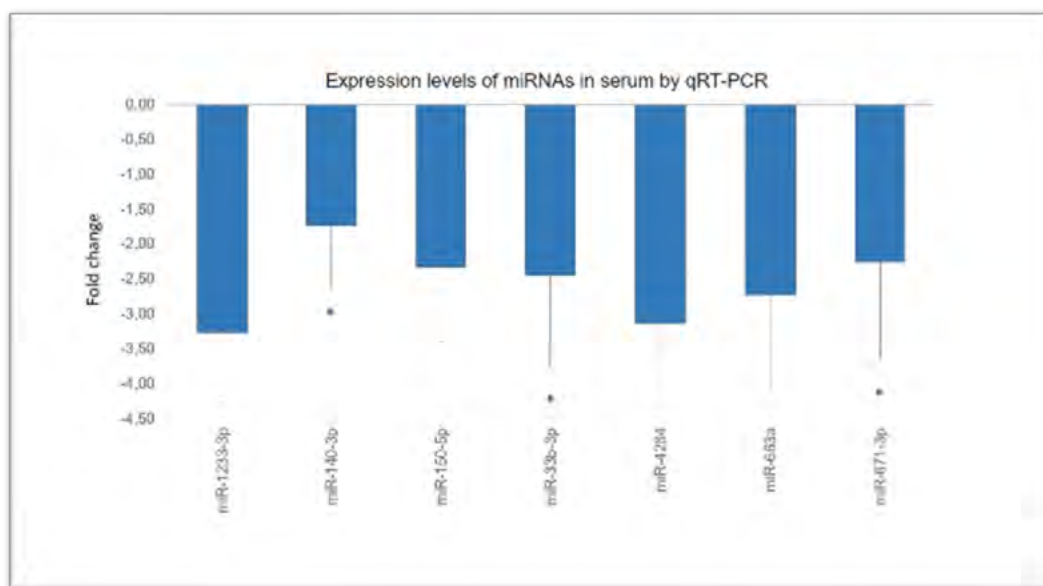
Εικόνα 25: Ανάλυση ROC των miRNAs, για την εύρεση εκείνων τα οποία διακρίνουν τα ΟΑ δείγματα από δείγματα ελέγχου. Επτά miRNAs επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση και επαλήθευση. Τα hsa-miR-1233-3p (Α), hsa-miR-140-3p (Β), hsa-miR-150-5p (C), hsa-miR-33-3p (D), hsa-miR-4284 (Ε), hsa-miR-663a (F) και hsa-miR-671-3p (G) παρουσίασαν τιμή Area Under the Curve (AUC) > 0,8 και $p < 0,01$.

B.2.3 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης επιλεγμένων miRNAs με την μέθοδο qRT-PCR στον ορό ατόμων με ΟΑ σε σχέση με υγιή άτομα.

Τα επίπεδα έκφρασης των 7 επιλεγμένων miRNAs (hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p και hsa-miR-671-3p) επαληθεύτηκαν με qRT-PCR σε όλα τα δείγματα ορού. Μεταξύ των προαναφερόμενων 7 miRNAs, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-140-3p και hsa-miR-671-3p παρουσίασαν μειωμένη έκφραση στα ΟΑ δείγματα σε σχέση με τα φυσιολογικά, μετά την ποσοτικοποίηση από την τεχνική της qRT-PCR ($p < 0,05$).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των hsa-miR-33b-3p και hsa-miR-4284 παρουσίασαν το ίδιο πρότυπο έκφρασης μεταξύ της ανάλυσης με μικροσυστοιχιών και της qRT-PCR, εμφανίζοντας μειωμένη έκφραση στον ορό των δειγμάτων από ΟΑ άτομα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p και hsa-miR-671-3p, τα οποία βρέθηκαν να υπερεκφράζονται με τη τεχνική των μικροσυστοιχιών, παρουσίασαν μειωμένη έκφραση με τη μέθοδο qRT-PCR. Αυτή η απόκλιση μπορεί να οφείλεται σε τεχνικούς περιορισμούς της μεθοδολογίας μικροσυστοιχιών. Ωστόσο, η παρατηρούμενη διαφορά δεν ήταν σημαντική, γεγονός που υποδεικνύει ότι η διακύμανση της έκφρασης μεταξύ αυτών των miRNAs είναι υψηλή και συνεπώς τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα (Εικόνα 26).

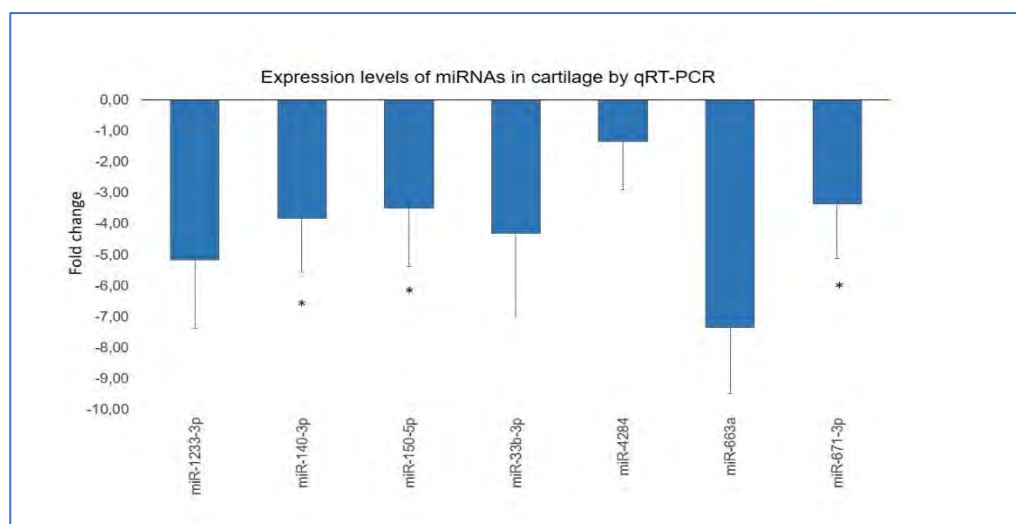
Συμπερασματικά, αναδεικνύεται ένα προφίλ έκφρασης miRNAs στον ορό ατόμων με ΟΑ. Συγκεκριμένα, τα miR-140-3p, miR-671-3p και hsa-miR-33b-3p θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες, με τη προϋπόθεση ότι το πρότυπο έκφρασής τους επιβεβαιωθεί και σε χονδροκύτταρα από δείγματα αρθρικού χόνδρου των ιδίων ασθενών.



Εικόνα 26: Διάγραμμα των σχετικών επιπέδων έκφρασης των 7 miRNAs (hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a και hsa-miR-671-3p με qRT-PCR στον ορό φυσιολογικών ατόμων (n = 7) και ατόμων με οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) (n = 12) *p<0.05.

B.2.4 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης επιλεγμένων miRNAs με την μέθοδο qRT-PCR σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων από άτομα με ΟΑ σε σχέση με υγιή άτομα.

Για τα 7 miRNAs (hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p και hsa-miR-671-3p), για τα οποία είχαν βρεθεί διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης στον ορό ατόμων με ΟΑ σε σχέση με φυσιολογικά άτομα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των επιπέδων έκφρασής τους και στα αντίστοιχα δείγματα αρθρικού χόνδρου. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης των hsa-miR-140-3p, hsa-miR-150-5p και hsa-miR-671-3p παρουσίασαν μειωμένη έκφραση μετά την ποσοτικοποίηση με qRT-PCR ($p < 0.05$) (Εικόνα 27). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές για τα επίπεδα έκφρασης των hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a και hsa-miR-1233-3p μεταξύ ΟΑ και φυσιολογικών χονδροκυττάρων.



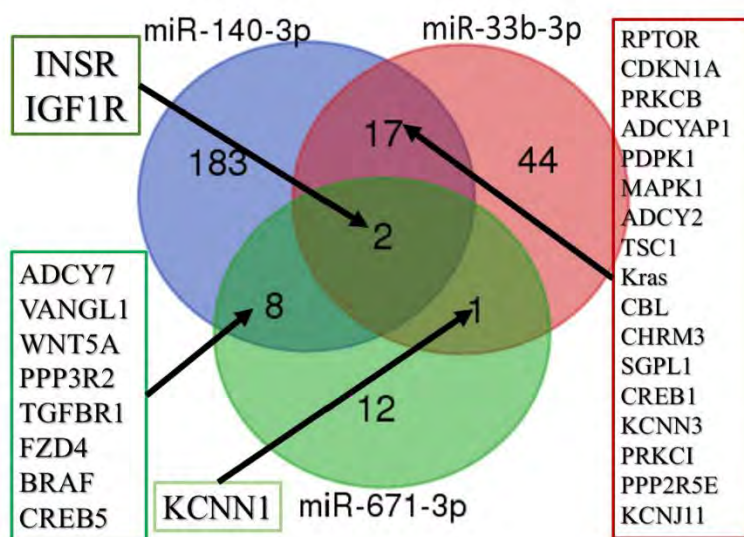
Εικόνα 27: Αποτελέσματα της έκφρασης των miRNAs (miR-1233, miR-33b-3p, miR-140-3p, miR-150-5p, miR-663-3p, miR-671-3p και miR-4284) σε χονδροκύτταρα ατόμων με ΟΑ σε σχέση με φυσιολογικά άτομα (Real time-PCR).

Με το δεδομένο ότι ο λειτουργικός ρόλος του miR-140-3p στην ΟΑ δεν είναι γνωστός, το miR-140-3p αναδείχθηκε ως ένα υποψήφιο miR για τη συνέχεια της μελέτης. Δεδομένου, ότι ένα μόνο microRNA έχει πολλά mRNAs στόχους και ότι κάθε mRNA μπορεί να είναι ο στόχος για πολλά microRNAs, είναι σαφές ότι για τη πλήρη κατανόηση του συστήματος και του ρόλου δράσης των miRNAs, ο συνδυασμός πειραματικών δεδομένων με δεδομένα βιοπληροφορικής ανάλυσης και μαθηματικών μοντέλων αποτελεί τη καλύτερη προσέγγιση.

B.2.5 Ανάλυση σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν τα miRNAs και πρόβλεψη γονιδίων στόχων τους.

Η ανάλυση σηματοδοτικών μονοπατιών με εργαλεία βιοπληροφορικής των 77 miRNAs που βρέθηκαν σημαντικά στην ανάλυση ROC, προέβλεψε ότι αυτά τα miRNAs ενέχονται σε σηματοδοτήσεις που σχετίζονται με παθογένεια της OA, όπως FoxO, mTOR, Sphingolipoid, MAPK, PI3K-Akt, Wnt, ErbB, μονοπάτια οιστρογόνου και TGF και στη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων.

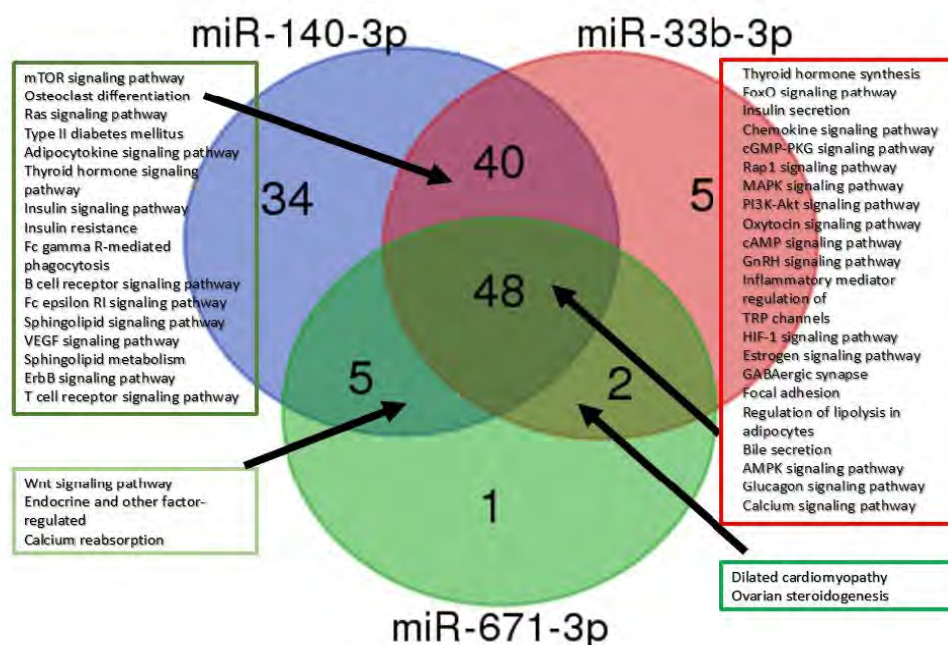
Επιπλέον, εξετάζοντας τα δεδομένα από τη μέθοδο qRT-PCR, έγινε εστίαση στα προβλεπόμενα γονίδια-στόχους των 3 miRNAs (hsa-miR-140-3p, hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-671-3p) που παρουσίασαν μειωμένη έκφραση στον ορό ασθενών με OA, με τη χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής TargetScan. Πιο συγκεκριμένα, 28 γονίδια αποτελούν προβλεπόμενους στόχους για τουλάχιστον δύο miRNAs. Μεταξύ αυτών, τα *INSR* και *IGF1R* αποτελούν στόχους και για τα τρία miRNAs, ενώ τα *ADCY7*, *VANG1*, *WNT5A*, *PPP3R2*, *TGFBR1*, *FZD4*, *BRAF*, *CREB5* αποτελούν στόχους για το hsa-miR-140-3p και το hsa-miR-671-3p. Τα *RPTOR*, *CDKN1A*, *PRKCB*, *ADCYA1*, *PDPK1*, *MAPK1*, *ADCY2*, *TCS1*, *Kras*, *CBL*, *CHRM3*, *SGL1*, *CREB1*, *KCNN3*, *PRKC1*, *PPP2R5E*, *KCNJ11* αποτελούν στόχους για τα hsa-miR-33b-3b και miR-140-3p και το *KCNN1* αποτελεί στόχο για το hsa-miR-671-3p και το hsa-miR-33b-3p (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Διάγραμμα Venn όπου απεικονίζονται τα κοινά γονίδια στόχοι μεταξύ miR-140-3p, miR-33b-3p και miR-671-3p.

Η ανάλυση σηματοδοτικών μονοπατιών ανέδειξε ότι τα γονίδια στόχοι των hsa-miR-140-3p, hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-671-3p ενέχονται σε 48 κοινά μονοπάτια σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης θυρεοειδικών ορμονών, το μονοπάτι σηματοδότησης FoxO, έκκριση ινσουλίνης, μονοπάτι σηματοδότησης MAPK, μονοπάτι σηματοδότησης PI3K-Akt, μονοπάτι σηματοδότησης οιστρογόνου, ρύθμισης της λιπόλυσης στα λιποκύτταρα, μονοπάτι σηματοδότησης γλουκαγόνης και μονοπάτι σηματοδότησης ασβεστίου, ενώ 40 κοινά μονοπάτια σηματοδότησης βρέθηκαν να είναι κοινά μεταξύ miR-140-3p και miR-33b-3p, όπως μονοπάτι σηματοδότησης mTOR, διαφοροποίηση οστεοκλαστών, μονοπάτι σηματοδότησης Ras, σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, μονοπάτι σηματοδότησης αντιποκυτοκίνης, μονοπάτι σηματοδότησης ορμονών θυρεοειδούς, μονοπάτι σηματοδότησης ινσουλίνης, αντίσταση της ινσουλίνης, μονοπάτι σηματοδότησης σφιγγολιπιδίων και μονοπάτι ErbB σηματοδότησης. Επιπλέον, προβλέφθηκαν 5 μονοπάτια

σηματοδότησης που είναι κοινά μεταξύ miR-140-3p και miR-671-3p, συμπεριλαμβανομένου του μονοπατιού Wnt.

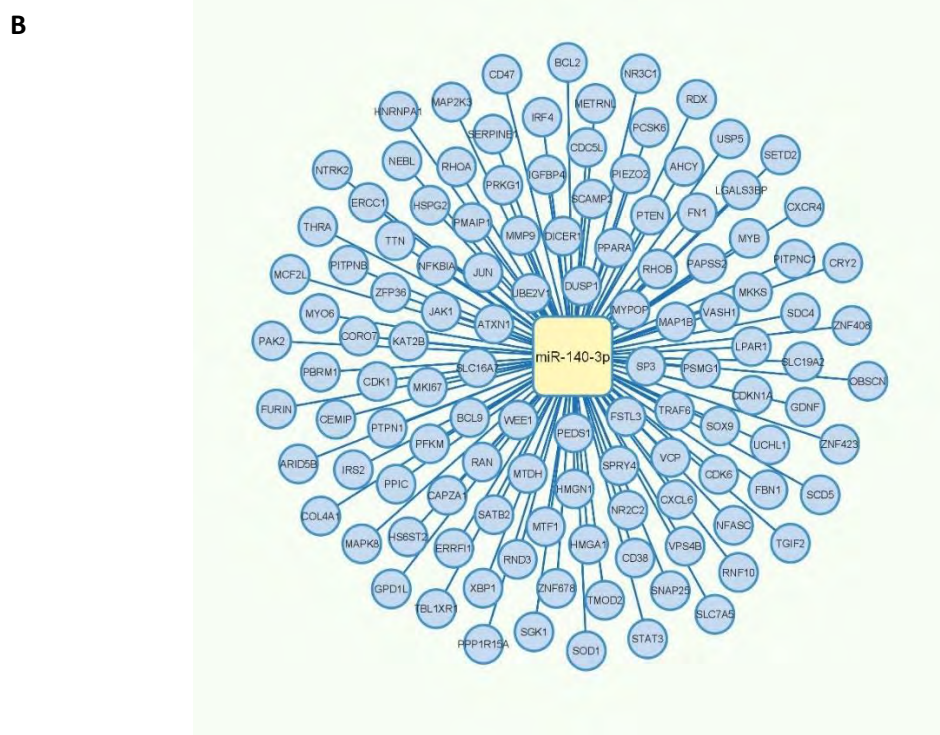
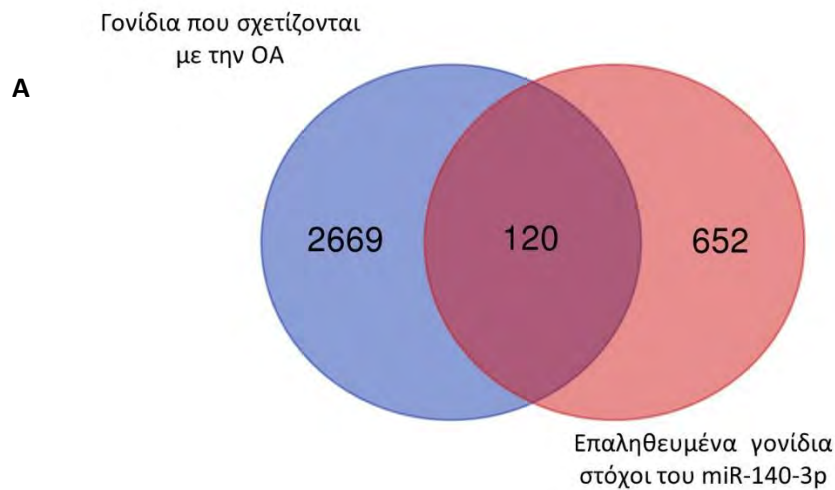


Εικόνα 29: Διάγραμμα Venn όπου απεικονίζονται τα κοινά προβλεπόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια μεταξύ miR-140-3p, miR-33b-3p και miR-671-3p.

B.2.6 Ανεύρεση γονιδίων στόχων του miR-140-3p που σχετίζονται με την OA

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του miR-140-3p σε σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια ή διεργασίες που σχετίζονται με την έναρξη και την εξέλιξη της OA, ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση με τη χρήση ειδικών εργαλείων.

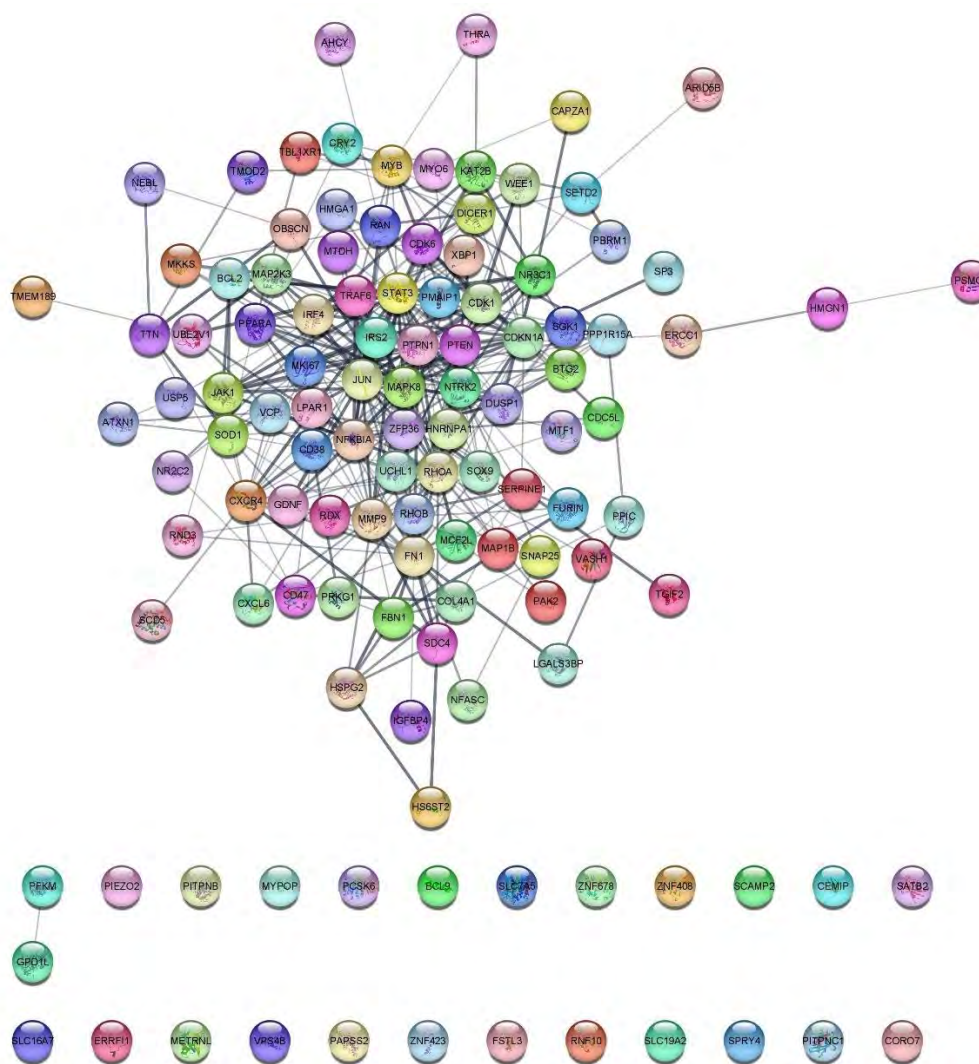
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση για την εύρεση των επαληθευμένων γονιδίων στόχων του miR-140-3p με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής (Tarbase v8.0, miRTarbase v9.0 και miRWALK v3.0). Στη συνέχεια βρέθηκε ότι 120 από αυτά τα γονίδια έχουν συσχετιστεί με την OA, σύμφωνα με την βάση δεδομένων Open Targets τα οποία απεικονίστηκαν σε δίκτυο (Εικόνα 30) με το λογισμικό Cytoscape v3.9.1.



Εικόνα 30: Επαληθευμένα γονίδια στόχοι του miR-140-3p. (Α) Διάγραμμα Venn που περιλαμβάνει τους επαληθευμένους στόχους που προέρχονται από τρεις βάσεις δεδομένων (Tarbase v8.0, miRTarbase v9.0 και miRWALK v3.0) και τα γονίδια που σχετίζονται με την ΟΑ, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Open Targets. (Β) Το δίκτυο miRNA-επαληθευμένων γονιδίων στόχων που σχετίζονται με την ΟΑ στο Cytoscape v3.9.1.

B.2.7 Δημιουργία και ανάλυση του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των επαληθευμένων στόχων του miR-140-3p με την ΟΑ.

Για να διερευνηθούν περαιτέρω οι σχέσεις των στόχων του miR-140-3p, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του δικτύου των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (PPI) στη βάση δεδομένων String με Confidence score > 0.4. Οι πρωτεΐνες απεικονίζονται από τους κόμβους (nodes) του δικτύου και οι αλληλεπιδράσεις τους από τις ακμές (edges). Συνολικά, δημιουργήθηκε ένα δίκτυο PPI που περιείχε 119 κόμβους και 384 ακμές (Εικόνα 31).



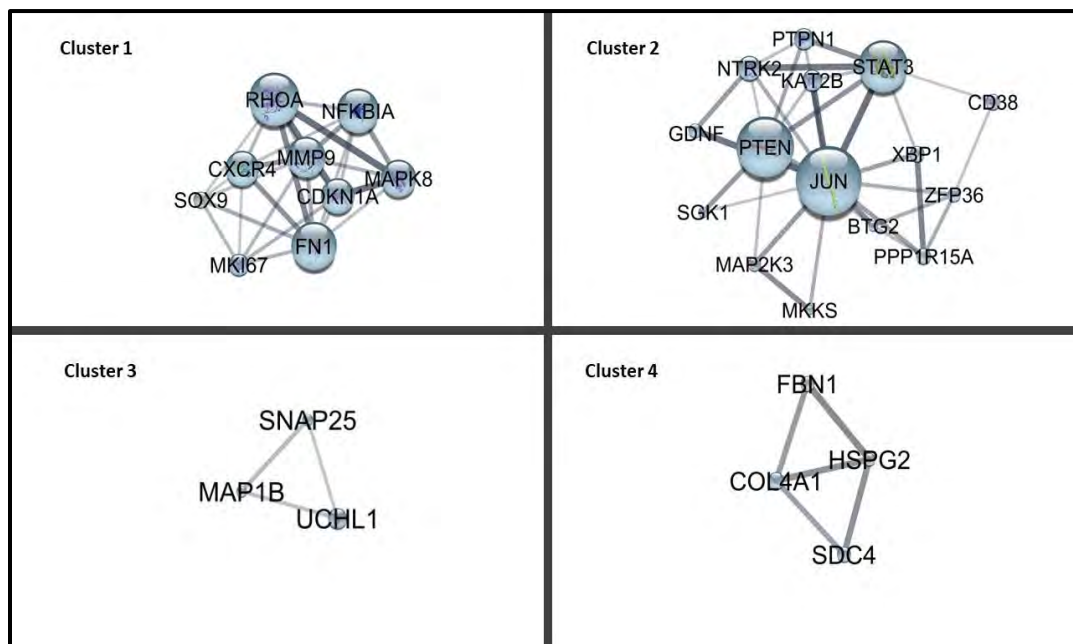
Εικόνα 31: PPI δίκτυο των σχετιζόμενων με την ΟΑ γονιδίων στόχων του miR-140-3p.

Η ανάλυση της τοπολογίας του δικτύου πραγματοποιήθηκε ώστε να αναδειχθούν πρωτεΐνες (κόμβοι) και να προσδιοριστούν οι σημαντικότερες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του PPI

δικτύου. Συγκεκριμένα, το plug-in του Cytoscape, MCODE χρησιμοποιήθηκε ώστε να αναγνωριστούν οι στενά διασυνδεδεμένες περιοχές από το δίκτυο πρωτεϊνών με τη μορφή συμπλέγματα (cluster). Η ανάλυση έδειξε 4 clusters από το δίκτυο PPI με βαθμολογίες MCODE 7, 4,7, 3,3, 3. Τα συμπλέγματα σε ένα δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων αποτελούν τις περισσότερες φορές είτε σύμπλοκα πρωτεϊνών είτε τμήματα μονοπατιών ³⁰³. Τα συμπλέγματα που προέκυψαν αναπαρίστανται γραφικά στην Εικόνα 32 και αναφέρονται αναλυτικά στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 15). Τα γονίδια, τα οποία εμφάνισαν τη μεγαλύτερη συνδεσιμότητα ήταν το γονίδιο *RHO* από το cluster 1 και τα *JUN*, *PTEN* και *STAT3* από το cluster 2.

Cluster	Score (Density x No. of nodes)	Nodes	Edges	Node IDs
1	7	9	28	MAPK8, NFKBIA, CDKN1A, MMP9, RHOA, FN1, MKI67, CXCR4, SOX9
2	4,7	15	33	BTG2, CD38, GDNF, JUN, KAT2B, MAP2K3, MKKS, NTRK2, PPP1R15A, PTEN, PTPN1 SGK1, STAT3, XBP1, ZFP36
3	3,3	4	5	HSPG2, FBN1, SDC4, COL4A1
4	3	3	3	MAP1B, SNAP25, UCHL1

Πίνακας 15: Οι πιο διασυνδεδεμένες περιοχές ομαδοποιούνται σε clusters με τη χρήση του MCODE.



Εικόνα 32: Τα επιμέρους δίκτυα (clusters) που δημιουργήθηκαν με τη χρήση του MCODE.

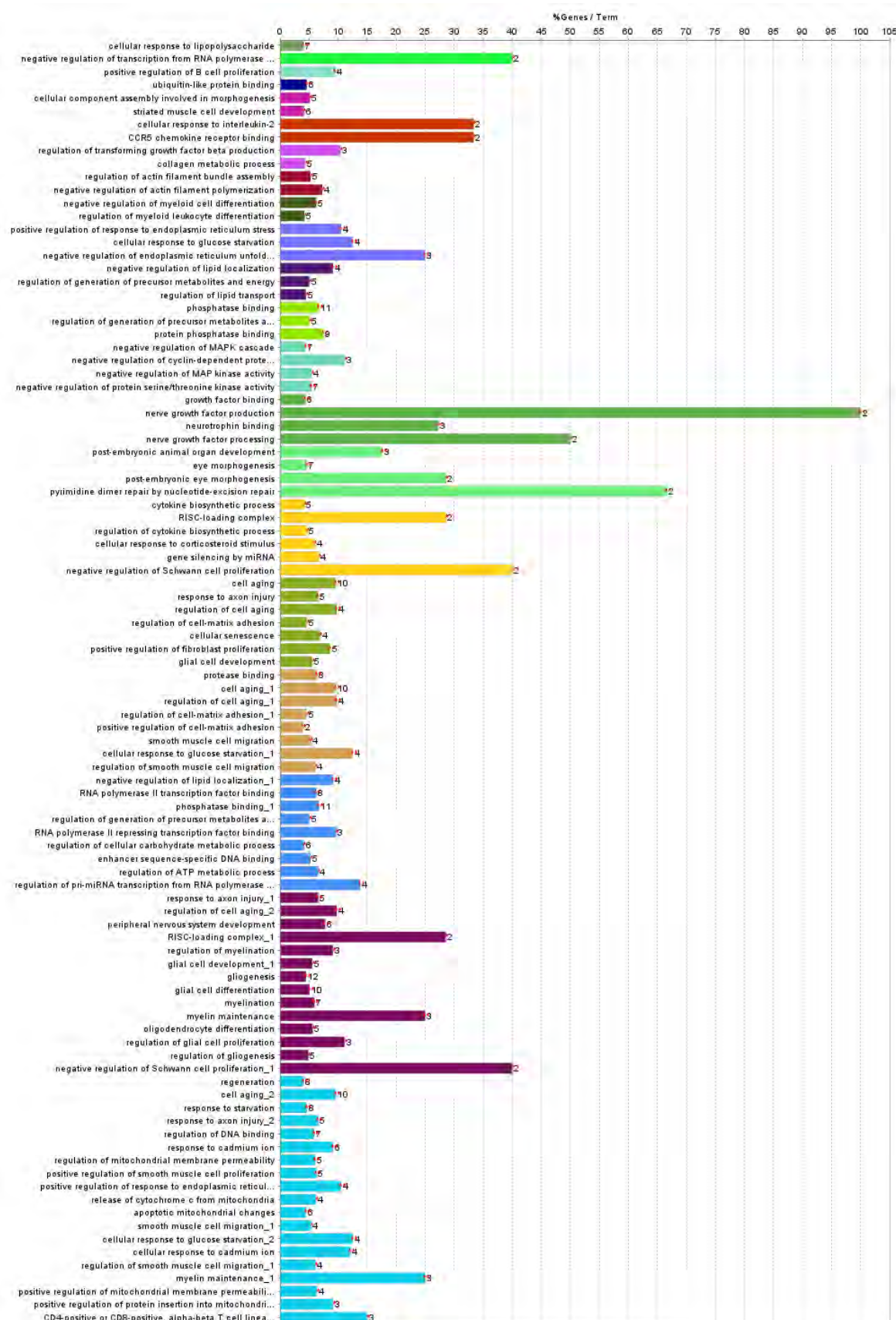
Τέλος, η ανάλυση με το plug-in του Cytoscape, CytoHubba, με τον αλγόριθμο του degree έδειξε ότι οι 10 σημαντικότερες (hub) πρωτεΐνες στο δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων ήταν οι JUN, PTEN, STAT3, RHOA, FN1, NFKBIA, MMP9, MAPK8, CXCR4, CDKN1A, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα του MCODE.

B.2.7 Ανεύρεση σηματοδοτικών μονοπατιών και δικτύων που συνδέουν το miR-140-3p με την ΟΑ.

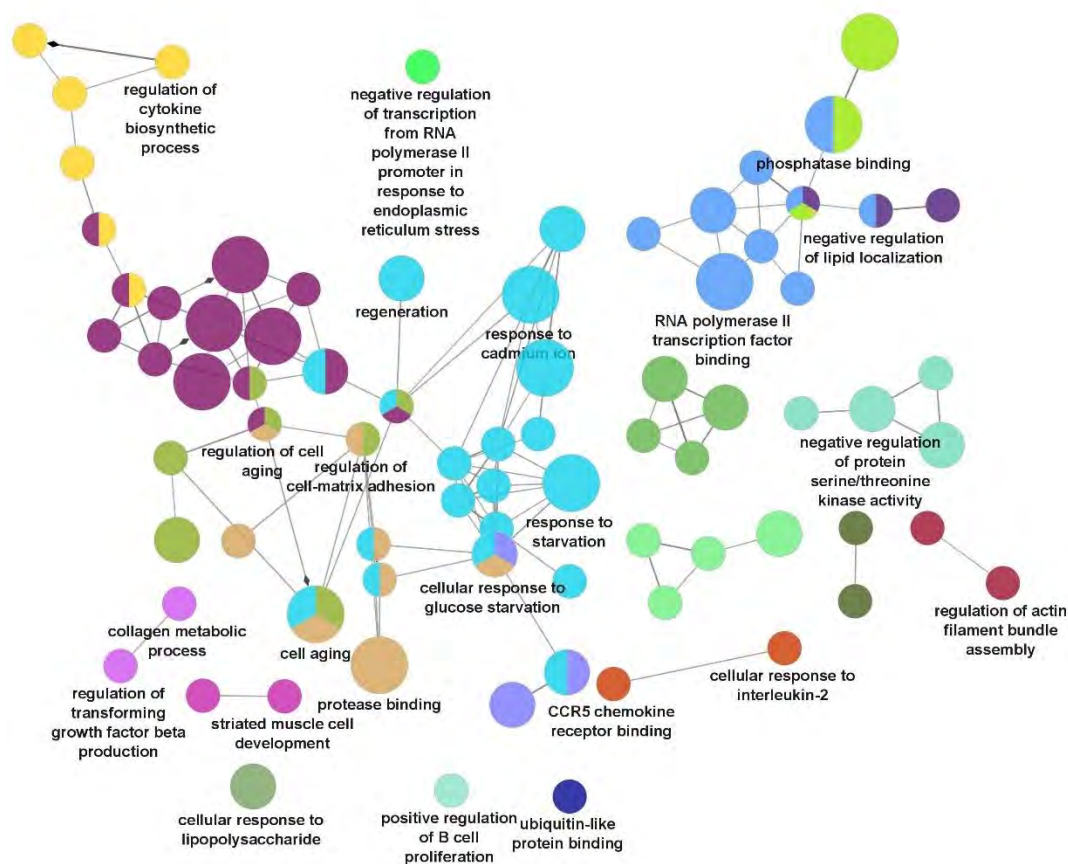
Για τη περαιτέρω συστηματική ανάλυση και κατανόηση της βιολογικής λειτουργίας των γονιδίων στόχων του miR-140-3p, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο βιοπληροφορικής GlueGO v2.5.9/ CluePedia v1.5.9 στο περιβάλλον του Cytoscape. Τα κριτήρια για τη στατιστική ανάλυση βασίστηκε σε ένα υπεργεωμετρικό τεστ με $p\text{-value} \leq 0.05$, και διόρθωση Benjamini-Hochberg και kappa βαθμολογία ≥ 0.4 .

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης, η ανάλυση εμπλουτισμού σε οντολογίες (GO) και σηματοδοτικά μονοπάτια κατά KEGG, υποδεικνύουν ότι τα γονίδια στόχοι του miR-140-3p ενέχονται σε μονοπάτια και κυτταρικές διεργασίες, τα οποία σχετίζονται με τη παθογένεια της ΟΑ και την ομοιοστασία του χόνδρου, όπως μονοπάτι σηματοδότησης FoxO (KEGG:04068), μονοπάτι σηματοδότησης p53 (KEGG:04115), εστιακής πρόσφυσης (KEGG:04510), αλληλεπίδραση ECM-υποδοχέα (KEGG:04512), μονοπάτι σηματοδότησης IL-17 (KEGG:04657), μονοπάτι σηματοδότησης TNF (KEGG:04668), μονοπάτι σηματοδότησης αντιποκίνης (KEGG:04920), αντίστασης στην ινσουλίνη (KEGG:04931), κυτταρική γήρανση

(GO:0007569/ GO:0090398) και ρύθμιση της κυτταρικής γήρανσης (GO:0090342) (Εικόνα 33 & Εικόνα 34).



Εικόνα 33: Τα μονοπάτια στα οποία ενέχονται τα γονίδια στόχοι του miR-140-3p (*In silico* ανάλυση).



Εικόνα 34: Απεικόνιση των δικτύων των γονιδιακών οντολογιών και των μοριακών μονοπατιών με την χρήση του Cluego και του Cytoscape.

Αναλύοντας τα μονοπάτια, στη ρύθμιση των οποίων βρέθηκε να παίζει σημαντικό ρόλο το miR-140-3p, παρατηρήσαμε ότι το γονίδιο PTEN αποτελεί το γονίδιο στόχο που ενέχεται σε πολλαπλές βιολογικές διεργασίες και σηματοδοτικά μονοπάτια. Συγκριμένα σύμφωνα με τη ανάλυση εμπλουτισμού GO, οι σημαντικότερες βιολογικές διαδικασίες που ενέχεται το *PTEN* είναι στη κυτταρική γήρανση (GO:0007569) και στη ρύθμισή της (GO:0090342), στην αναγέννηση (GO:0031099), στην αρνητική ρύθμιση του μονοπατιού MAPK (GO:0043409), στην αρνητική ρύθμιση πρωτεϊνών με δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης (GO:0071901), στη προσκόλληση κυττάρου-μήτρας (GO:0001952) και στη πρόσδεση των πρωτεασών (GO:0002020). Ενώ σύμφωνα με την ανάλυση μονοπατιών κατά KEGG, το *PTEN* ενέχεται στα μονοπάτια FoxO (KEGG:04068), p53 (KEGG:04115), εστιακής πρόσφυσης (KEGG:04510) και αντίστασης στην ινσουλίνη (KEGG:04931).

Πίνακας 16).

Επομένως, η *in silico* ανάλυση ανέδειξε ότι το *PTEN* αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους επιβεβαιωμένους στόχους του hsa-miR-140-3p. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω λειτουργικές μελέτες σε ΟΑ χονδροκύτταρα ώστε να επιβεβαιωθούν τα ευρήματα της βιοπληροφορικής.

Κατηγορία	Οντολογία/ Μοριακό μονοπάτι	Pvalue	Γονίδια
GO:0001952	Ρύθμιση της προσκόλλησης κυττάρου-μήτρας	5,04E-08	<i>BCL2, CDK6, PTEN, SDC4, SERPINE1</i>
GO:0002020	Δέσμευση πρωτεασών	1,60E-13	<i>BCL2, FN1, FURIN, PTEN, SERPINE1, TTN, VCP, XBP1</i>
GO:0007569	Κυτταρική γήρανση	9,90E-11	<i>BCL2, CDK1, CDK6, CDKN1A, ERCC1, HMGA1, PTEN, SERPINE1, SOD1, VASH1</i>
GO:0031099	Αναγέννηση	9,90E-11	<i>BCL2, BCL9, CDK1, CDKN1A, JUN, MKI67, NFKBIA, PTEN</i>
GO:0043409	Αρνητική ρύθμιση του μονοπατιού MAPK	0,000068	<i>DUSP1, ERFF1, PTEN, PTPN1, SPRY4, UCHL1, XBP1</i>
GO:0071901	Αρνητική ρύθμιση της πρωτεϊνικής σερίνης/κινάσης θρεονίνης	0,000068 1	<i>CDKN1A, DUSP1, KAT2B, PTEN, PTPN1, SPRY4, UCHL1</i>
GO:0090342	Ρύθμιση της κυτταρικής γήρανσης	3,40E-09	<i>CDK6, HMGA1, PTEN, VASH1</i>
KEGG:04068	Μονοπάτι σηματοδότησης FoxO	1,52E-13	<i>CDKN1A, IRS2, MAPK8, PTEN, SGK1, STAT3]</i>
KEGG:04115	Μονοπάτι σηματοδότησης p53	1,60E-13	<i>CDK1, CDK6, CDKN1A, PMAIP1, PTEN, SERPINE1</i>
KEGG:04510	Εστιακή πρόσφυση	5,05E-08	<i>BCL2, COL4A1, FN1, JUN, MAPK8, PAK2, PTEN, RHOA</i>
KEGG:04931	Αντίσταση στην ινσουλίνη	1,53E-13	<i>IRS2, MAPK8, NFKBIA, PPARA, PTEN, PTPN1, STAT3</i>

Πίνακας 16: Η ανάλυση των μονοπατιών με το εργαλείο Cluego.

B.2.8 *In silico* ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA του *PTEN* με τη χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής TargetScanHuman 8.0.

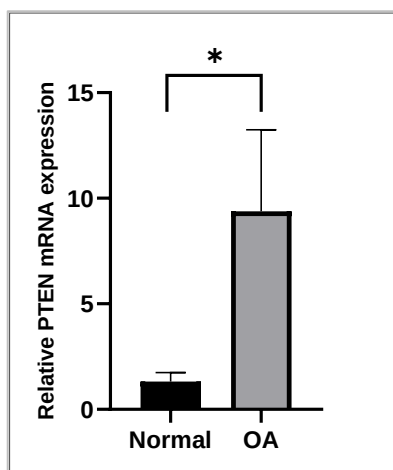
Στη συνέχεια έγινε *in silico* ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA του *PTEN* για την εύρεση λειτουργικών θέσεων σύνδεσης του miR-140-3p, με τη χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής TargetScanHuman 8.0 και έδειξε την ύπαρξη αλληλουχιών, οι οποίες αναγνωρίζονται από το miR-140-3p μέσω των οποίων ασκεί τη δράση του. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν δύο προβλεπόμενες συμπληρωματικές αλληλουχίες για miR-140-3p στο 3'UTR του *PTEN*, στη θέση 1763-1769 και θέση 2882-2888 του *PTEN* (Εικόνα 35).

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score
Position 1763-1769 of PTEN 3' UTR	5' ...GAAAUUGUUCACUAGCUGUGUC...	7mer-m8	-0.15	87	-0.12
hsa-miR-140-3p.2	3' GGCACCAAGAUGG-GACACCAU				
Position 2882-2888 of PTEN 3' UTR	5' ...UGUUCAUAACGAUGGCUGUGGU...	7mer-m8	-0.07	70	-0.05
hsa-miR-140-3p.2	3' GGCACCAAGAUGGACACCAU				

Εικόνα 35: Στο πίνακα παρουσιάζονται οι προβλεπόμενες περιοχές πρόσδεσης του miR-140-3p στη 3'UTR του *PTEN*.

B.2.9 Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *PTEN* σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο ρόλος του *PTEN* στην ΟΑ, προσδιορίστηκε η mRNA έκφραση του σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου έδειξαν αυξημένη μεταγραφική έκφραση του *PTEN* στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά ($p < 0,05$) (Εικόνα 36)

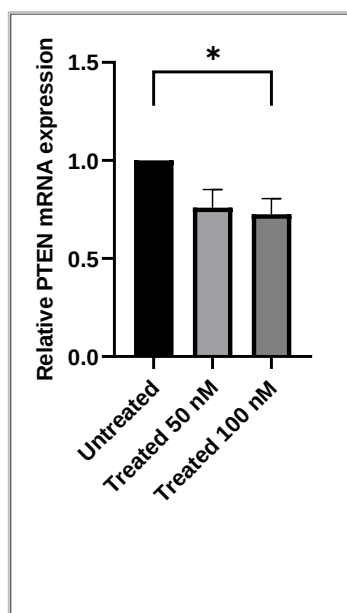


Εικόνα 36: Απεικόνιση των επιπέδων mRNA του γονιδίου PTEN σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων. * $p < 0,05$.

B.2.10 Επίδραση miR-140-3p mimic σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων και μελέτη έκφρασης του γονιδίου στόχου PTEN

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του miR-140-3p στη OA πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των OA χονδροκυττάρων με το miR-140-3p miR mimic (QIAGEN). Η συγκέντρωση του miR-140-3p και της λιποφεκταμίνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 50 και 100 nM, αντίστοιχα. Στη συνέχεια διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου PTEN - προβλεπόμενου γονιδίου στόχου του miR-140-3p με τη μέθοδο της Real time PCR.

Χορήγηση του miR-140-3p mimic για 72 ώρες (100 nM) σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων έδειξε σημαντική μείωση των επιπέδων της mRNA έκφρασης του PTEN σε σχέση με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε miR-140-3p ($p < 0.05$) (Εικόνα 37).

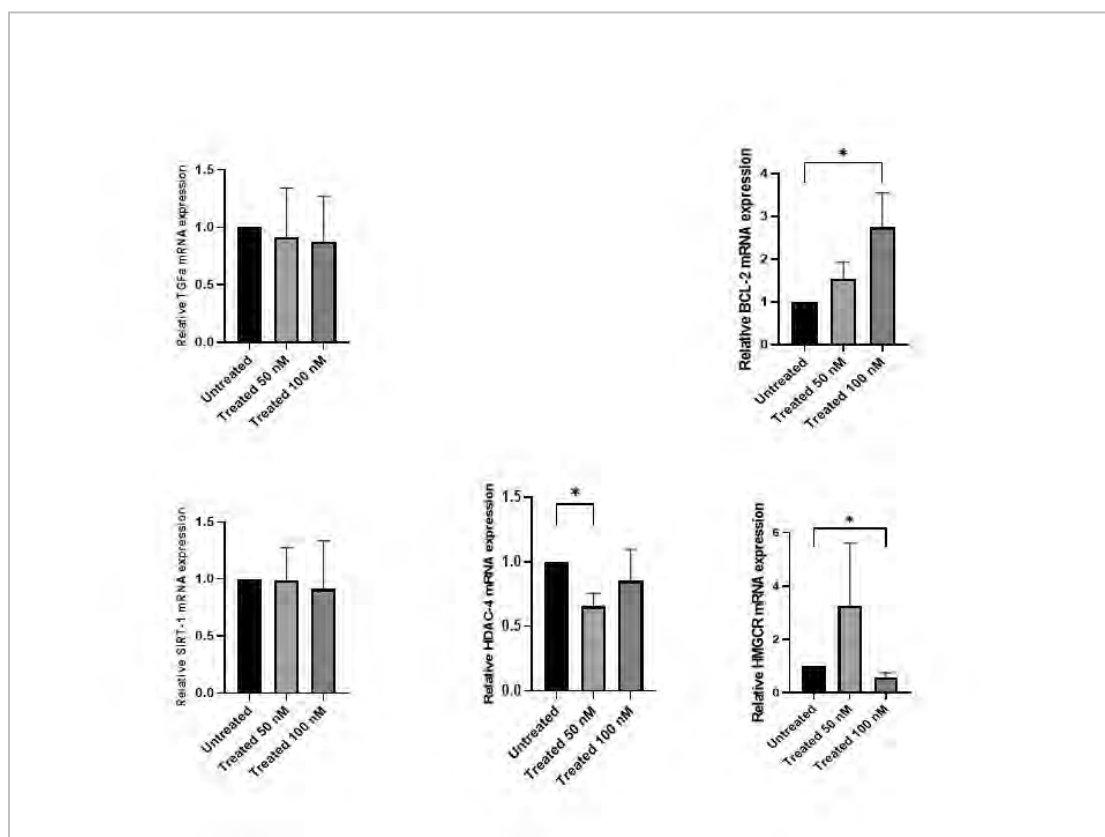


Εικόνα 37: Διάγραμμα της mRNA έκφρασης του PTEN μετά από επίδραση με το miR-140-3p mimic (50 nM, 100 nM) για 72 ώρες σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων.

B.2.11 Επίδραση του miR-140-3p mimic σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων και μελέτη έκφρασης των πιθανών γονιδίων στόχων TGF α , BCL-2, SIRT-1, HMGR και HDAC4.

Επιπλέον, ανάμεσα στα προβλεπόμενα γονίδια στόχους του miR-140-3p, επιλέχθηκαν τα TGF α , BCL-2, SIRT-1, HMGR και HDAC4 και στα οποία πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της ρύθμισης τους από το miR-140-3p σε κυτταρικό επίπεδο με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων της mRNA έκφρασης των HMGR, HDAC4

και αύξηση της mRNA έκφρασης του γονιδίου BCL-2 μετά από χορήγηση του miR-140-3p mimic για 72 ώρες (100 nM), σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων, σε σχέση με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε miR-140-3p ($p < 0.05$). Για τα *TGF α* και *SIRT-1* δε παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή πριν και μετά την επίδραση τους με το miR-140-3p (Εικόνα 38).

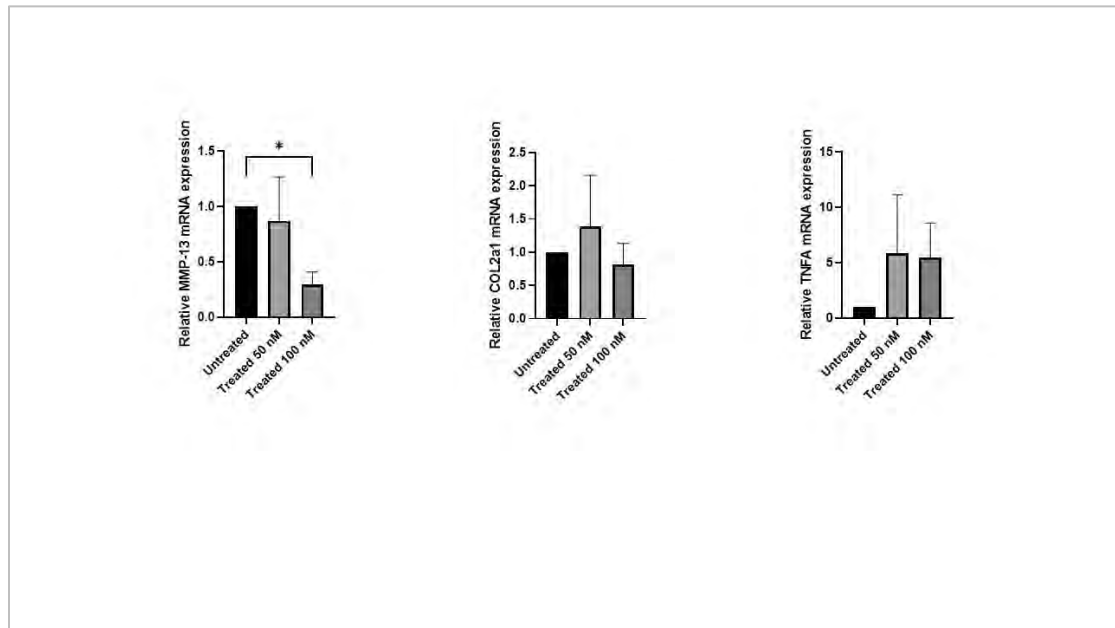


Εικόνα 38: Διάγραμμα της mRNA έκφρασης των TGF α , BCL-2, HDAC-4, SIRT-1, HMGR μετά από επίδραση με το miR-140-3p mimic (50 nM, 100 nM) για 72 ώρες σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων.

B.2.12 Επίδραση miR-140-3p mimic σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων και μελέτη της έκφρασης μοριακών δεικτών της ομοιοστασίας του χόνδρου

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος του miR-140-3p στην εξέλιξη της OA, προσδιορίστηκε η μεταγραφική έκφραση μοριακών δεικτών της ομοιοστασίας του χόνδρου και συγκεκριμένα της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP-13, του COL2A1 και του TNF α στα OA χονδροκύτταρα μετά τη χορήγηση 100 nM του miR-140-3p σε καλλιέργειες OA

χονδροκυττάρων για 72 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα mRNA του MMP-13 μειώθηκαν σημαντικά στα OA χονδροκύτταρα που είχαν υποστεί την επίδραση με miR-140-3p (100 nM) ($p < 0.05$), ενώ για το COL2A1 και το TNFA δε παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του πριν και μετά την επίδραση με το miR-140-3p (Εικόνα 39).



Εικόνα 39: Διάγραμμα της mRNA έκφρασης των MMP-13, TNFA, COL2A1 μετά από επίδραση με το miR-140-3p mimic (50 nM, 100 nM) για 72 ώρες σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων.

B.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι μια χρόνια εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων, που χαρακτηρίζεται από προοδευτικό εκφυλισμό του χόνδρου, αλλαγές στο υποχόνδριο οστό καθώς και σε άλλους ιστούς των αρθρώσεων όπως οι σύνδεσμοι, οι τένοντες, ο μηνίσκος και ο αρθρικός υμένας, με αποτέλεσμα την εμφάνιση συμπτωμάτων στους ασθενείς όπως δυσκαμψία, πόνος και μειωμένη κίνηση^{1,2}. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), οι ρευματικές και μυοσκελετικές παθήσεις (rheumatic and musculoskeletal diseases, RMDs) αποτελούν μία από τις πέντε κύριες αιτίες αναπηρίας παγκοσμίως^{309,310}. Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι η πιο κοινή πάθηση του μυοσκελετικού, με υψηλό επιπολασμό στις μεγαλύτερες ηλικίες³¹¹. Ο επιπολασμός της αυξάνεται σταθερά και αναμένεται να αποτελέσει κύρια αιτία αναπηρίας έως το 2030⁴. Η ΟΑ είναι μια ετερογενής νόσος που ουσιαστικά αποτελείται από μια ομάδα διακριτών διαταραχών των αρθρώσεων με κοινά βιολογικά, μορφολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά²¹. Μέχρι σήμερα, αρκετοί παράγοντες κινδύνου, όπως η γήρανση, η παχυσαρκία, το φύλο, ο τραυματισμός των αρθρώσεων και η κληρονομικότητα φαίνεται να είναι σημαντικοί παράγοντες κινδύνου στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου^{312,313}. Ενώ τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί η συσχέτιση μεταξύ της ΟΑ και του μεταβολικού συνδρόμου ή των παραγόντων μεταβολικού κινδύνου, όπως υπέρταση, αυξημένο σωματικό βάρος, δυσλιπιδαιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη^{314–316}.

Επομένως, η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στην παθογένεια της ΟΑ και σχετίζονται με τους παραπάνω παράγοντες κινδύνου, είναι απαραίτητη για την ανακάλυψη εξατομικευμένων θεραπειών για την ΟΑ. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι παρά τη σημαντική επιβάρυνση που επιφέρει η ΟΑ στους ασθενείς και στα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης³¹⁷, δεν υπάρχουν αποτελεσματικές επιλογές θεραπείας για τη διαχείριση της νόσου με αποτέλεσμα οι ασθενείς να οδηγούνται σε επεμβάσεις αρθροπλαστικής για την αντιμετώπιση του προβλήματος τους.

Μια σημαντική πρόκληση για την ανάπτυξη αποτελεσματικής θεραπείας για την ΟΑ είναι η ανίχνευση της νόσου σε πρώιμο στάδιο. Μέχρι σήμερα, η κύρια μέθοδος για τη διάγνωση και τη σοβαρότητα της νόσου είναι η ακτινογραφία, η οποία φαίνεται να περιορίζεται στα τελευταία στάδια της νόσου και δε δίνει τη δυνατότητα για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου³¹⁸. Συνεπώς, η εύρεση μη επεμβατικών και ευαίσθητων βιοδεικτών στον ορό του αίματος είναι επιτακτική ανάγκη για την πρόγνωση, τη διάγνωση και την έγκαιρη θεραπεία της ΟΑ πριν από την εμφάνιση των ακτινογραφικών ευρημάτων. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, τα miRNAs έχουν προταθεί ως πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες για διάφορες

ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, του διαβήτη και των καρδιαγγειακών παθήσεων^{171,319–321}.

Τα miRNAs είναι μια ομάδα μικρών μη κωδικών RNA, μήκους περίπου 22-28 νουκλεοτιδίων, τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο μέσω της αποδόμησης του mRNA ή της μεταφραστικής καταστολής. Κάθε miRNA μπορεί να ρυθμίσει ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων, με τη πρόσδεση του κυρίως στη 3'UTR των mRNA στόχων¹⁴¹. Τα τελευταία χρόνια, η χρήση των μικροσυστοιχιών για την ανάδειξη ενός προφίλ έκφρασης miRNAs αποτελεί ένα ερευνητικό εργαλείο που παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την παθογένεια πολλών ασθενειών¹⁷¹. Αρκετές μελέτες που στοχεύουν στην εύρεση ενός προφίλ έκφρασης miRNAs έχουν πραγματοποιηθεί σε διαφορετικούς ΟΑ ιστούς και οδήγησαν στον εντοπισμό αρκετών miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση^{175,322}. Σε προηγούμενη μελέτη, η ομάδα του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του ΠΘ ήταν από τους πρώτους που πρότειναν τη συμμετοχή των miRNAs στην παθογένεια της ΟΑ, με την ανάδειξη 16 miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση σε ΟΑ σε σχέση με υγιή αρθρικό χόνδρο³²². Ειδικότερα, τα miRNAs έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένες διαδικασίες που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΟΑ, όπως η ομοιόσταση του χόνδρου, η ρύθμιση της εξωκυττάριας μήτρας, η ενδοχόνδρια οστεοποίηση, ο μεταβολισμός των οστών, η φλεγμονή, η αυτοφαγία, η απόπτωση και ο μεταβολισμός των λιπιδίων^{323,324}. Οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασής τους σε μη φυσιολογικές καταστάσεις μαζί με τη σταθερότητά τους στην κυκλοφορία και τον μεγάλο χρόνο ημιζωής περίπου 5 ημερών στο πλάσμα³²⁵ τα καθιστούν ελκυστικά μόρια για την πρόγνωση ή/και την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου³¹⁹.

Στη παρούσα διδακτορική διατριβή, για την ανεύρεση μιας μοριακής υπογραφής από miRNAs στον ορό ασθενών με ΟΑ, χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία μικροσυστοιχίας (microarrays) υψηλής ανάλυσης που ανιχνεύει την έκφραση 2.549 miRNAs. Εντοπίστηκε μια υπογραφή τριών miRNAs, συμπεριλαμβανομένων των hsa-miR-140-3p, hsa-miR-671-3p και hsa-miR-33b-3p, η έκφραση των οποίων, ήταν μειωμένη στον ορό των ασθενών με ΟΑ σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα, ενώ η *in silico* μελέτη τους ανέδειξε τον προβλεπόμενο ρόλο τους στη ρύθμιση μεταβολικών σηματοδοτικών μονοπατιών³²⁶. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι τα miRNAs που εντοπίζονται στη κυκλοφορία θα μπορούσαν να προέρχονται από τραυματισμό των ιστών³²⁷ ή από αποθήκες λιπώδους ιστού³²⁸, επομένως τα miRNAs του ορού στην ΟΑ θα μπορούσαν δυνητικά να είναι αποτελέσματα του εκφυλισμού του χόνδρου, της απόπτωσης ή της φλεγμονής. Επομένως το προφίλ έκφρασης των miRNAs στον ορό ατόμων με ΟΑ θα μπορούσε να αποτελεί το δακτυλικό αποτύπωμα της ασθένειας.

Μέχρι σήμερα, έχουν διεξαχθεί διάφορες μελέτες, για την αναγνώριση του προφίλ έκφρασης των miRNAs στον ορό, το πλάσμα, το αρθρικό υγρό ή στα κύτταρα του αίματος μεταξύ ασθενών με OA, με διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ των μελετών. Πιο συγκεκριμένα, οι Okuhara et al., διερεύνησαν την έκφραση των hsa-miR-146a, hsa-miR-155, hsa-miR-181a και hsa-miR-223 με qRT-PCR σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με OA και υγιών ατόμων και συσχέτισαν την έκφρασή τους με την εξέλιξη της νόσου¹⁷³. Σε μια μεταγενέστερη μελέτη, η έκφραση 380 miRNAs χρησιμοποιώντας συστοιχίες χαμηλής ανάλυσης TaqMan, αξιολογήθηκε στο πλάσμα ασθενών με πρωτοπαθή οστεοαρθρίτιδα και φυσιολογικών ατόμων. Από τα 380 miRNAs, 12 miRNAs (hsa-miR-16, hsa-miR-20b, hsa-miR-29c, hsa-miR-30b, hsa-miR-93, hsa-miR-126, hsa-miR-146a, hsa-miR-184, hsa-miR-186, hsa-miR-195, hsa-miR-345 και hsa-miR-885) διαπιστώθηκε ότι υπερεκφράζονται σε ασθενείς με OA³²⁹. Μια άλλη μελέτη των Beyer et al ³³⁰, αναγνώρισε το let-7e στον ορό μιας μεγάλης πληθυσμιακής κοόρτης ασθενών με OA, που υπεβλήθησαν σε αρθροπλαστική, ως πιθανό προγνωστικό παράγοντα για σοβαρή οστεοαρθρίτιδα γόνατος ή ισχίου. Ωστόσο, η έκφρασή του δεν επιβεβαιώθηκε σε δείγματα αρθρικού χόνδρου OA. Ενώ οι Li et al, μελέτησαν το προφίλ των miRNAs στο αρθρικό υγρό και ευρέθησαν 7 miRNAs με αυξημένη έκφραση (miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-29c-3p, miR-34a-5p και miR-186-5p) σε ασθενείς με προχωρημένη OA σε σύγκριση με ασθενείς με OA σε αρχικό στάδιο και το miR-378a-5p αναγνωρίστηκε ως το κυρίως ανιχνεύσιμο miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση σε προχωρημένη OA¹⁷⁵. Σε μια μελέτη που περιλάμβανε γυναίκες από την κοόρτη OFELY, όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τη μέθοδο next generation sequencing, τα miR-146a-5p και miR186-5p, εμφάνισαν αυξημένη έκφραση σε άτομα με OA γόνατος σε σχέση με υγιή άτομα¹⁷⁶. Οι Ali et al, ανίχνευσαν 11 miRNAs, τα οποία διαφοροποιούνται στο πλάσμα μεταξύ ασθενών σε αρχική και πιο προχωρημένη φάση της OA γόνατος σύμφωνα με ακτινογραφικά ευρήματα¹⁷⁷. Πρόσφατα, miRNAs που έχουν βρεθεί στη κυκλοφορία είναι τα miR-200c-3p, miR-100-5p, miR-1826 και miR-29b-3p^{178,179}. Ενώ τα επίπεδα του miR-210 στο αρθρικό υγρό (SF) έχουν επίσης αναδειχθεί ως δυναμικός διαγνωστικός βιοδείκτης λόγω της αύξησής τους στην πρώιμη OA, και τα επίπεδα του miR-30c-5p βρέθηκαν σχετίζονται με μετεγχειρητικό πόνο^{181,182}. Η αδυναμία μεταξύ των δημοσιευμένων μελετών να αποκαλύψουν σταθερά διαφοροποιημένα κυκλοφορούντα miRNAs στην OA θα μπορούσε να αποδοθεί σε διαφορές στο σχεδιασμό της μελέτης, όπως η επιλογή ασθενών, η κατάσταση της νόσου, οι διαφορές στην εθνικότητα^{331,332}, οι διαφορετικές πλατφόρμες, τα εργαλεία βιοπληροφορικής και οι μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιούνται σε κάθε μελέτη.

Στη παρούσα διατριβή μεταξύ των 2.549 miRNAs, εντοπίστηκαν με τη τεχνική των μικροσυστοιχιών (miRNA microarrays), 279 miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στον ορό μεταξύ ασθενών με ΟΑ και υγιών ατόμων, από τα οποία 205 παρουσίασαν αυξημένη και 74 μειωμένη έκφραση. Προκειμένου να αξιολογηθεί ο διαγνωστικός ρόλος των miRNAs στον ορό ατόμων με ΟΑ, υπολογίστηκαν οι καμπύλες ROC. Προέκυψαν 77 miRNAs που έδειξαν σημαντική ευαισθησία και ειδικότητα με τιμές AUC περιοχής $> 0,8$ υποδεικνύοντας ότι αυτά τα miRNAs αποτελούν πιθανούς βιοδείκτες για την ΟΑ. Πολλά από αυτά τα miRNAs έχουν ακόμη άγνωστους ρόλους, που απαιτούν περαιτέρω ανάλυση. Έως σήμερα, η προέλευση και ο ρόλος των miRNAs της κυκλοφορίας σε μια ασθένεια παραμένουν ελάχιστα κατανοητές. Τα στοιχεία δείχνουν ότι τα κυκλοφορούντα miRNAs θα μπορούσαν να μεταφερθούν στην κυκλοφορία μέσω μικροκυστιδίων, εξωσωμάτων, συμπλεγμάτων πρωτεΐνης Ago ή HDL και ότι είτε είναι υποπροϊόντα του κυτταρικού περιεχομένου είτε μεσολαβούν στη διακυτταρική σηματοδότηση που αντικατοπτρίζει την παθοφυσιολογική κατάσταση του κυττάρου. Για να αξιολογήσουμε τη βιολογική σημασία των 77 miRNAs μέσω της ROC ανάλυσης, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση των σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία φαίνεται να ρυθμίζουν, η οποία έδειξε ότι τα γονίδια-στόχοι τους ενέχονται συνήθως σε μονοπάτια που σχετίζονται με την ΟΑ, όπως mTOR, PI3K/Akt, Wnt, TGF, μονοπάτια σηματοδότησης της β-αντιποκίνης, αντίστασης στην ινσουλίνη, FoxO, αυτοφαγία και μεταβολισμού των λιπαρών οξέων.

Στη συνέχεια, τα επίπεδα έκφρασης των 7 miRNAs επαληθεύτηκαν με qPCR, η οποία είναι μια μέθοδος που προσφέρει υψηλή ακρίβεια, ευαισθησία και δυναμικό εύρος³³³. Επιλέχθηκαν 7 από τα 77 miRNAs, τα οποία ήταν μεταξύ των κορυφαίων 20 που εμφάνισαν αυξημένη ή μειωμένη έκφραση με τη τεχνική των μικροσυστοιχιών, και συγκεκριμένα τα hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p και hsa-miR-671-3p. Βρέθηκε ότι τρία miRNAs, τα hsa-miR-140-3p, hsa-miR-671-3p και hsa-miR-33b-3p, είχαν σημαντικά μειωμένη έκφραση στον ορό ασθενών με ΟΑ σε σύγκριση με την ομάδα των φυσιολογικών ατόμων. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης των hsa-miR-140-3p και hsa-miR-671-3p είχαν επίσης σημαντικά μειωμένη έκφραση σε χονδροκύτταρα από ΟΑ άτομα σε σχέση με φυσιολογικά άτομα.

Το hsa-miR-140 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση και τη χονδρογένεση του χόνδρου^{211,334,335} και έχει αναφερθεί προηγουμένως ότι εμφανίζει διαφοροποιημένη έκφρασή στον ΟΑ χόνδρο^{173,336} και αρθρικό υγρό³³⁷ αλλά όχι στον ορό. Το hsa-miR-140 παράγει δύο ώριμα microRNAs: το hsa-miR-140-5p και το hsa-miR-140-3p. Μια μελέτη, όπου

χρησιμοποιήθηκε small RNA sequencing, αποκάλυψε ότι το hsa-miR-140-3p εκφράζεται σε πιο υψηλά επίπεδα στον ανθρώπινο χόνδρο από το hsa-miR-140-5p και ότι το hsa-miR-140-3p υπάρχει σε πολλαπλά isomiR. Τα isomiRs διαφέρουν από την κανονική αλληλουχία miRNA είτε στο 5' είτε στο 3' άκρο. Η συγκεκριμένη μελέτη, προτείνει ότι το isomiR miR-140-3p.1 έχει μεγαλύτερη λειτουργική σημασία από το κανονικό isomiR miR-140-3p³³⁸. Επιπλέον, αρκετά κυκλικά RNA έχουν αναγνωριστεί να σχηματίζουν σφουγγάρια (sponges) μαζί με το hsa-miR-140-3p, συμπεριλαμβανομένων των circ_0136474³³⁹, circSCAPER³⁴⁰ και circ_0128846³⁴¹, τα οποία προάγουν την εξέλιξη της ΟΑ, μέσω της ρύθμισης των γονιδίων-στόχων του hsa-miR-140-3p, MECP2³³⁹, EZH2³⁴² και JAK2³⁴³, αντίστοιχα. Ενώ σε μια άλλη μελέτη, αναδείχθηκε ότι το μακρύ μη κωδικό RNA, LINC01385 ρυθμίζει το miR-140-3p και το γονίδιο στόχο του TLR4³⁴⁴.

Το hsa-miR-33 έχει δύο ισόμορφες, το hsa-miR-33a και το hsa-miR-33b, που μοιράζονται την ίδια αλληλουχία seed, έχουν τους ίδιους προβλεπόμενους στόχους και ρυθμίζουν και τα δύο τον μεταβολισμό των λιπιδίων και της χοληστερόλης^{345,346}. Η ομάδα μας έχει τονίσει τον ρόλο του hsa-miR-33a στη ρύθμιση των γονιδίων εξόδου της χοληστερόλης από τα κύτταρα³⁴⁷. Το hsa-miR-33b δείχθηκε ότι ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων³⁴⁸ και τις διαφορετικές λειτουργίες του miR-33a των μακροφάγων που έχουν ρόλο στην ανάπτυξη και την πρόοδο της αθηροσκλήρωσης³⁴⁹. Στην ΟΑ, το hsa-miR-33b-3p προωθεί τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και αναστέλλει την απόπτωση τους μέσω του γονιδίου στόχου του DNMT3A³⁵⁰.

Όσον αφορά το hsa-miR-671, εκτός από το ρόλο του στη μετανάστευση καρκινικών κυττάρων³⁵¹, πρόσφατα δείχθηκε ότι ρυθμίζει αποπτωτικά γονίδια όπως η κασπάση 8 και η p38³⁵¹ και ότι καταστέλλει τη φλεγμονή που προκαλείται από μακροφάγα σε βλαστοκύτταρα που προέρχονται από το λιπώδη ιστό αυξάνοντας την έκφραση των IL-1RA και TNFR1^{352,353}, υπογραμμίζοντας τον πιθανό ρόλο του στην απόπτωση και τη φλεγμονή, δύο διαδικασίες που σχετίζονται με την ΟΑ. Σε χονδροκύτταρα, το hsa-miR-671-5p ενέχεται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων, των φλεγμονωδών αποκρίσεων και της αποικοδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας³⁵⁴, ενώ το hsa-671-3p έχει δείχθει ότι στοχεύει το TRAF3 και συμμετέχει στη ρύθμιση της απόπτωσης και της φλεγμονής των χονδροκυττάρων³⁵⁵.

Η ανάλυση των γονιδίων στόχων των hsa-miR-140-3p, hsa-miR-33b-3p και hsa-miR-671-3p αποκάλυψε ότι 28 γονίδια είναι στόχοι από τουλάχιστον δύο miRNAs. Μεταξύ των κοινών γονιδίων-στόχων ήταν το *IGF1R* (Insulin-like growth factor 1 receptor), το *InsR* (Insulin

receptor), το *TGFβR1* (transforming growth factor beta receptor 1), το *CREB5* (cAMP responsive element binding protein 5), το *NFκB* (nuclear factor κB) και το *TNFα* (tumor necrosis factor α), γονίδια που έχουν βρεθεί να ενέχονται σε φλεγμονώδεις και μεταβολικές διεργασίες όπως αποκαλύπτεται από τη βιοπληροφορική ανάλυση των σηματοδοτικών μονοπατιών. Ένα ενδιαφέρον εύρημα της *in silico* ανάλυσης ήταν ότι οι υποδοχείς InsR και IGFR1 ήταν κοινοί στόχοι και των τριών hsa-miR-140-3p, hsa-miR-33b-3p και hsa-miR-671-3p. Η ινσουλίνη συνδέεται με υψηλή συγγένεια στον υποδοχέα της ινσουλίνης (InsR) ή με χαμηλότερη συγγένεια στον δομικό και λειτουργικά σχετιζόμενο υποδοχέα αυξητικού παράγοντα που μοιάζει με ινσουλίνη (IGFR)³⁵⁶. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ΟΑ είναι μια μεταβολική νόσος³⁵⁷, η αντίσταση στην ινσουλίνη παίζει βασικό ρόλο στο μεταβολικό σύνδρομο³¹², και ότι πρόσφατα δείχθηκε συσχέτιση μεταξύ της ακτινογραφικής σοβαρότητας της ΟΑ και της αντίστασης στην ινσουλίνη³¹⁶, σε συνδυασμό με τη πρόβλεψη της *in silico* ανάλυσης, υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο της αντίστασης στην ινσουλίνη στην ΟΑ. Ομοίως, ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα στη μελέτη μας ήταν ότι ο CREB5, που στοχεύει ταυτόχρονα τα hsa-miR-140-3p και hsa-miR-671-3p, βρέθηκε να συμμετέχει στη σηματοδότηση έκκρισης ινσουλίνης και στη σηματοδότηση TNF. Ο CREB5 είναι ένας κύριος ρυθμιστής της λιπογένεσης, ο οποίος επίσης ενέχεται στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, της φλεγμονής που σχετίζεται με τη γήρανση και της ομοιόστασης της γλυκόζης^{358,359} και σε καταστάσεις παχυσαρκίας προάγει την αντίσταση στην ινσουλίνη, ενεργοποιώντας τον αναστολέα της μεταγραφής ATF3 (Activating Transcription Factor 3) και μειώνοντας την έκφραση της αδιπονεκτίνης καθώς και του GLUT4 (insulin-sensitive glucose transporter 4)³⁶⁰.

Όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι οι *in silico* προβλέψεις συμβάλλουν θετικά στη μελέτη των hsa-miR-140-3p, hsa-miR-33b-3p και hsa-miR-671-3p της κυκλοφορίας ως νέων βιοδεικτών στον ορό για τη πρόγνωση οστεοαρθρίτιδας, υπογραμμίζοντας τη συμμετοχή τους στη ρύθμιση των μεταβολικών διεργασιών που συμβάλλουν στην παθολογία της ΟΑ. Ωστόσο, πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω λειτουργικές μελέτες για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της βιοπληροφορικής ανάλυσης και για να ρίξουν φως στα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω των οποίων η παραπάνω υπογραφή miRNA οδηγεί στην εμφάνιση και την ανάπτυξη της ΟΑ. Επιπλέον, πρέπει να καθιερωθούν τυποποιημένα πρωτόκολλα για την απομόνωση και ανάλυση των miRNAs της κυκλοφορίας σε μεγαλύτερες ομάδες διαφορετικών εθνοτήτων πριν από τη χρήση τους στην κλινική πράξη.

Δεδομένου ότι τα miRNAs θεωρούνται ελκυστικά θεραπευτικά μόρια λόγω της δράσης τους ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης γονιδίων και του ρόλου που διαδραματίζουν στην εξέλιξη της ΟΑ^{361,362}, επιλέχθηκε το hsa-miR-140-3p για να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος του στην ΟΑ. Στο παρελθόν, στις περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούνταν μια μοναδική τεχνική για την ανακάλυψη ενός γενετικού στόχου ενώ σήμερα χρησιμοποιούνται πολλαπλές προσεγγίσεις που συμβάλλουν στη καλύτερη κατανόηση της γενετικής ρύθμισης. Η ενσωμάτωση πολλαπλών ερευνητικών μεθόδων ή η σύγκριση συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών έχει διευκολυνθεί μέσω των *in silico* μεθόδων. Οι *in silico* μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την ανακάλυψη γονιδιακών στόχων, σηματοδοτήσεων, και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. Ενώ τα τελευταία χρόνια, η υπολογιστική μοντελοποίηση έχει χρησιμοποιηθεί για την οπτικοποίηση και την ευκολότερη διερεύνηση των δικτύων που σχηματίζονται από τα γονίδια που ενέχονται στην ανάπτυξη της ΟΑ.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα miRNAs και οι στόχοι τους συχνά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για να σχηματίσουν ένα ολόκληρο ρυθμιστικό δίκτυο που επηρεάζει πολλαπλές κυτταρικές δραστηριότητες. Τα βιολογικά δίκτυα βοηθούν στην εύρεση και την ιεράρχηση υποψήφιων γονιδίων που είναι υπεύθυνα για διάφορες ασθένειες, διευκολύνουν την αναγνώριση στόχων και εμπλέκονται στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων εντοπίζοντας σηματοδοτήσεις και επιμέρους δίκτυα που σχετίζονται με ασθένειες³⁶³.

Επομένως, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του hsa-miR-140-3p στην ΟΑ χρησιμοποιήθηκαν εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης, τα οποία ανέδειξαν τα σχετιζόμενα με την ΟΑ γονίδια στόχους του hsa-miR-140-3p. Οι σημαντικότερες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του PPI δικτύου που δημιουργήθηκε μεταξύ των γονιδίων στόχων αποκαλύφθηκαν με την ανάλυση της τοπολογίας του δικτύου (εργαλεία MCODE και CytoHubba) και με την ανάλυση μονοπατιών-γονιδιακών οντολογιών (εργαλείο Cluego). Συνεκτιμώντας τις παραπάνω αναλύσεις βιοπληροφορικής, το *PTEN* αποτελεί ένα γονίδιο που εμφάνισε έναν από τους υψηλότερους βαθμούς συνδεσιμότητας στο PPI δίκτυο αλλά και συμμετοχή σε πολλαπλά μονοπάτια/διαδικασίες σημαντικές για την ΟΑ. Ως εκ τούτου, λαμβάνοντας υπόψιν τα *in silico* δεδομένα, μελετήθηκε στην συνέχεια ο ρόλος του hsa-miR-140-3p στη ρύθμιση του γονιδίου *PTEN* σε ΟΑ χονδροκύτταρα. Η πρωτεΐνη *PTEN*, είναι μια φωσφατάση, που λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης της 3, 4, 5-τριφωσφορική φωσφατιδυλνισοιτόλης (PIP3), και στη συνέχεια καταστέλλει την ενεργοποίηση της κινάσης AKT²³³. Σε μια μελέτη βρέθηκε ότι το *PTEN* εμφανίζει αυξημένη

έκφραση στους OA ιστούς και σχετίζεται με την έναρξη και την ανάπτυξη της OA, ρυθμίζοντας την απόκριση των χονδροκυττάρων και την ομοιόσταση της ECM²⁵⁰.

Επιπλέον, μελετήθηκε ο ρόλος του hsa-miR-140-3p στη ρύθμιση των πιθανών γονιδίων στόχων *TGFα*, *BCL-2*, *SIRT-1*, *HMGCR* και *HDAC4*, τα οποία ενέχονται στη παθογένεια της OA. Συγκεκριμένα, ο TGFα (transforming growth factor alpha) αποτελεί έναν αυξητικό παράγοντα που παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στην OA. Μεταγενέστερα πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι η θεραπεία των πρωτογενών χονδροκυττάρων αρουραίου με ανασυνδυασμένο TGFα είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων. Παρατηρήθηκε μείωση στους αναβολικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του κολλαγόνου τύπου II και της αγγρεκάνης και αυξήσεις στους καταβολικούς παράγοντες όπως η μεταλλοπρωτεϊνάση MMP13³⁶⁴. Ενώ μια άλλη μελέτη, έδειξε ότι η απώλεια του TGFα ήταν προστατευτική κατά της μετατραυματικής OA σε νεαρά ποντίκια²⁵⁵. Το γονίδιο της αναγωγάσης του μεβαλονικού οξέος (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase, HMGCR) παράγει ένα ένζυμο που καταλύει το κυριότερο στάδιο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης χοληστερόλης²⁹⁰ και αποτελεί στόχο των στατινών προκειμένου να μειωθούν τα επίπεδα της χοληστερόλης^{365,366}. Η έκφραση του HMGCR, παρατηρήθηκε ότι ήταν αυξημένη σε OA χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Ενώ σε μια προηγούμενη μελέτη, η ερευνητική μας ομάδα έδειξε ότι αυξάνοντας τα επίπεδα των ITGAV και TGF-β, ενεργοποιείται το μονοπάτι PI3K/ Akt οδηγώντας σε υπερέκφραση του SREBP-2 και του γονιδίου στόχου HMGCR που συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα MMP-13, στην OA²⁹¹. Η HDAC-4 είναι μια αποακετυλάση ιστονών που παίζει κρίσιμο ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση, το κυτταρικό κύκλο και την ανάπτυξη. Αποτελεί κύριο ρυθμιστή της ανάπτυξης του χόνδρου και της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, λειτουργώντας ως ισχυρός αναστολέας της υπερτροφίας και της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων³⁶⁷. Είναι ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν υψηλότερα στον OA χόνδρο σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό³⁶⁸. Επιπλέον, η αναστολή της HDAC4 μείωσε σημαντικά την επαγόμενη από την IL-1β/ IL-6 έκφραση των καταβολικών γονιδίων, ιδιαίτερα της MMP-13, σε OA χόνδρο και χονδροκύτταρα ανθρώπου³⁶⁹. Σε αρκετές μελέτες έχει αναδειχθεί ότι η απόπτωση των χονδροκυττάρων αποτελεί ένα κεντρικό χαρακτηριστικό της παθογένειας της OA³⁷⁰. Η Bcl-2, αποτελεί μια από τις κύριες αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Αύξηση των επιπέδων έκφρασης της Bcl-2 μπορούν να οδηγήσουν σε αναστολή της απόπτωσης³⁷¹. Έχει αναφερθεί ότι τα πρωτεϊνικά της επίπεδα διαφοροποιούνται στην OA σε σύγκριση με εκείνα του φυσιολογικού χόνδρου³⁷². Επιπροσθέτως, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η οικογένεια των αποπτωτικών

γονιδίων *BCL2* ενέχεται στη ρύθμιση της απόπτωσης των χονδροκυττάρων και της αποικοδόμησης του χόνδρου^{266,373}. Η Sirtuin 1 (SIRT1) είναι μια εξαρτώμενη από το NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) απακετυλάση ιστονών. Η SIRT1, έχει συσχετιστεί με πολλές ασθένειες της γήρανσης²⁷⁵ και θεωρείται ως κύριος ένα πολύ σημαντικός μεταβολικός ρυθμιστής²⁷⁶. Μαζί με το φυσικό ενεργοποιητή της, τη resveratrol, έχει βρεθεί να συμμετέχει στη παθογένεια της ΟΑ²⁷⁷. Η έκφραση της SIRT 1 σε ΟΑ χόνδρο μειώνεται με την εξέλιξη της νόσου^{278,279}. Μελέτες έχουν δείξει ότι η SIRT-1 μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (ECM)²⁷⁹⁻²⁸² του χόνδρου, να προωθήσει τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων σε χονδροκύτταρα, να έχει αντικαταβολικό, αντιφλεγμονώδη^{283,284}, αντιοξειδωτικό²⁸⁵ και αντι-αποπτωτικό ρόλο, να συμμετέχει στην διαδικασία της αυτοφαγίας²⁸⁶ και να ρυθμίζει την ομοιόσταση των οστών στην ΟΑ²⁸⁷.

Εφόσον οι θέσεις πρόσδεσης των miRNAs εντοπίζονται κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή (UTR) των mRNAs¹³⁰, πραγματοποιήθηκε μελέτη της 3' UTR του mRNA του *PTEN* για την εύρεση λειτουργικών θέσεων σύνδεσης του hsa-miR-140-3p, με τη χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής TargetScanHuman 8.0, η οποία ανέδειξε την ύπαρξη αλληλουχιών, οι οποίες αναγνωρίζονται από το miR-140-3p μέσω των οποίων ασκεί τη δράση του. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες για το miR-140-3p στη 3'UTR του *PTEN*, στη θέση 1763-1769 και θέση 2882-2888.

Τα περισσότερα προγράμματα βιοπληροφορικής όπως το TargetScan προβλέπουν τις θέσεις πρόσδεσης των miRNAs στα mRNA στόχους. Επομένως, σε επόμενο στάδιο της μελέτης των miRNAs είναι απαραίτητη η επιβεβαίωση των προβλέψεων των υπολογιστικών προγραμμάτων με πειραματικές μεθόδους σε κυτταρικό επίπεδο. Υπάρχουν διαφορετικές προσεγγίσεις για αυτό το σκοπό, όπως για παράδειγμα η μέθοδος της λουσιφεράσης ή αύξηση/ μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ενός miRNA και η μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου του. Το τελευταίο, πραγματοποιείται συνήθως με επιμόλυνση miR mimic ή/ και αναστολέα σε καλλιέργειες κυττάρων³⁷⁴. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποια μελέτη στην Οστεοαρθρίτιδα που να αποδεικνύει τη ρύθμιση του *PTEN* από το miR-140-3p. Σε μια μελέτη του 2020, η ανάλυση με εργαλεία βιοπληροφορικής προέβλεψε τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης του miR-140-3p στο *PTEN* με αυτές που βρέθηκαν στη παρούσα ανάλυση. Στην ίδια μελέτη, η αλληλεπίδραση του miR-140-3p με το *PTEN*, μέσω της πρόσδεσης του miR-140-3p στη θέση 1763-1769 του *PTEN* επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο της λουσιφεράσης σε κυτταρικές σειρές HEK 293T³⁷⁵. Η αλληλεπίδραση του hsa-miR-140-3p με το *PTEN* με τη

τεχνική της λουσιφεράσης δείχθηκε και από δύο άλλες μελέτες σε HSC-T6³⁷⁶ και HEK293 κύτταρα³⁷⁷, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, προκειμένου να διαλευκανθεί ο ρόλος του hsa-miR-140-3p στην ΟΑ πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των ΟΑ χονδροκυττάρων με το hsa-miR-140-3p mimic και στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση των προβλεπόμενων γονιδίων στόχων του.

Αρχικά, μετά τη διαμόλυνση των ΟΑ χονδροκυττάρων με το miR-140-3p miR mimic με τη βοήθεια της λιποφεκταμίνης, διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου *PTEN*, με τη μέθοδο της real-time PCR. Χορήγηση miR-140-3p mimic για 72 ώρες (100 nm) σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων έδειξε σημαντική μείωση των επιπέδων της mRNA έκφρασης του *PTEN* σε σχέση με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε hsa-miR-140-3p. Σύμφωνα με άλλες μελέτες, δείχθηκε ότι το hsa-miR-140-3p καταστέλλει την έκφραση του *PTEN*, σε κυτταρικές σειρές καρδιακών μυοκυττάρων (H9c2)³⁷⁷ και αστεροειδών ηπατοκυττάρων (HSC-T6)³⁷⁶. Δεδομένου ότι το PTEN/PI3K/AKT/mTOR αποτελεί ένα πολύ σημαντικό μονοπάτι που ενέχεται στη ρύθμιση της επιβίωσης και του μεταβολισμού των κυττάρων, οι περισσότερες μελέτες διερευνούν τη συσχέτιση της αύξησης της έκφρασης του hsa-miR-140-3p με το συγκεκριμένο μονοπάτι. Σε καρδιομυοκύτταρα, τα δεδομένα έδειξαν ότι το hsa-miR-140-3p αυξάνει τη φωσφορυλίωση του PI3K/AKT μονοπατιού, μέσω της ρύθμισης του PTEN, υποδεικνύοντας ένα προστατευτικό μηχανισμό μέσω του hsa-miR-140-3p για τη μείωση των κυτταρικών βλαβών³⁷⁷. Σε μια άλλη μελέτη, μείωση των επιπέδων του hsa-miR-140-3p οδήγησε σε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αύξηση της απόπτωσης και της ίνωσης μέσω της ρύθμισης του PTEN, αναστέλλοντας τη σηματοδότηση του μονοπατιού AKT/mTOR σε κύτταρα HSCs³⁷⁶. Στη μελέτη των Yin et al έδειξαν ότι ο αναστολέας του hsa-miR-140-3p επέφερε μείωση του πολλαπλασιασμού και προώθησε την απόπτωση των CD14+PBMCs. Εν αντιθέσει με τα C2C12 κύτταρα, όπου ο αναστολέας επέφερε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, και ανέστειλε την κυτταρική απόπτωση των κυττάρων C2C12, μέσω του μονοπατιού PTEN/PI3K/AKT³⁷⁵.

Τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα μας που έδειξαν αυξημένη μεταγραφική έκφραση του *PTEN* και τη μειωμένη έκφραση του hsa-miR-140-3p στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά, δείχνουν μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ αυτών των δύο μορίων, αναδεικνύοντας το ρόλο του miR-140-3p στη ρύθμιση της έκφρασης του *PTEN* και έναν πιθανό μοριακό μηχανισμό ο οποίος συμβάλλει στη διαφοροποιημένη έκφραση του *PTEN* στον ΟΑ χόνδρο, καθώς η σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ τους είναι αντιστρόφως ανάλογη.

Επιπλέον, για τη μελέτη του ρόλου ενός miRNA, είναι σημαντική η μελέτη πολλαπλών γονιδίων ώστε να κατανοηθεί η επίδραση του σε πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες και μονοπάτια. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μια βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών της ασθένειας και στην χρήση τους ως πιθανούς διαγνωστικά μόρια ή θεραπευτικούς στόχους. Για το σκοπό αυτό, μετά από χορήγηση του hsa-miR-140-3p mimic σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *TGFα*, *BCL-2*, *SIRT-1*, *HMGCR* και *HDAC4*, όπου παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων της mRNA έκφρασης των *HMGCR*, *HDAC4* και αύξηση της mRNA έκφρασης του γονιδίου *BCL-2*, σε σχέση με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε hsa-miR-140-3p. Έως σήμερα, δεν υπάρχει κάποια μελέτη στην Οστεοαρθρίτιδα που να αναφέρει τη ρύθμιση των παραπάνω γονιδίων από το hsa-miR-140-3p. Εν τούτοις, σε ένα κυτταρικό μοντέλο που αντιπροσωπεύει τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού (TNBC, triple-negative breast cancer) δείχθηκε ότι το isomiR-140-3p προσδένεται άμεσα στο mRNA του γονιδίου *HMGCR* και ρυθμίζει την έκφρασή του και κατ' επέκταση το μονοπάτι του μεβαλονικού (MVA)³⁷⁸. Το *HDAC4* έχειδειχθεί ότι αποτελεί γονίδιο στόχο του hsa-miR-140-5p σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος³⁷⁹, αλλά όχι του hsa-miR-140-3p. Ωστόσο τα αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες είναι αρκετά αντικρουόμενα. Σε ένα μοντέλο αγγειακής βλάβης, σε λεία μυικά κύτταρα των αρτηριών (ASMC) που απομονώθηκαν από το τοίχωμα της αρτηρίας επαναστένωσης δείχθηκε ότι η αύξηση των επιπέδων hsa-miR-140-3p είχε επίπτωση στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση των ASMC κυττάρων, μέσω των γονιδίων στόχων του *C-Myb* and *BCL-2*. Η επιβεβαίωση ότι το miR-140-3p προσδένεται στην 3' UTR του mRNA των *c-Myb* και *BCL-2* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της λουσιφεράσης³⁸⁰. Σε μια άλλη μελέτη σε καρδιομυοκύτταρα, δείχθηκε ότι διαμόλυνση με το miR-140-3p επέφερε αύξηση του *BCL-2* και μείωση της απόπτωσης³⁷⁷. Στη παρούσα διατριβή, το miR-140-3p φαίνεται να αυξάνει τη έκφραση του *BCL-2* σε OA χονδροκύτταρα, το οποίο μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ρύθμιση του miR-140-3p είναι περισσότερη πολύπλοκη και πιθανόν ενδιάμεσα γονίδια στόχοι ενέχονται σε αυτό το μονοπάτι, τα οποία χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Συνεχίζοντας, διερευνήθηκε η επίδραση του hsa-miR-140-3p στα μεταγραφικά επίπεδα μοριακών δεικτών της ομοιοστασίας του χόνδρου και συγκεκριμένα της μεταλλοπρωτεϊνάσης *MMP-13*, του *TNFA* και του *COL2A1* σε OA χονδροκύτταρα. Η *MMP-13*, είναι μια μεταλλοπρωτεϊνάση που συμβάλλει στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου μέσω της αποικοδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας. Τα επίπεδα της *MMP-13* έχουν βρεθεί

αυξημένα σε OA αρθρικό χόνδρο ενώ σχεδόν δεν ανιχνεύονται σε φυσιολογικό χόνδρο^{381,382}. Ο TNFα είναι μια προφλεγμονώδη κυτοκίνη, που δρα επίσης ως καταβολικός παράγοντας για τον αρθρικό χόνδρο. Συγκεκριμένα, ο TNF προωθεί την απελευθέρωση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) οδηγώντας σε αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου^{383–385}. Το COL2A1 αποτελεί κύριο συστατικό της μήτρας του χόνδρου και η αποικοδόμηση του θεωρείται μια κύρια παθολογική διαδικασία που οδηγεί στην ανάπτυξη της OA^{386,387}. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη προτείνεται ότι η μείωση του COL2A1 προάγει την εξέλιξη της OA, επιταχύνοντας την υπερτροφία των χονδροκυττάρων³⁸⁸. Μετά την επίδραση του miR-140-3p σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων, παρατηρήθηκε ότι τα mRNA επίπεδα της *MMP-13* μειώθηκαν, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του *COL2A1* και του *TNFA*. Αυτό το εύρημα είναι ιδιαίτερα σημαντικό διότι όπως προαναφέρθηκε τα μη φυσιολογικά επίπεδα της *MMP-13* έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση της OA και η εύρεση αναστολέων της *MMP-13* αποτελεί μια ελκυστική θεραπευτική στρατηγική για την αντιμετώπιση της νόσου³⁸⁹. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες όπου μελετήθηκε η επιγενετική ρύθμιση της *MMP-13* στην OA δείχθηκε ότι το miR-140 ενέχεται στη ρύθμιση της έκφρασής της^{221,335,390}. Ενώ υπάρχει και μια μελέτη που δείχνει ότι η προσθήκη του hsa-miR-140-3p σε χονδροκύτταρα επαγόμενα από IL-1β ανέστρεψε τα αυξημένα επίπεδα της *MMP-13*³⁹¹. Συνεπώς αναδεικνύεται ότι το miR-140-3p, έχει προστατευτικό ρόλο για την OA και θα μπορούσε να συμβάλλει στην αναστροφή του φαινοτύπου της OA. Ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω μελέτες ώστε να βρεθεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου το hsa-miR-140-3p μειώνει τα επίπεδα του καταβολικού *MMP-13* και αυξάνει τα επίπεδα του αντι-αποπτωτικού *BCL-2*. Επιπλέον, χρειάζονται *in vivo* μελέτες για την επιβεβαίωση του ρόλου του miR-140-3p έναντι της OA. Έχει αναπτυχθεί μια σειρά μεθόδων για την *in vivo* εφαρμογή των miRNAs. Οι μέθοδοι αυτοί περιλαμβάνουν τόσο ιικούς φορείς όσο και χημικές μεθόδους μεταφοράς των miRNAs με τη χρήση λιπιδίων, πολυμερών, ανόργανων και εξωκυτταρικών κυστιδίων³⁹². Ωστόσο, απαιτείται η βελτιστοποίηση των *in vivo* μεθόδων μεταφοράς των microRNAs στους ιστούς των αρθρώσεων ώστε να γίνει εφαρμόσιμη ως θεραπευτική μέθοδος σε κλινικό επίπεδο για την αντιμετώπιση της OA. Μέχρι σήμερα, σύμφωνα με το ClinicalTrials.gov (<http://clinicaltrials.gov>), υπάρχουν επτά κλινικές δοκιμές (NCT04783792, NCT04971629, NCT03866330, NCT03869229, NCT02555514, NCT02905864 και NCT02931344) που χρησιμοποιούν miRNAs ως βιοδείκτες στην οστεοαρθρίτιδα γόνατος ενώ δεν υπάρχουν κλινικές δοκιμές για τη χρήση των miRNAs ως θεραπευτικοί παράγοντες. Είναι επομένως προφανές ότι, παρόλο που υπάρχουν αρκετές μελέτες για τα miRNAs, υπάρχουν πολλά

εμπόδια που πρέπει να ξεπεραστούν πριν από την εφαρμογή αυτής της γνώσης στη κλινική πρακτική.

Συνοψίζοντας, η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της επιγενετικής ρύθμισης της Οστεοαρθρίτιδας και συγκεκριμένα στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων μέσω των miRNAs. Καθώς υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για την συμμετοχή των miRNAs στην παθογένεια της ΟΑ μέσω της ρύθμισης σημαντικών διαδικασιών όπως ομοιόσταση του χόνδρου, ενδοχόνδρια οστεοποίηση, μεταβολισμός των οστών, φλεγμονή, αυτοφαγία, απόπτωση και μεταβολισμός των λιπιδίων.

Ειδικότερα, αναδείχθηκε μια υπογραφή από miRNAs ορού, για πρώτη φορά, χρησιμοποιώντας miRNA microarrays υψηλής ανάλυσης σε ασθενείς με ΟΑ συγκριτικά με φυσιολογικά άτομα και η διαφοροποίηση της έκφρασης τους επαληθεύτηκε σε δείγματα αρθρικού χόνδρου. Η υπογραφή των τριών miRNAs, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-671-3p και hsa-miR-33b-3p, που εντοπίστηκε στον ορό, σύμφωνα με την *in silico* ανάλυση βρέθηκε ότι ρυθμίζει μεταβολικές διεργασίες, και θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως πιθανός βιοδείκτης για την αξιολόγηση του κινδύνου και της εξέλιξης της ΟΑ. Το hsa-miR-140-3p έχει βρεθεί ότι αποτελεί το miRNA με τα πιο υψηλά επίπεδα έκφρασης σε υγιή χόνδρο και η έκφραση του αυξάνεται κατά την χονδρογένεση. Προκειμένου να διερευνηθεί ο βιολογικός ρόλος του hsa-miR-140-3p στην ΟΑ, πραγματοποιήθηκε *in silico* μελέτη για να βρεθούν τα γονίδια στόχοι και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζει, όπου αναδείχθηκε η συμμετοχή του στη ρύθμιση μονοπατιών γήρανσης και μεταβολισμού, ανάμεσα τους ξεχώρισε το γονίδιο *PTEN* λόγω του κεντρικού του ρόλου στη ρύθμιση πολλών άλλων μορίων και στη διαδικασία της γήρανσης. Επίσης, το miR-140-3p επέφερε αναστολή της έκφρασης των *PTEN*, *HMGCR* και *HDAC4*. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης του καταβολικού ενζύμου *MMP-13* και αύξηση της έκφρασης του αντι-αποπτωτικού *BCL-2*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ότι μια πρόσφατη μελέτη, ανέδειξε το πιθανό ρόλο του miR-140 στην επιβράδυνση της κυτταρικής γήρανσης και την πιθανή συμβολή του στη καθυστέρηση της εξέλιξης της πρώιμης φάσης της ΟΑ³⁹³. Τα παραπάνω ευρήματα σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα άλλων μελετών, δείχνουν ότι το hsa-miR-140-3p ρυθμίζει την έκφραση πολλαπλών στόχων σημαντικών για την ανάπτυξη και εξέλιξη της ΟΑ. Επομένως, αναδεικνύεται η πιθανή χρήση του hsa-miR-140-3p εκτός από βιοδείκτη και ως θεραπευτικού στόχου για την οστεοαρθρίτιδα. Η χρήση αναστολέων ή μιμητικών μορίων των miRNAs έχει αποδειχθεί ότι έχει θεραπευτικά οφέλη σε προκλινικά μοντέλα, υποδεικνύοντας ότι αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη θεραπεία της ΟΑ στους ανθρώπους.

Συνεπώς, αφενός αναδείχθηκε μια μοριακή υπογραφή τριών miRNAs (hsa-miR-140-3p, hsa-miR-671-3p και hsa-miR-33b-3p) στον ορό ασθενών με ΟΑ, ως πιθανοί βιοδείκτες για την αξιολόγηση του κινδύνου και της εξέλιξης της ΟΑ, αφετέρου αναδείχθηκε το hsa-miR-140-3p ως πιθανός θεραπευτικός στόχος για την αναστολή της εξέλιξης της ΟΑ σε πρώιμα στάδια. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη κατανόηση του ρόλου του hsa-miR-140-3p στην αιτιοπαθογένεια της οστεοαρθρίτιδας.

Βιβλιογραφία

1. Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis and Rheumatism* vol. 64 1697–1707 (2012).
2. Goldring, M. B. & Goldring, S. R. Osteoarthritis. *Journal of Cellular Physiology* vol. 213 626–634 (2007).
3. Bannuru, R. R. *et al.* Comparative effectiveness of pharmacologic interventions for knee osteoarthritis: A systematic review and network meta-analysis. *Annals of Internal Medicine* vol. 162 46–54 (2015).
4. Cross, M. *et al.* The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 1323–1330 (2014).
5. Johnson, V. L. & Hunter, D. J. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology* vol. 28 5–15 (2014).
6. Allen, K. D. & Golightly, Y. M. State of the evidence. *Current Opinion in Rheumatology* vol. 27 276–283 (2015).
7. Neogi, T. & Zhang, Y. Epidemiology of osteoarthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 39, 1–19 (2013).
8. Long, H. *et al.* Prevalence Trends of Site-Specific Osteoarthritis From 1990 to 2019: Findings From the Global Burden of Disease Study 2019. *Arthritis Rheumatol.* 74, 1172–1183 (2022).
9. Andrianakos, A. *et al.* Prevalence of rheumatic diseases in Greece: A cross-sectional population based epidemiological study. The ESORDIG Study. *J. Rheumatol.* 30, 1589–1601 (2003).
10. Lawrence, R. C. *et al.* Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 58, 26–35 (2008).
11. Conditions, N. C. C. for C. Osteoarthritis: national clinical guideline for care and management in adults. (2008).
12. Felson, D. T. *et al.* The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. the framingham osteoarthritis study. *Arthritis Rheum.* 30, 914–918 (1987).
13. Jordan, J. M. *et al.* Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol* 34, 172–180 (2007).
14. Alexandros A Andrianakos 1, L. K. K. D. G. K. S. I. A. A. I. G. G. O. K. K. V. P. E. V. V. P. C. D. E. S. G. Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study - PubMed. *J Rheumatol* 33(12):2507–13 (2006).
15. Health topics: risk factors. World Health Organization; website http://www.who.int/topics/risk_factors/en/. Accessed November 29, 2017.
16. Vina, E. R. & Kwoh, C. K. Epidemiology of osteoarthritis: Literature update. *Current Opinion in Rheumatology* vol. 30 160–167 (2018).

17. Johnson, V. L. & Hunter, D. J. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology* vol. 28 5–15 (2014).
18. Jin, X. *et al.* Associations between endogenous sex hormones and MRI structural changes in patients with symptomatic knee osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 25, 1100–1106 (2017).
19. Zhang, Y. & Jordan, J. M. Epidemiology of osteoarthritis. *Clinics in Geriatric Medicine* vol. 26 355–369 (2010).
20. Arden, N. & Nevitt, M. C. Osteoarthritis: Epidemiology. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology* vol. 20 3–25 (2006).
21. Goldring, M. B. & Goldring, S. R. Osteoarthritis. *Journal of Cellular Physiology* vol. 213 626–634 (2007).
22. Scanzello, C. R. & Goldring, S. R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* vol. 51 249–257 (2012).
23. Goldring, S. R. & Goldring, M. B. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: Structure, function and cartilage bone crosstalk. *Nature Reviews Rheumatology* vol. 12 632–644 (2016).
24. Di Francesco, M. *et al.* Management of osteoarthritis: From drug molecules to nano/micromedicines. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* 14, e1780 (2022).
25. Heinegård, D. & Saxne, T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* vol. 7 50–56 (2011).
26. Houard, X., Goldring, M. B. & Berenbaum, F. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 15, 375 (2013).
27. Quinn, T. M., Häuselmann, H. J., Shintani, N. & Hunziker, E. B. Cell and matrix morphology in articular cartilage from adult human knee and ankle joints suggests depth-associated adaptations to biomechanical and anatomical roles. *Osteoarthr. Cartil.* 21, 1904–1912 (2013).
28. Andriacchi, T. P. & Favre, J. The Nature of In Vivo Mechanical Signals That Influence Cartilage Health and Progression to Knee Osteoarthritis. *Current Rheumatology Reports* vol. 16 1–8 (2014).
29. Guo, H., Maher, S. A. & Torzilli, P. A. A biphasic finite element study on the role of the articular cartilage superficial zone in confined compression. *J. Biomech.* 48, 166–170 (2015).
30. Wilusz, R. E., Sanchez-Adams, J. & Guilak, F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biology* vol. 39 25–32 (2014).
31. Loeser, R. F. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis and Cartilage* vol. 17 971–979 (2009).
32. Xu, L., Golshirazian, I., Asbury, B. J. & Li, Y. Induction of high temperature requirement A1, a serine protease, by TGF-beta1 in articular chondrocytes of mouse models of OA. *Histol. Histopathol.* 29, 609–618 (2014).

33. Maes, C. *et al.* VEGF-independent cell-autonomous functions of HIF-1 α regulating oxygen consumption in fetal cartilage are critical for chondrocyte survival. *J. Bone Miner. Res.* 27, 596–609 (2012).
34. Loeser, R. F. Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biology* vol. 39 11–16 (2014).
35. Ruhlen, R. & Marberry, K. The chondrocyte primary cilium. *Osteoarthritis and Cartilage* vol. 22 1071–1076 (2014).
36. Burr, D. B. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: Role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 12, 20–30 (2004).
37. Burr, D. B. & Schaffler, M. B. The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthritis: Quantitative microscopic evidence. *Microsc. Res. Tech.* 37, 343–357 (1997).
38. Imhof, H. *et al.* Subchondral bone and cartilage disease: A rediscovered functional unit. *Investigative Radiology* vol. 35 581–588 (2000).
39. Reginster, J. Y. The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology* 41, 3–6 (2002).
40. Suri, S. & Walsh, D. A. Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone* 51, 204–211 (2012).
41. Lohmander, L. S., Saxne, T. & Heinegard, D. K. Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 53, 8–13 (1994).
42. Fosang, A. J. & Beier, F. Emerging Frontiers in cartilage and chondrocyte biology. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology* vol. 25 751–766 (2011).
43. Wang, M. *et al.* MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 15, R5 (2013).
44. Mehana, E. S. E., Khafaga, A. F. & El-Blehi, S. S. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review. *Life Sciences* vol. 234 116786 (2019).
45. B. Marcu, K., Otero, M., Olivotto, E., Maria Borzi, R. & B. Goldring, M. NF- κ B Signaling: Multiple Angles to Target OA. *Curr. Drug Targets* 11, 599–613 (2010).
46. Goldring, M. B. *et al.* Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: Signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur. Cells Mater.* 21, 202–220 (2011).
47. Cuervo, A. M. & Wong, E. Chaperone-mediated autophagy: Roles in disease and aging. *Cell Research* vol. 24 92–104 (2014).
48. Liu-Bryan, R. & Terkeltaub, R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* vol. 11 35–44 (2015).
49. Akhtar, N. & Haqqi, T. M. MicroRNA-199a* regulates the expression of cyclooxygenase-2 in human chondrocytes. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 1073–80 (2012).
50. Sandell, L. J. Etiology of osteoarthritis: Genetics and synovial joint development. *Nature Reviews Rheumatology* vol. 8 77–89 (2012).

51. Walsh, D. A. *et al.* Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology* 49, 1852–1861 (2010).
52. Heinegård, D. & Saxne, T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 50–56 (2011).
53. Eyre, D. R. Collagens and cartilage matrix homeostasis. in *Clinical Orthopaedics and Related Research* vol. 427 S118–S122 (Lippincott Williams and Wilkins, 2004).
54. Yao, Q. *et al.* Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduct. Target. Ther.* 8, (2023).
55. Goldring, S. R. Role of Bone in Osteoarthritis Pathogenesis. *Medical Clinics of North America* vol. 93 25–35 (2009).
56. Goldring, M. B. & Goldring, S. R. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. in *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 1192 230–237 (Blackwell Publishing Inc., 2010).
57. Raynauld, J. P. *et al.* Correlation between bone lesion changes and cartilage volume loss in patients with osteoarthritis of the knee as assessed by quantitative magnetic resonance imaging over a 24-month period. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 683–688 (2008).
58. Burr, D. B. & Gallant, M. A. Bone remodelling in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* vol. 8 665–673 (2012).
59. Hu, Y., Chen, X., Wang, S., Jing, Y. & Su, J. Subchondral bone microenvironment in osteoarthritis and pain. *Bone Res.* 2021 91 9, 1–13 (2021).
60. Hügler, T. & Geurts, J. What drives osteoarthritis?—synovial versus subchondral bone pathology. *Rheumatology (Oxford)*. 56, 1461–1471 (2017).
61. Ding, R., Zhang, N., Wang, Q. & Wang, W. Alterations of the Subchondral Bone in Osteoarthritis: Complying with Wolff's Law. *Curr. Rheumatol. Rev.* 18, 178–185 (2022).
62. Maruotti, N., Corrado, A. & Cantatore, F. P. Osteoblast role in osteoarthritis pathogenesis. *J. Cell. Physiol.* 232, 2957–2963 (2017).
63. Han, X. *et al.* Abnormal subchondral trabecular bone remodeling in knee osteoarthritis under the influence of knee alignment. *Osteoarthr. Cartil.* 30, 100–109 (2022).
64. Ko, F. C. *et al.* In vivo cyclic compression causes cartilage degeneration and subchondral bone changes in mouse tibiae. *Arthritis Rheum.* 65, 1569–1578 (2013).
65. Brown, T. D., Radin, E. L., Martin, R. B. & Burr, D. B. Finite element studies of some juxtaarticular stress changes due to localized subchondral stiffening. *J. Biomech.* 17, 11–24 (1984).
66. Poulet, B., Hamilton, R. W., Shefelbine, S. & Pitsillides, A. A. Characterizing a novel and adjustable noninvasive murine joint loading model. *Arthritis Rheum.* 63, 137–147 (2011).
67. Radin, E. L. & Rose, R. M. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 34–40 (1986).
68. Agricola, R. *et al.* A cam deformity is gradually acquired during skeletal maturation in adolescent and young male soccer players: A prospective study with minimum 2-year

- follow-up. *Am. J. Sports Med.* 42, 798–806 (2014).
69. Day, J. S. *et al.* A decreased subchondral trabecular bone tissue elastic modulus is associated with pre-arthritic cartilage damage. *J. Orthop. Res.* 19, 914–918 (2001).
 70. Crema, M. D. *et al.* Subchondral cystlike lesions develop longitudinally in areas of bone marrow edema-like lesions in patients with or at risk for knee osteoarthritis: Detection with MR imaging - The MOST study. *Radiology* 256, 855–862 (2010).
 71. van der Kraan, P. M. & van den Berg, W. B. Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis and Cartilage* vol. 15 237–244 (2007).
 72. Mathiessen, A. & Conaghan, P. G. Synovitis in osteoarthritis: Current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res. Ther.* 19, 1–9 (2017).
 73. Scanzello, C. R. & Goldring, S. R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* vol. 51 249–257 (2012).
 74. Goldring, M. B. & Otero, M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 23, 471–8 (2011).
 75. Pelletier, J. P., Martel-Pelletier, J. & Abramson, S. B. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* 44, 1237–1247 (2001).
 76. Maglaviceanu, A., Wu, B. & Kapoor, M. Fibroblast-like synoviocytes: Role in synovial fibrosis associated with osteoarthritis. *Wound Repair Regen.* 29, 642–649 (2021).
 77. Thomson, A. & Hilkens, C. M. U. Synovial Macrophages in Osteoarthritis: The Key to Understanding Pathogenesis? *Front. Immunol.* 12, 1831 (2021).
 78. Bonnet, C. S. & Walsh, D. A. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* 44, 7–16 (2005).
 79. Benito, M. J., Veale, D. J., FitzGerald, O., Van Den Berg, W. B. & Bresnihan, B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 1263–1267 (2005).
 80. Houard, X., Goldring, M. B. & Berenbaum, F. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 15, (2013).
 81. Hui, W. *et al.* Oxidative changes and signalling pathways are pivotal in initiating age-related changes in articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* 75, 449–458 (2016).
 82. Loeser, R. F., Collins, J. A. & Diekmann, B. O. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 412–420 (2016).
 83. Blanco, F. J., Rego, I. & Ruiz-Romero, C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 161–169 (2011).
 84. Scott, J. L. *et al.* Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1502–1510 (2010).
 85. Greene, M. A. & Loeser, R. F. Function of the chondrocyte PI-3 kinase-Akt signaling pathway is stimulus dependent. *Osteoarthr. Cartil.* 23, 949–956 (2015).
 86. Raud, B. *et al.* Level of obesity is directly associated with the clinical and functional consequences of knee osteoarthritis. *Sci. Rep.* 10, (2020).

87. Chou, C. H. *et al.* Synovial cell cross-talk with cartilage plays a major role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Sci. Rep.* 10, (2020).
88. Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 911–919 (2005).
89. Wang, X., Hunter, D., Xu, J. & Ding, C. Metabolic triggered inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* vol. 23 22–30 (2015).
90. Zapata-Linares, N., Eymard, F., Berenbaum, F. & Houard, X. Role of adipose tissues in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 33, 84–93 (2021).
91. Belluzzi, E. *et al.* Systemic and Local Adipose Tissue in Knee Osteoarthritis. *J. Cell. Physiol.* 232, 1971–1978 (2017).
92. Xie, C. & Chen, Q. Adipokines: New Therapeutic Target for Osteoarthritis? *Curr. Rheumatol. Rep.* 21, 71 (2019).
93. Stannus, O. P. *et al.* Cross-sectional and longitudinal associations between circulating leptin and knee cartilage thickness in older adults. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 82–88 (2015).
94. Martel-Pelletier, J., Raynaud, J. P., Dorais, M., Abram, F. & Pelletier, J. P. The levels of the adipokines adipon and leptin are associated with knee osteoarthritis progression as assessed by MRI and incidence of total knee replacement in symptomatic osteoarthritis patients: A post hoc analysis. *Rheumatol. (United Kingdom)* 55, 680–688 (2016).
95. Raynaud, J. P. *et al.* Magnetic Resonance Imaging-Assessed Vastus Medialis Muscle Fat Content and Risk for Knee Osteoarthritis Progression: Relevance from a Clinical Trial. *Arthritis Care Res.* 67, 1406–1415 (2015).
96. Wang, Y. *et al.* Increase in vastus medialis cross-sectional area is associated with reduced pain, cartilage loss, and joint replacement risk in knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 64, 3917–3925 (2012).
97. Collins, K. H. *et al.* Adipose tissue is a critical regulator of osteoarthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, (2020).
98. Frazier, T. *et al.* Non-homologous use of adipose-derived cell and tissue therapies: Osteoarthritis as a case study. *Bone reports* 17, (2022).
99. MacGregor, A. J., Antoniadou, L., Matson, M., Andrew, T. & Spector, T. D. The genetic contribution to radiographic hip osteoarthritis in women: Results of a classic twin study. *Arthritis Rheum.* 43, 2410–2416 (2000).
100. Manek, N. J., Hart, D., Spector, T. D. & MacGregor, A. J. The association of body mass index and osteoarthritis of the knee joint: An examination of genetic and environmental influences. *Arthritis Rheum.* 48, 1024–1029 (2003).
101. Magnusson, K., Turkiewicz, A. & Englund, M. Nature vs nurture in knee osteoarthritis – the importance of age, sex and body mass index. *Osteoarthr. Cartil.* 27, 586–592 (2019).
102. Panoutsopoulou, K. & Zeggini, E. Advances in osteoarthritis genetics. *Journal of Medical Genetics* vol. 50 715–724 (2013).
103. Zeggini, E. *et al.* Genome-wide analyses using UK Biobank data provide insights into

- the genetic architecture of osteoarthritis. *Nat. Genet.* 50, 549–558 (2018).
104. Tachmazidou, I. *et al.* Identification of new therapeutic targets for osteoarthritis through genome-wide analyses of UK Biobank data. *Nature Genetics* vol. 51 230–236 (2019).
 105. Styrkarsdottir, U. *et al.* Whole-genome sequencing identifies rare genotypes in COMP and CHADL associated with high risk of hip osteoarthritis. *Nat. Genet.* 49, 801–805 (2017).
 106. Styrkarsdottir, U. *et al.* Meta-analysis of Icelandic and UK data sets identifies missense variants in SMO, IL11, COL11A1 and 13 more new loci associated with osteoarthritis. *Nature Genetics* vol. 50 1681–1687 (2018).
 107. Zeggini, E. *et al.* Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): A genome-wide association study. *Lancet* 380, 815–823 (2012).
 108. Reynard, L. N. & Barter, M. J. Osteoarthritis year in review 2019: genetics, genomics and epigenetics. *Osteoarthritis and Cartilage* vol. 28 275–284 (2020).
 109. Miyamoto, Y. *et al.* A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat. Genet.* 39, 529–533 (2007).
 110. Moghimi, N., Nasser, S., Ghafouri, F. & Jalili, A. Frequency of Growth Differentiation Factor 5 rs143383 and asporin D-repeat polymorphisms in patients with hand and knee osteoarthritis in Kurdistan province, Iran. *Int. J. Rheum. Dis.* 24, 694–700 (2021).
 111. Jia, B., Jiang, Y., Xu, Y., Wang, Y. & Li, T. Correlation between growth differentiation factor 5 (rs143383) gene polymorphism and knee osteoarthritis: an updated systematic review and meta-analysis. *J. Orthop. Surg. Res.* 16, (2021).
 112. Li, Y. *et al.* A novel variant near LSP1P3 is associated with knee osteoarthritis in the Chinese population. *Clin. Rheumatol.* 39, 2393–2398 (2020).
 113. Syddall, C. M., Reynard, L. N., Young, D. A. & Loughlin, J. The Identification of Trans-acting Factors That Regulate the Expression of GDF5 via the Osteoarthritis Susceptibility SNP rs143383. *PLOS Genet.* 9, e1003557 (2013).
 114. Ratneswaran, A. & Kapoor, M. Osteoarthritis year in review: genetics, genomics, epigenetics. *Osteoarthr. Cartil.* 29, 151–160 (2021).
 115. Richard, D. *et al.* Evolutionary Selection and Constraint on Human Knee Chondrocyte Regulation Impacts Osteoarthritis Risk. *Cell* 181, 362–381.e28 (2020).
 116. Panoutsopoulou, K. *et al.* Insights into the genetic architecture of osteoarthritis from stage 1 of the arcOGEN study. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 864–867 (2011).
 117. Boer, C. G. *et al.* Genome-wide association of phenotypes based on clustering patterns of hand osteoarthritis identify WNT9A as novel osteoarthritis gene. *Ann. Rheum. Dis.* 80, 367–375 (2021).
 118. Boer, C. G. *et al.* Deciphering osteoarthritis genetics across 826,690 individuals from 9 populations. *Cell* 184, 4784–4818.e17 (2021).
 119. Klein, J. C. *et al.* Functional testing of thousands of osteoarthritis-associated variants for regulatory activity. *Nat. Commun.* 10, 1–9 (2019).

120. Attur, M. *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN) gene variants predict radiographic severity of knee osteoarthritis and risk of incident disease. *Ann. Rheum. Dis.* 79, (2019).
121. Zhao, L. *et al.* Exploration of CRISPR/Cas9-based gene editing as therapy for osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 78, 676–682 (2019).
122. Fu, L. *et al.* Up-regulation of FOXD1 by yap alleviates senescence and osteoarthritis. *PLoS Biol.* 17, (2019).
123. Grandi, F. C. & Bhutani, N. Epigenetic Therapies for Osteoarthritis. *Trends Pharmacol. Sci.* 41, 557–569 (2020).
124. Oo, W. M., Yu, S. P. C., Daniel, M. S. & Hunter, D. J. Disease-modifying drugs in osteoarthritis: current understanding and future therapeutics. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 23, 331–347 (2018).
125. Torkamani, A., Wineinger, N. E. & Topol, E. J. The personal and clinical utility of polygenic risk scores. *Nat. Rev. Genet.* 19, 581–590 (2018).
126. Kim, M., Rubab, A., Chan, W. C. & Chan, D. Osteoarthritis year in review: genetics, genomics and epigenetics. *Osteoarthr. Cartil.* 0, (2023).
127. Zhang, M. & Wang, J. Epigenetic regulation of gene expression in osteoarthritis. doi:10.1016/j.gendis.2014.12.005.
128. Khan, N. M. & Haqqi, T. M. Epigenetics in osteoarthritis: Potential of HDAC inhibitors as therapeutics. *Pharmacol. Res.* 128, 73–79 (2018).
129. Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics* vol. 12 99–110 (2011).
130. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–97 (2004).
131. Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105 (2008).
132. Lujambio, A. & Lowe, S. W. The microcosmos of cancer. *Nature* vol. 482 347–355 (2012).
133. M Ha, V. K. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 509–524 (2014).
134. RW Carthew, E. S. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642–655 (2009).
135. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136, 215–233 (2009).
136. Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics* vol. 11 597–610 (2010).
137. Han, J. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18, 3016–3027 (2004).
138. Diederichs, S. & Haber, D. A. Dual role for argonautes in microRNA processing and

- posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131, 1097–1108 (2007).
139. Lee, Y. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060 (2004).
 140. Lee, Y. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419 (2003).
 141. Gregory, R. I. *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235–240 (2004).
 142. AM Denli, B. T. R. P. R. K. G. H. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature* 432, 231–235 (2004).
 143. M Landthaler, A. Y. T. T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.* 14, 2162–2167 (2004).
 144. E Lund, S. G. A. C. J. D. U. K. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* (80-.). 303, 95–98 (2004).
 145. MT Bohnsack, K. C. D. G. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185–191 (2004).
 146. R Yi, Y. Q. I. M. B. C. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011–3016 (2003).
 147. Grishok, A. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106, 23–34 (2001).
 148. Ketting, R. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15, 2654–2659 (2001).
 149. MH Han, S. G. L. S. N. F. The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 1093–1098 (2004).
 150. F Vazquez, V. G. P. C. H. V. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr. Biol.* 14, 346–351 (2004).
 151. H Kobayashi, Y. T. RISC assembly: coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1859, 71–81 (2016).
 152. Zealy, R. W., Wrenn, S. P., Davila, S., Min, K.-W. & Yoon, J.-H. microRNA-binding proteins: specificity and function. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 8, e1414 (2017).
 153. YK Kim, B. K. V. K. Re-evaluation of the roles of DROSHA, export in 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 113, E1881–1889 (2016).
 154. Peng, X. *et al.* Comprehensive overview of microRNA function in rheumatoid arthritis. *Bone Res.* 2023 111 11, 1–24 (2023).
 155. Kilikevicius, A., Meister, G. & Corey, D. R. Reexamining assumptions about miRNA-guided gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 50, 617–634 (2022).
 156. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs

- using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42, (2014).
157. Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W. & Bartel, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 4, (2015).
 158. Akhtar, M. M., Micolucci, L., Islam, M. S., Olivieri, F. & Procopio, A. D. Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Research* vol. 44 24–44 (2016).
 159. Dweep, H. & Gretz, N. MiRWalk2.0: A comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nature Methods* vol. 12 697 (2015).
 160. Chou, C. H. *et al.* MiRTarBase update 2018: A resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 46, D296–D302 (2018).
 161. Karagkouni, D. *et al.* DIANA-TarBase v8: A decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Res.* 46, D239–D245 (2018).
 162. Backes, C. *et al.* MiRPathDB: A new dictionary on microRNAs and target pathways. *Nucleic Acids Res.* 45, D90–D96 (2017).
 163. Hsu, J. B. *et al.* MiRTar: An integrated system for identifying miRNA-target interactions in human. *BMC Bioinformatics* 12, 1–12 (2011).
 164. Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K. & Zhang, C. Y. Secreted microRNAs: A new form of intercellular communication. *Trends in Cell Biology* vol. 22 125–132 (2012).
 165. Turchinovich, A. & Burwinkel, B. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol.* 9, 1066–75 (2012).
 166. Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. & Remaley, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* 13, 423–33 (2011).
 167. Zhang, Y. *et al.* Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Mol. Cell* 39, 133–144 (2010).
 168. Mori, M. A., Ludwig, R. G., Garcia-Martin, R., Brandão, B. B. & Kahn, C. R. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metab.* 30, 656–673 (2019).
 169. Guay, C. & Regazzi, R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* vol. 9 513–521 (2013).
 170. Párrizas, M. & Novials, A. Circulating microRNAs as biomarkers for metabolic disease. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* vol. 30 591–601 (2016).
 171. Kumar, S., Vijayan, M., Bhatti, J. S. & Reddy, P. H. MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 146, 47–94 (2017).
 172. Borgonio Cuadra, V. M., González-Huerta, N. C., Romero-Córdoba, S., Hidalgo-Miranda, A. & Miranda-Duarte, A. Altered Expression of Circulating MicroRNA in Plasma of Patients with Primary Osteoarthritis and In Silico Analysis of Their Pathways. *PLoS One* 9, e97690 (2014).
 173. Okuhara, A. *et al.* Changes in microRNA expression in peripheral mononuclear cells according to the progression of osteoarthritis. *Mod. Rheumatol.* 22, 446–457 (2012).

174. Murata, K. *et al.* Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 12, R86 (2010).
175. Li, Y.-H. *et al.* Identification of synovial fluid microRNA signature in knee osteoarthritis: differentiating early- and late-stage knee osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 24, 1577–86 (2016).
176. Rousseau, J. C. *et al.* Association of circulating microRNAs with prevalent and incident knee osteoarthritis in women: The OFELY study. *Arthritis Res. Ther.* 22, 1–12 (2020).
177. Ali, S. A. *et al.* Sequencing identifies a distinct signature of circulating microRNAs in early radiographic knee osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 28, 1471–1481 (2020).
178. Lai, Z. & Cao, Y. Plasma miR-200c-3p, miR-100-5p, and miR-1826 serve as potential diagnostic biomarkers for knee osteoarthritis: Randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)*. 98, (2019).
179. Chen, C. & Chen, H. Clinical Diagnosis Value of miR-29b-3p in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Synovial Fluid Among Osteoarthritis Patients. *Clin. Lab.* 65, 1453–1458 (2019).
180. Wang, P. *et al.* Genome-wide microRNA screening reveals miR-582-5p as a mesenchymal stem cell-specific microRNA in subchondral bone of the human knee joint. *J. Cell. Physiol.* 234, 21877–21888 (2019).
181. Xie, W. *et al.* Synovial Fluid MicroRNA-210 as a Potential Biomarker for Early Prediction of Osteoarthritis. *Biomed Res. Int.* 2019, (2019).
182. Kwak, Y. H. *et al.* Significant changes in synovial fluid microRNAs after high tibial osteotomy in medial compartmental knee osteoarthritis: Identification of potential prognostic biomarkers. *PLoS One* 15, e0227596 (2020).
183. Moldovan, L. *et al.* Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 371–390 (2014).
184. Arnold, M., Ellwanger, D. C., Hartsperger, M. L., Pfeufer, A. & Stümpflen, V. Cis-Acting Polymorphisms Affect Complex Traits through Modifications of MicroRNA Regulation Pathways. *PLoS One* 7, e36694 (2012).
185. Liu, H. *et al.* MicroRNA expression in osteoarthritis: a meta-analysis. *Clin. Exp. Med.* 1–13 (2023) doi:10.1007/S10238-023-01063-8/METRICS.
186. Iliopoulos, D., Malizos, K. N., Oikonomou, P. & Tsezou, A. Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS One* 3, e3740 (2008).
187. An, S., Hu, H., Li, Y. & Hu, Y. Pyroptosis Plays a Role in Osteoarthritis. *Aging Dis.* 11, 1146 (2020).
188. Zhao, L. R. *et al.* NLRP1 and NLRP3 inflammasomes mediate LPS/ATP-induced pyroptosis in knee osteoarthritis. *Mol. Med. Rep.* 17, 5463–5469 (2018).
189. Lugli, G. *et al.* Plasma Exosomal miRNAs in Persons with and without Alzheimer Disease: Altered Expression and Prospects for Biomarkers. *PLoS One* 10, e0139233 (2015).
190. Ito, Y. *et al.* Both microRNA-455-5p and -3p repress hypoxia-inducible factor-2α

- expression and coordinately regulate cartilage homeostasis. *Nat. Commun.* 12, 4148 (2021).
191. Leung, A. K. L. & Sharp, P. A. MicroRNA Functions in Stress Responses. *Mol. Cell* 40, 205–215 (2010).
 192. McMahon, M., Samali, A. & Chevet, E. Regulation of the unfolded protein response by noncoding RNA. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 313, C243–C254 (2017).
 193. Wu, L. *et al.* MiR-128-3p mediates TNF- α -induced inflammatory responses by regulating Sirt1 expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 521, 98–105 (2020).
 194. Chen, S. & Li, B. MiR-128-3p Post-Transcriptionally Inhibits WISP1 to Suppress Apoptosis and Inflammation in Human Articular Chondrocytes via the PI3K/AKT/NF- κ B Signaling Pathway. *Cell Transplant.* 29, (2020).
 195. Li, B. *et al.* Identification of differentially expressed micrnas in knee anterior cruciate ligament tissues surgically removed from patients with osteoarthritis. *Int. J. Mol. Med.* 40, 1105–1113 (2017).
 196. Huang, W. *et al.* Knockdown of SGK1 alleviates the IL-1 β -induced chondrocyte anabolic and catabolic imbalance by activating FoxO1-mediated autophagy in human chondrocytes. *FEBS J.* 287, 94–107 (2020).
 197. Wang, Z. *et al.* HDAC2 interacts with microRNA-503-5p to regulate SGK1 in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 23, 1–11 (2021).
 198. Zhang, Y. *et al.* Dual functions of microRNA-17 in maintaining cartilage homeostasis and protection against osteoarthritis. *Nat. Commun.* 13, (2022).
 199. Al-Modawi, R. N., Brinchmann, J. E. & Karlsen, T. A. Multi-pathway Protective Effects of MicroRNAs on Human Chondrocytes in an In Vitro Model of Osteoarthritis. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 17, 776–790 (2019).
 200. Zhong, G. *et al.* miRNA-335-5p relieves chondrocyte inflammation by activating autophagy in osteoarthritis. *Life Sci.* 226, 164–172 (2019).
 201. Tian, F., Wang, J., Zhang, Z. & Yang, J. LncRNA SNHG7/miR-34a-5p/SYVN1 axis plays a vital role in proliferation, apoptosis and autophagy in osteoarthritis. *Biol. Res.* 53, 1–11 (2020).
 202. Feng, L. *et al.* Circulating microRNA let-7e is decreased in knee osteoarthritis, accompanied by elevated apoptosis and reduced autophagy. *Int. J. Mol. Med.* 45, 1464 (2020).
 203. Yang, F., Huang, R., Ma, H., Zhao, X. & Wang, G. miRNA-411 Regulates Chondrocyte Autophagy in Osteoarthritis by Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha (HIF-1 α). *Med. Sci. Monit.* 26, e921155-1 (2020).
 204. Yu, Q., Zhao, B., He, Q., Zhang, Y. & Peng, X. B. microRNA-206 is required for osteoarthritis development through its effect on apoptosis and autophagy of articular chondrocytes via modulating the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B-mTOR pathway by targeting insulin-like growth factor-1. *J. Cell. Biochem.* 120, 5287–5303 (2019).
 205. Li, H. *et al.* MicroRNA-375 exacerbates knee osteoarthritis through repressing

- chondrocyte autophagy by targeting ATG2B. *Aging (Albany, NY)*. 12, 7248–7261 (2020).
206. Ni, Z. *et al.* The exosome-like vesicles from osteoarthritic chondrocyte enhanced mature IL-1 β production of macrophages and aggravated synovitis in osteoarthritis. *Cell Death Dis.* 2019 107 10, 1–16 (2019).
 207. Liang, Y. *et al.* Chondrocyte-Targeted MicroRNA Delivery by Engineered Exosomes toward a Cell-Free Osteoarthritis Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 12, 36938–36947 (2020).
 208. Cao, Y. *et al.* Decreased miR-214–3p activates NF- κ B pathway and aggravates osteoarthritis progression. *EBioMedicine* 65, 103283 (2021).
 209. Nakamura, Y., Inloes, J. B., Katagiri, T. & Kobayashi, T. Chondrocyte-specific microRNA-140 regulates endochondral bone development and targets Dnpep to modulate bone morphogenetic protein signaling. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3019–3028 (2011).
 210. Miyaki, S. *et al.* MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev.* 24, 1173–85 (2010).
 211. Karlsen, T. A., Jakobsen, R. B., Mikkelsen, T. S. & Brinchmann, J. E. microRNA-140 targets RALA and regulates chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by translational enhancement of SOX9 and ACAN. *Stem Cells Dev.* 23, 290–304 (2014).
 212. Barter, M. J. *et al.* Genome-Wide MicroRNA and Gene Analysis of Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis Identifies an Essential Role and Multiple Targets for miR-140-5p. *Stem Cells* 33, 3266–3280 (2015).
 213. Karlsen, T. A., Shahdadfar, A. & Brinchmann, J. E. Human primary articular chondrocytes, chondroblasts-like cells, and dedifferentiated chondrocytes: Differences in gene, MicroRNA, and protein expression and phenotype. *Tissue Eng. - Part C Methods* 17, 219–227 (2011).
 214. Yin, C.-M. *et al.* Dysregulation of both miR-140-3p and miR-140-5p in synovial fluid correlate with osteoarthritis severity. *Bone Joint Res.* 6, 612–618 (2017).
 215. Si, H. B. *et al.* Intra-articular injection of microRNA-140 (miRNA-140) alleviates osteoarthritis (OA) progression by modulating extracellular matrix (ECM) homeostasis in rats. *Osteoarthritis and Cartilage* (2017) doi:10.1016/j.joca.2017.06.002.
 216. Li, W. *et al.* Potential novel prediction of TMJ-OA: MiR-140-5p regulates inflammation through Smad/TGF- β signaling. *Front. Pharmacol.* 9, 15 (2019).
 217. Karlsen, T. A., de Souza, G. A., Ødegaard, B., Engebretsen, L. & Brinchmann, J. E. microRNA-140 Inhibits Inflammation and Stimulates Chondrogenesis in a Model of Interleukin 1 β -induced Osteoarthritis. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 5, e373 (2016).
 218. Sun, Y. & Qin, B. Long noncoding RNA MALAT1 regulates HDAC4-mediated proliferation and apoptosis via decoying of miR-140-5p in osteosarcoma cells. *Cancer Med.* 7, 4584–4597 (2018).
 219. Li, C. *et al.* MicroRNA-140 Suppresses Human Chondrocytes Hypertrophy by Targeting SMAD1 and Controlling the Bone Morphogenetic Protein Pathway in Osteoarthritis. *undefined* 355, 477–487 (2018).

220. Si, H. bo *et al.* miR-140 Attenuates the Progression of Early-Stage Osteoarthritis by Retarding Chondrocyte Senescence. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 19, 15 (2020).
221. Tardif, G., Hum, D., Pelletier, J. P., Duval, N. & Martel-Pelletier, J. Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes. *BMC Musculoskelet. Disord.* 10, 148 (2009).
222. Duan, L., Liang, Y., Xu, X., Xiao, Y. & Wang, D. Recent progress on the role of miR-140 in cartilage matrix remodelling and its implications for osteoarthritis treatment. *Arthritis Res. Ther.* 22, (2020).
223. Ren, T. *et al.* MiR-140-3p ameliorates the progression of osteoarthritis via targeting CXCR4. *Biol. Pharm. Bull.* 43, 810–816 (2020).
224. Wang, Y., Chen, J., Wang, X. & Wang, K. miR-140-3p inhibits bladder cancer cell proliferation and invasion by targeting FOXQ1. *Aging (Albany. NY).* 12, 20366–20379 (2020).
225. Zhang, H., Ji, N., Gong, X., Ni, S. & Wang, Y. NEAT1/miR-140-3p/MAPK1 mediates the viability and survival of coronary endothelial cells and affects coronary atherosclerotic heart disease. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 52, 967–974 (2019).
226. Yang, L. *et al.* siRNA-mediated silencing of Wnt5a regulates inflammatory responses in atherosclerosis through the MAPK/NF- κ B pathways. *Int. J. Mol. Med.* 34, 1147–1152 (2014).
227. Fushimi, S., Nohno, T., Nagatsuka, H. & Katsuyama, H. Involvement of miR-140-3p in Wnt3a and TGF β 3 signaling pathways during osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. *Genes Cells* 23, 517–527 (2018).
228. Yin, R. *et al.* miR-140-3p aggregates osteoporosis by targeting PTEN and activating PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Hum. Cell* 2020 333 33, 569–581 (2020).
229. Li, D.-M. & Sun, H. TEP1, Encoded by a Candidate Tumor Suppressor Locus, Is a Novel Protein Tyrosine Phosphatase Regulated by Transforming Growth Factor β . *Cancer Res.* 57, (1997).
230. Li, J. *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science (80-).* 275, 1943–1947 (1997).
231. Liaw, D. *et al.* Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat. Genet.* 16, 64–67 (1997).
232. Stiles, B., Groszer, M., Wang, S., Jiao, J. & Wu, H. PTENless means more. *Developmental Biology* vol. 273 175–184 (2004).
233. Downes, C. P. *et al.* Stimulation of PI 3-kinase signaling via inhibition of the tumor suppressor phosphatase, PTEN. *Adv. Enzyme Regul.* 47, 184–194 (2007).
234. Stiles, B. L. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10: Extending its PTENacles. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* vol. 41 757–761 (2009).
235. Worby, C. A. & Dixon, J. E. Pten. *Annual Review of Biochemistry* vol. 83 641–669 (2014).
236. Jung, S. H. *et al.* mTOR kinase leads to PTEN-loss-induced cellular senescence by phosphorylating p53. *Oncogene* 38, 1639–1650 (2019).

237. Pulido, R. *et al.* A unified nomenclature and amino acid numbering for human PTEN. *Science Signaling* vol. 7 (2014).
238. Stiles, B. L. PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 61 1276–1282 (2009).
239. Vivanco, I. & Sawyers, C. L. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in humancancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 489–501 (2002).
240. Yuan, T. L. & Cantley, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: Variations on a theme. *Oncogene* vol. 27 5497–5510 (2008).
241. Shen, Y. H. *et al.* Up-regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) mediates p38 MAPK stress signal-induced inhibition of insulin signaling: A cross-talk between stress signaling and insulin signaling in resistin-treated human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 281, 7727–7736 (2006).
242. Uygun, B. *et al.* SLUG is a direct transcriptional repressor of PTEN tumor suppressor. *Prostate* 75, 907–916 (2015).
243. Hettinger, K. *et al.* c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN. *Cell Death Differ.* 14, 218–229 (2007).
244. Whelan, J. T., Forbes, S. L. & Bertrand, F. E. CBF-1 (RBP-J κ) binds to the PTEN promoter and regulates PTEN gene expression. *Cell Cycle* 6, 80–84 (2007).
245. Hong, L. *et al.* The miR-17-92 cluster of microRNAs confers tumorigenicity by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Res.* 70, 8547–8557 (2010).
246. Olive, V., Jiang, I. & He, L. Mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1348–1354 (2010).
247. Jin, H. Y. *et al.* MicroRNA-17~92 plays a causative role in lymphomagenesis by coordinating multiple oncogenic pathways. *EMBO J.* 32, 2377–2391 (2013).
248. Chen, C. Y., Chen, J., He, L. & Stiles, B. L. PTEN: Tumor suppressor and metabolic regulator. *Frontiers in Endocrinology* vol. 9 338 (2018).
249. Sun, K. *et al.* The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review. *Osteoarthr. Cartil.* 28, 400–409 (2020).
250. Iwasa, K. *et al.* PTEN regulates matrix synthesis in adult human chondrocytes under oxidative stress. *J. Orthop. Res.* 32, 231–237 (2014).
251. Castaño-Betancourt, M. C. *et al.* Novel Genetic Variants for Cartilage Thickness and Hip Osteoarthritis. *PLOS Genet.* 12, e1006260 (2016).
252. Zhang, Y. W. *et al.* Targeted disruption of Mig-6 in the mouse genome leads to early onset degenerative joint disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11740–11745 (2005).
253. Appleton, C. T. G. *et al.* Reduction in Disease Progression by Inhibition of Transforming Growth Factor α -CCL2 Signaling in Experimental Posttraumatic Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 67, 2691–2701 (2015).
254. Cui, G. *et al.* Association of Common Variants in TGFA with Increased Risk of Knee Osteoarthritis Susceptibility. <https://home.liebertpub.com/gtmb> 21, 586–591 (2017).

255. Usmani, S. E. *et al.* Context-specific protection of TGF α null mice from osteoarthritis. *Sci. Rep.* 6, (2016).
256. Khan, N. M. & Haqqi, T. M. Epigenetics in osteoarthritis: Potential of HDAC inhibitors as therapeutics. *Pharmacol. Res.* 128, 73–79 (2018).
257. Araki, Y. & Mimura, T. The Histone Modification Code in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm.* 2017, (2017).
258. Queirolo, V. *et al.* PKC ϵ is a regulator of hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 24, 1451–1460 (2016).
259. Correa, D. *et al.* Zfp521 is a target gene and key effector of parathyroid hormone-related peptide signaling in growth plate chondrocytes. *Dev. Cell* 19, 533–546 (2010).
260. Kozhemyakina, E., Cohen, T., Yao, T.-P. & Lassar, A. B. Parathyroid hormone-related peptide represses chondrocyte hypertrophy through a protein phosphatase 2A/histone deacetylase 4/MEF2 pathway. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5751–5762 (2009).
261. Cheleschi, S. *et al.* Hydrostatic Pressure Regulates MicroRNA Expression Levels in Osteoarthritic Chondrocyte Cultures via the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 133 (2017).
262. Wang, P. *et al.* Histone deacetylase-4 and histone deacetylase-8 regulate interleukin-1 β -induced cartilage catabolic degradation through MAPK/JNK and ERK pathways. *Int. J. Mol. Med.* 41, 2117–2127 (2018).
263. Chang, J. *et al.* The dual role of autophagy in chondrocyte responses in the pathogenesis of articular cartilage degeneration in osteoarthritis. *Int. J. Mol. Med.* 32, 1311–1318 (2013).
264. Mutijima, E., De Maertelaer, V., Deprez, M., Malaise, M. & Hauzeur, J. P. The apoptosis of osteoblasts and osteocytes in femoral head osteonecrosis: its specificity and its distribution. *Clin. Rheumatol.* 33, 1791–1795 (2014).
265. Zamli, Z., Adams, M. A., Tarlton, J. F. & Sharif, M. Increased chondrocyte apoptosis is associated with progression of osteoarthritis in spontaneous Guinea pig models of the disease. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 17729–17743 (2013).
266. Thomas, C. M., Fuller, C. J., Whittles, C. E. & Sharif, M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with the initiation and severity of articular cartilage degradation. *Int. J. Rheum. Dis.* 14, 191–198 (2011).
267. Sharif, M., Whitehouse, A., Sharman, P., Perry, M. & Adams, M. Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3. *Arthritis Rheum.* 50, 507–515 (2004).
268. Korsmeyer, S. J., Yin, X. M., Oltvai, Z. N., Veis-Novack, D. J. & Linette, G. P. Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *BBA - Mol. Basis Dis.* 1271, 63–66 (1995).
269. Reed, J. C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nat. © Macmillan Publ. Ltd* 387, (1997).
270. Thomadaki, H. & Scorilas, A. BCL2 Family of Apoptosis-Related Genes: Functions and Clinical Implications in Cancer. <http://dx.doi.org/10.1080/10408360500295626> 43, 1–67 (2008).

271. Cory, S. & Adams, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2002 29 2, 647–656 (2002).
272. Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R. D. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.
273. Oitvai, Z. N. & Korsmeyer, S. J. Checkpoints of Dueling Dimers Foil Death Wishes. *Cell* 79, .
274. Zhai, X. *et al.* miR-181a Modulates Chondrocyte Apoptosis by Targeting Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like Protein (GPD1L) in Osteoarthritis. *Med. Sci. Monit.* 23, 1224–1231 (2017).
275. Morris, B. J. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic. Biol. Med.* 56, 133–171 (2013).
276. Li, X. SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 45, 51–60 (2013).
277. Borra, M. T., Smith, B. C. & Denu, J. M. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J. Biol. Chem.* 280, 17187–17195 (2005).
278. Li, Y. *et al.* The expression of SIRT1 in articular cartilage of patients with knee osteoarthritis and its correlation with disease severity. *J. Orthop. Surg. Res.* 11, 144 (2016).
279. Fujita, N. *et al.* Potential involvement of SIRT1 in the pathogenesis of osteoarthritis through the modulation of chondrocyte gene expressions. *J. Orthop. Res.* 29, 511–515 (2011).
280. Dvir-Ginzberg, M., Gagarina, V., Lee, E. J. & Hall, D. J. Regulation of cartilage-specific gene expression in human chondrocytes by SirT1 and nicotinamide phosphoribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 283, 36300–36310 (2008).
281. Oppenheimer, H. *et al.* Set7/9 Impacts COL2A1 Expression Through Binding and Repression of SirT1 Histone Deacetylation. *J. Bone Miner. Res.* 29, 348–360 (2014).
282. Igarashi, M., Sakamoto, K. & Nagaoka, I. Effect of glucosamine on expression of type II collagen, matrix metalloproteinase and sirtuin genes in a human chondrocyte cell line. *Int. J. Mol. Med.* 39, 472–478 (2017).
283. Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J. P. & Fahmi, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* vol. 7 33–42 (2011).
284. Goldring, M. B. & Marcu, K. B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 11, 1–16 (2009).
285. Brandl, A. *et al.* Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. *J. Orthop. Res.* 29, 1114–1120 (2011).
286. Li, Y. S. *et al.* Autophagy in osteoarthritis. *Jt. Bone Spine* 83, 143–148 (2016).
287. Edwards, J. R. *et al.* Silent information regulator (Sir)T1 inhibits NF-κB signaling to maintain normal skeletal remodeling. *J. Bone Miner. Res.* 28, 960–969 (2013).
288. Kim, H. J., Braun, H. J. & Dragoo, J. L. The effect of resveratrol on normal and

- osteoarthritic chondrocyte metabolism. *Bone Jt. Res.* 3, 51–59 (2014).
289. Tsezou, A., Iliopoulos, D., Malizos, K. N. & Simopoulou, T. Impaired expression of genes regulating cholesterol efflux in human osteoarthritic chondrocytes. *J. Orthop. Res.* 28, 1033–1039 (2010).
 290. Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A. & Brown, M. S. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35–46 (2006).
 291. Kostopoulou, F. *et al.* Central role of SREBP-2 in the pathogenesis of osteoarthritis. *PLoS One* 7, (2012).
 292. Saberianpour, S. *et al.* Therapeutic effects of statins on osteoarthritis: A review. *J. Cell. Biochem.* 123, 1285–1297 (2022).
 293. Spector, T. D. & Cooper, C. Radiographic assessment of osteoarthritis in population studies: whither kellgren and lawrence? *Osteoarthritis and Cartilage* vol. 1 203–206 (1993).
 294. KELLGREN, J. H. & LAWRENCE, J. S. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 16, 494–502 (1957).
 295. Kierzek, R., Turner, D. H. & Kierzek, E. Microarrays for identifying binding sites and probing structure of RNAs. *Nucleic Acids Res.* 43, 1–12 (2015).
 296. Sjø, K. Receiver-operating characteristic curve analysis in diagnostic, prognostic and predictive biomarker research. *J. Clin. Pathol.* 62, 1–5 (2009).
 297. Fogli, S. *et al.* Identification of plasma microRNAs as new potential biomarkers with high diagnostic power in human cutaneous melanoma. *Tumor Biol.* 39, 101042831770164 (2017).
 298. Dalby, B. *et al.* Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 33, 95–103 (2004).
 299. Paraskevopoulou, M. D. *et al.* DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res.* 41, W169–W173 (2013).
 300. Zhang, B., Kirov, S. & Snoddy, J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* 33, W741–W748 (2005).
 301. Dennis, G. *et al.* DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 4, P3 (2003).
 302. Kafkas, Ş., Dunham, I. & McEntyre, J. Literature evidence in open targets - a target validation platform. *J. Biomed. Semantics* 8, 1–9 (2017).
 303. Bader, G. D. & Hogue, C. W. V. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics* 4, 1–27 (2003).
 304. Chin, C. H. *et al.* cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst. Biol.* 8 Suppl 4, (2014).
 305. Carbon, S. *et al.* The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Res.* 49, D325–D334 (2021).
 306. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 27–30 (2000).

307. Bindea, G. *et al.* ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091 (2009).
308. Bindea, G., Galon, J. & Mlecnik, B. CluePedia Cytoscape plugin: Pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* 29, 661–663 (2013).
309. James, S. L. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet (London, England)* 392, 1789–1858 (2018).
310. Safiri, S. *et al.* Global, regional, and national burden of other musculoskeletal disorders 1990–2017: results from the Global Burden of Disease Study 2017. *Rheumatology (Oxford)*. 60, 855–865 (2021).
311. Guccione, A. A. *et al.* The effects of specific medical conditions on the functional limitations of elders in the Framingham Study. *Am J Public Heal.* 84, 351–358 (1994).
312. Loeser, R. F. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthr. Cartil.* 17, 971–979 (2009).
313. Felson, D. T. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N. Engl. J. Med.* 354, 841–848 (2006).
314. Zhuo, Q., Yang, W., Chen, J. & Wang, Y. Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 729–737 (2012).
315. Kluzek, S., Newton, J. L. & Arden, N. K. Is osteoarthritis a metabolic disorder? *Br. Med. Bull.* 115, 111–121 (2015).
316. Tootsi, K., Märtson, A., Kals, J., Paapstel, K. & Zilmer, M. Metabolic factors and oxidative stress in osteoarthritis: a case-control study. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 77, 520–526 (2017).
317. Sharif, B. *et al.* Projecting the direct cost burden of osteoarthritis in Canada using a microsimulation model. *Osteoarthr. Cartil.* 23, 1654–1663 (2015).
318. Reichmann, W. M. *et al.* Responsiveness to change and reliability of measurement of radiographic joint space width in osteoarthritis of the knee: A systematic review. *Osteoarthr. Cartil.* 19, 550–556 (2011).
319. Chen, X. *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 18, 997–1006 (2008).
320. Miles, G. D., Seiler, M., Rodriguez, L., Rajagopal, G. & Bhanot, G. Identifying microRNA/mRNA dysregulations in ovarian cancer. *BMC Res. Notes* 5, 164 (2012).
321. Taurino, C. *et al.* Gene expression profiling in whole blood of patients with coronary artery disease. *Clin. Sci. (Lond)*. 119, 335–43 (2010).
322. Iliopoulos, D., Malizos, K. N., Oikonomou, P. & Tsezou, A. Integrative MicroRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS One* 3, (2008).
323. Sondag, G. R. & Haqqi, T. M. The Role of MicroRNAs and Their Targets in Osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 18, 56 (2016).

324. van Meurs, J. B. J. Osteoarthritis year in review 2016: genetics, genomics and epigenetics. *Osteoarthr. Cartil.* 25, 181–189 (2017).
325. Gantier, M. P. *et al.* Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res.* 39, 5692–5703 (2011).
326. Ntounou, E. *et al.* Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes. *Clin. Epigenetics* 9, 127 (2017).
327. Laterza, O. F. *et al.* Plasma MicroRNAs as Sensitive and Specific Biomarkers of Tissue Injury. (2009) doi:10.1373/clinchem.2009.131797.
328. Thomou, T. *et al.* Adipose-Derived Circulating miRNAs Regulate Gene Expression in Other Tissues. *Nature* 542, 450 (2017).
329. Borgonio Cuadra, V. M., González-Huerta, N. C., Romero-Córdoba, S., Hidalgo-Miranda, A. & Miranda-Duarte, A. Altered expression of circulating microRNA in plasma of patients with primary osteoarthritis and in silico analysis of their pathways. *PLoS One* 9, (2014).
330. Beyer, C. *et al.* Signature of circulating microRNAs in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 74, e18–e18 (2015).
331. Wheeler, B. M. *et al.* The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evol. Dev.* 11, 50–68 (2009).
332. Brazma, A. *et al.* Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. *Nat. Genet.* 2001 294 29, 365–371 (2001).
333. Ståhlberg, A., Zoric, N., Åman, P. & Kubista, M. Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case. <http://dx.doi.org/10.1586/14737159.5.2.221> 5, 221–230 (2014).
334. Nicolas, F. E. *et al.* Experimental identification of microRNA-140 targets by silencing and overexpressing miR-140. *RNA* 14, 2513–2520 (2008).
335. Miyaki, S. *et al.* MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev.* 24, 1173–1185 (2010).
336. Tardif, G. *et al.* NFAT3 and TGF- β /SMAD3 regulate the expression of miR-140 in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 15, R197 (2013).
337. Yin, C.-M. *et al.* Dysregulation of both miR-140-3p and miR-140-5p in synovial fluid correlate with osteoarthritis severity. *Bone Joint Res.* 6, 612–618 (2017).
338. WOODS, S. *et al.* microRNA-seq of cartilage reveals an overabundance of miR-140-3p which contains functional isomiRs. *RNA* 26, 1575–1588 (2020).
339. Cheng, T. L. *et al.* MeCP2 Suppresses Nuclear MicroRNA Processing and Dendritic Growth by Regulating the DGCR8/Drosha Complex. *Dev. Cell* 28, 547–560 (2014).
340. Luobu, Z. *et al.* CircSCAPER contributes to IL-1 β -induced osteoarthritis in vitro via miR-140-3p/EZH2 axis. *Bone Joint Res.* 11, 61–72 (2022).
341. Li, H., Liu, Z., Guo, X. & Zhang, M. Circ_0128846/miR-140-3p/JAK2 Network in Osteoarthritis Development. *Immunol. Invest.* 51, 1529–1547 (2022).

342. Luobu, Z. *et al.* CircSCAPER contributes to IL-1 β -induced osteoarthritis in vitro via miR-140-3p/EZH2 axis. *Bone Joint Res.* 11, 61–72 (2022).
343. Li, H., Liu, Z., Guo, X. & Zhang, M. Circ_0128846/miR-140-3p/JAK2 Network in Osteoarthritis Development. *Immunol. Invest.* 51, 1529–1547 (2022).
344. Wang, Z. *et al.* Knockdown of LINC01385 inhibits osteoarthritis progression by modulating the microRNA-140-3p/TLR4 axis. *Exp. Ther. Med.* 22, (2021).
345. Aryal, B., Singh, A. K., Rotllan, N., Price, N. & Fernández-Hernando, C. MicroRNAs and lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology* vol. 28 273–280 (2017).
346. Hochberg, M. C., Tracy, J. K., Hawkins-Holt, M. & Flores, R. H. Comparison of the efficacy of the tumour necrosis factor alpha blocking agents adalimumab, etanercept, and infliximab when added to methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 62 Suppl 2, 13–16 (2003).
347. Kostopoulou, F., Malizos, K. N., Papathanasiou, I. & Tsezou, A. MicroRNA-33a regulates cholesterol synthesis and cholesterol efflux-related genes in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* 17, 42 (2015).
348. Kuhn, B. M. *et al.* Flavonol-induced changes in PIN2 polarity and auxin transport in the *Arabidopsis thaliana* rol1-2 mutant require phosphatase activity. *Sci. Rep.* 7, (2017).
349. Dlouhá, D. & Hubáček, J. A. Regulatory RNAs and cardiovascular disease - with a special focus on circulating microRNAs. *Physiol. Res.* 66, S21–S38 (2017).
350. Ma, F., Li, G., Yu, Y., Xu, J. & Wu, X. MiR-33b-3p promotes chondrocyte proliferation and inhibits chondrocyte apoptosis and cartilage ECM degradation by targeting DNMT3A in osteoarthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 519, 430–437 (2019).
351. Nan, A. *et al.* A novel regulatory network among LncRpa, CircRar1, MiR-671 and apoptotic genes promotes lead-induced neuronal cell apoptosis. *Arch. Toxicol.* 91, 1671–1684 (2017).
352. Tan, X. *et al.* miR-671-5p inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by downregulating FOXM1 expression in breast cancer. *Oncotarget* 7, 293–307 (2016).
353. Lien, G. S. *et al.* The ability to suppress macrophage-mediated inflammation in orbital fat stem cells is controlled by miR-671-5p. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 97 (2014).
354. Wu, X. *et al.* lncRNA DLEU1 Modulates Proliferation, Inflammation, and Extracellular Matrix Degradation of Chondrocytes through Regulating miR-671-5p. *J. Immunol. Res.* 2022, (2022).
355. Liu, Z. *et al.* MicroRNA-671-3p regulates the development of knee osteoarthritis by targeting TRAF3 in chondrocytes. *Mol. Med. Rep.* 20, 2843–2850 (2019).
356. Zhang, G. *et al.* MiR-502-5p inhibits IL-1 β -induced chondrocyte injury by targeting TRAF2. *Cell. Immunol.* 302, 50–7 (2016).
357. Kluzek, S., Newton, J. L. & Arden, N. K. Is osteoarthritis a metabolic disorder? *Br. Med. Bull.* 115, 111–121 (2015).
358. Mayr, B. M., Canettieri, G. & Montminy, M. R. Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10936–10941 (2001).

359. Mayr, B. & Montminy, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 599–609 (2001).
360. Qi, L. *et al.* Adipocyte CREB Promotes Insulin Resistance in Obesity. *Cell Metab.* 9, 277–286 (2009).
361. Swingle, T. E. *et al.* The expression and function of microRNAs in chondrogenesis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 64, 1909–19 (2012).
362. Swingle, T. E. *et al.* The function of microRNAs in cartilage and osteoarthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 37, 40–47 (2019).
363. Zhang, P. & Itan, Y. Biological Network Approaches and Applications in Rare Disease Studies. *Genes (Basel).* 10, (2019).
364. Appleton, C. T. G., Usmani, S. E., Bernier, S. M., Aigner, T. & Beier, F. Transforming growth factor alpha suppression of articular chondrocyte phenotype and Sox9 expression in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 56, 3693–3705 (2007).
365. Endres, M. Statins: Potential new indications in inflammatory conditions. *Atheroscler. Suppl.* 7, 31–35 (2006).
366. Simopoulou, T., Malizos, K. N., Poultides, L. & Tsezou, A. Protective effect of atorvastatin in cultured osteoarthritic chondrocytes. *J. Orthop. Res.* 28, 110–115 (2010).
367. De Ruijter, A. J. M., Van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. & Van Kuilenburg, A. B. P. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370, 737 (2003).
368. Lu, J., Sun, Y., Ge, Q., Teng, H. & Jiang, Q. Histone deacetylase 4 alters cartilage homeostasis in human osteoarthritis. *BMC Musculoskelet. Disord.* 15, 1–8 (2014).
369. Young, D. A. *et al.* Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. *Arthritis Res. Ther.* 2005 737, 1–10 (2005).
370. Aigner, T., Söder, S., Gebhard, P. M., McAlinden, A. & Haag, J. Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis—structure, chaos and senescence. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 3, 391–399 (2007).
371. Borner, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.* 39, 615–647 (2003).
372. Hwang, H. S. & Kim, H. A. Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 26035 (2015).
373. Zamli, Z., Adams, M. A., Tarlton, J. F. & Sharif, M. Increased Chondrocyte Apoptosis Is Associated with Progression of Osteoarthritis in Spontaneous Guinea Pig Models of the Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 17729 (2013).
374. Trachana, V., Ntounou, E., Anastasopoulou, L. & Tsezou, A. Studying microRNAs in osteoarthritis: Critical overview of different analytical approaches. *Mech. Ageing Dev.* 171, (2018).
375. Yin, R. *et al.* miR-140-3p aggregates osteoporosis by targeting PTEN and activating PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Hum. Cell* 33, 569–581 (2020).

376. Wu, S. M., Li, T. H., Yun, H., Ai, H. W. & Zhang, K. H. miR-140-3p Knockdown Suppresses Cell Proliferation and Fibrogenesis in Hepatic Stellate Cells via PTEN-Mediated AKT/mTOR Signaling. *Yonsei Med. J.* 60, 561 (2019).
377. Yang, D. *et al.* Extracorporeal Cardiac Shock Wave-Induced Exosome Derived From Endothelial Colony-Forming Cells Carrying miR-140-3p Alleviate Cardiomyocyte Hypoxia/Reoxygenation Injury via the PTEN/PI3K/AKT Pathway. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 3612 (2022).
378. Bhardwaj, A. *et al.* The isomiR-140-3p-regulated mevalonic acid pathway as a potential target for prevention of triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 20, (2018).
379. Xiao, Q. *et al.* Overexpression of miR-140 Inhibits Proliferation of Osteosarcoma Cells via Suppression of Histone Deacetylase 4. *Oncol. Res.* 25, 267 (2017).
380. Zhu, Z. R. *et al.* MiR-140-3p is Involved in In-Stent Restenosis by Targeting C-Myb and BCL-2 in Peripheral Artery Disease. *J. Atheroscler. Thromb.* 25, 1168 (2018).
381. Knäuper, V. *et al.* The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J. Biol. Chem.* 272, 7608–7616 (1997).
382. Knäuper, V., López-Otin, C., Smith, B., Knight, G. & Murphy, G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J. Biol. Chem.* 271, 1544–1550 (1996).
383. Aletaha, D., Funovits, J. & Smolen, J. S. Physical disability in rheumatoid arthritis is associated with cartilage damage rather than bone destruction. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 733–739 (2011).
384. Buch, M. Anti-tumour necrosis factor (TNF)- α therapy (etanercept). *Arthritis Res. Ther.* 2002 41 4, 1–3 (2002).
385. Wehling, N. *et al.* Interleukin-1 β and tumor necrosis factor α inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF- κ B-dependent pathways. *Arthritis Rheum.* 60, 801–812 (2009).
386. van den Berg, W. B. Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms. *Osteoarthr. Cartil.* 19, 338–341 (2011).
387. Lee, A. S. *et al.* A Current Review of Molecular Mechanisms Regarding Osteoarthritis and Pain. *Gene* 527, 440 (2013).
388. Lian, C. *et al.* Collagen type II suppresses articular chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis progression by promoting integrin β 1-SMAD1 interaction. *Bone Res.* 7, (2019).
389. Li, H., Wang, D., Yuan, Y. & Min, J. New insights on the MMP-13 regulatory network in the pathogenesis of early osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 19, 1–12 (2017).
390. Liang, Z.-J. *et al.* MiRNA-140 is a negative feedback regulator of MMP-13 in IL-1 β -stimulated human articular chondrocyte C28/I2 cells. *Inflamm. Res.* 61, 503–9 (2012).
391. Ren, T. *et al.* MiR-140-3p ameliorates the progression of osteoarthritis via targeting CXCR4. *Biol. Pharm. Bull.* 43, 810–816 (2020).
392. Chen, Y., Gao, D. Y. & Huang, L. In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 81, 128–141 (2015).

393. Si, H. bo *et al.* miR-140 Attenuates the Progression of Early-Stage Osteoarthritis by Retarding Chondrocyte Senescence. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 19, 15–30 (2019).



Studying microRNAs in osteoarthritis: Critical overview of different analytical approaches

Varvara Trachana^{a,1}, Eleni Ntoumou^{b,1}, Lydia Anastasopoulou^b, Aspasia Tsezou^{a,b,*}

^a University of Thessaly, Faculty of Medicine, Laboratory of Biology, Larissa, Greece

^b University of Thessaly, Faculty of Medicine, Laboratory of Cytogenetics and Molecular Genetics, Larissa, Greece

ARTICLE INFO

Keywords:

MicroRNAs
Age-related diseases
Osteoarthritis
Expression profiling
Functional studies

ABSTRACT

MicroRNAs are small non-coding RNA species with the ability to post-transcriptionally control the expression of multiple genes, that have gained substantial interest because of their expression alterations that accompanies aging and possible age-related pathologies. Given the constant rise in the number of patients suffering from age-related diseases –due to the increase of the aging population in the western world- the exploration of the role of specific microRNAs in the etiopathology of these diseases is expected to have great impact. Degenerative arthritis or osteoarthritis is of the most common age-related diseases and possible the one with the most limited therapeutic options. In this review therefore, we highlight recent advances considering the implication of microRNAs in processes known to contribute to the development of this disease. We also critically present the analytical approaches adopted so far, in an attempt to facilitate the acknowledgment of the necessary experimental tactic that will lead to the establishment of microRNAs as biomarkers and/or therapeutic agents for this age-related pathology.

1. Introduction

Recent studies have revealed that almost one third of all mammalian mRNA's expression is under the control of the function of microRNAs (miRs) (Lewis et al., 2005). MiRs are encoded from the introns of genes which transcribe into primary miRs which then are converted into precursor miRs (pre-miRs) that have a folded hairpin structure of ≈ 70 nucleotides long. These pre-miRs are then transferred into the cytoplasm where they are further processed in order to release the mature small non-coding RNAs, 22–28 nucleotides in length (Pimentel et al., 2015). Each mature miR can regulate up to hundreds of downstream targets by binding mainly to the 3'-UTR of mRNAs. The base-pairing can be perfect, resulting in mRNA degradation, or imperfect, leading to inhibition of the gene expression (Bartel, 2009).

Recent evidence demonstrated that miRs are implicated in regulating processes affecting the organismal ageing while miR profiling studies showed that their expression changes are significant for cellular senescence (Chen et al., 2010). In fact, it was demonstrated that most of the miRs analyzed show a decrease in their expression with age in different species (Ibáñez-Ventoso et al., 2006; Mori et al., 2012), and that this down-regulation can be reversed by caloric restriction, at least in mice (Mori et al., 2012). Besides that, Mimura et al. have

demonstrated it that specific miRs, such as miR-29a, miR-29c, miR-195, miR-301a, miR-148b-3p, miR-7a, miR-93, miR-106b, miR-185, miR-405a, miR-539, and miR-30, are differentially expressed in ageing rats liver (Mimura et al., 2014). Moreover, specific miR-target mRNAs interactions have been reported to regulate all major causes known to contribute to the onset of the senescent phenotype, such as DNA damage, telomere shortening, protein mis-folding, oxidative stress for comprehensive review see (Williams et al., 2017).

On the other hand, besides evidence accumulating that demonstrate that cellular senescence is a major risk factor for human pathologies and especially for age-related diseases, the exact molecular link is still missing (Dimmeler and Nicotera, 2013). In an attempt to reveal this mechanism miRs expression profile was studied, and in many cases miR profile alternations seemed to correlate with disease-related organ or cellular dysfunction. These changes imply, not just a general miR expression pattern that accompanies ageing, but a more sophisticated miRs-interacting partners dependent regulation scheme, that could prove part of the etiopathology of the age-related diseases (Tacutu et al., 2011). Towards this direction several studies reported changes in specific miRs expression, such as changes in miR-1, miR-133-a, miR499 and miR-208-a that correlate with acute myocardial infraction (AMI) (Wang et al., 2010). Stroke was also found to be accompanied with

* Corresponding author at: University of Thessaly, Faculty of Medicine, Laboratory of Cytogenetics and Molecular Genetics, Larissa, Greece.

E-mail address: atsezou@med.uth.gr (A. Tsezou).

¹ Equal contribution

<https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.02.006>

Received 28 September 2017; Received in revised form 14 February 2018; Accepted 25 February 2018

Available online 27 February 2018

0047-6374/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

changes in circulating miRs expression (Vijayan and Reddy, 2016) and miR-126 was implicated in atherosclerosis (Zernecke et al., 2009). Besides the cardiovascular diseases, other classic age-related diseases, such as the neurodegenerative disorders have also been linked to miR profile changes. For instance, Leidinger and co-workers showed that a 12-miR signature was able to identify Alzheimer's disease patients against controls with around 93% accuracy (Leidinger et al., 2013). Similarly, miR-1, miR-22-5p, and miR-29 levels in the blood of patients with Parkinson's disease (PD) proved to be able to differentiate subjects with PD from healthy controls (Margis et al., 2011).

Degenerative arthritis or Osteoarthritis (OA) is often referred to as the model age-related disease and is becoming the disease with possible the clearer association with cellular senescence. It has been shown previously that osteoarthritic chondrocytes exhibit specific senescence-associated features, such as telomere attrition (Martin et al., 2004), senescence-associated β -galactosidase activity (Price et al., 2002) and increased p16ink4a expression (Zhou et al., 2004). Furthermore, senescent cells accumulation in the joint is suggested to play an important role in the impairment of cartilage integrity. Recently, Xu et al. showed that transplantation of senescent cells into the knee joint area of wild-type mice caused features of OA pathology, demonstrating, for the first time, a direct involvement of senescent cells in the development of the disease (Xu et al., 2017). Xu and co-workers implied that targeting senescent cells could prove beneficial for the treatment of OA. In fact, a few months later another study demonstrated that selective elimination of senescent cells postpones the onset of OA in mice (Jeon et al., 2017). The later proves the importance of chondrocytes' senescence in the development of OA and highlights the potential of therapies targeting senescent cells.

OA is the most common cause of chronic disability in older adults. It is affecting worldwide approximately 20% of the population and is characterized by degradation of the articular cartilage, chondrocyte hypertrophy, synovitis, formation of osteophytes and remodeling of the periarticular bone (Bijlsma et al., 2011; Carossino et al., 2007; Neogi and Zhang, 2013). It is a multifactorial disease in which, besides ageing, obesity as well as environmental, mechanical and genetic factors interact, leading to severe joint pain and functional disability resulting in decreased quality of life (Carossino et al., 2007; Scharstuhl et al., 2007). Nevertheless, since ageing is a major risk factor, an expansion of the affected population is expected based on the increasing life expectancy in the western world (Lemey et al., 2015). Given the burden on national health systems due to this fact, emphasis has been given to the deeper understanding of the molecular mechanisms that promote OA, in order to support the discovery of new targets for therapies that will improve or even cease the development of the disease. To this day the available drugs simply reduce the pain but fail to cure or inhibit the progression of the disease. Surgical joint replacement or total arthroplasty, therefore, remains the only way out, but is rather costly for the public health system, and it requires a long time in order for the physiological functions of the patient to be restored (Okoro et al., 2013). Early diagnosis of OA is crucial to improving clinical management, monitoring of disease progression and treatment options. Radiography remains the most commonly used imaging technique for the evaluation of an OA joint. However, a major limitation of radiography is that it is unable to visualize all joint tissues. Moreover, there is lack of association with clinical symptoms and when articular cartilage damage is detected radiographically, significant cartilage degradation has already occurred (McDonald et al., 2011). The limitations of radiography have led to research into alternative ways for monitoring osteoarthritis that could also serve as OA biomarkers.

Towards this direction miRs seem rather attractive. Especially circulating miRs could prove powerful biomarkers. Circulating miRs, are miRs found in body fluids such as serum, synovial fluid or urine and have been reported to be remarkably stable (Mitchell et al., 2008; Wang et al., 2010). These miRs are protected from nuclease degradation because they bind to plasma components, like the high-density lipoprotein

(HDL) cholesterol, or proteins, such as Argonaute 2 and nucleophosmin, or to microvesicles, such as exosomes, apoptotic bodies and micro-particles (Arroyo et al., 2011; Turchinovich et al., 2011; Vickers et al., 2011). Accumulating evidence demonstrating that circulating miRs' profiling reflects changes of the cell state under different physiological and/or pathological conditions (Zhang et al., 2015a,b), raises the possibility of the next generation clinical biomarker and/or therapeutic target to emerge.

The importance of the role of miRs in the musculoskeletal system was identified by cartilage specific deletion of Dicer. Dicer is the ribonuclease responsible for the release of the 22 nucleotide long mature miR from the pre-miR precursor (Bartel, 2004). The cartilage Dicer knock-out mice showed significant growth defects and their further analysis revealed the critical role of a miR-dependent pathway in the regulation of chondrocyte proliferation (Kobayashi et al., 2008). Moreover, several recent studies have demonstrated the importance of circulating miRs in the etiopathology of bone diseases. Musculoskeletal conditions related to aging, such as Osteoporosis, osteopenia, and fragility fractures have been associated with altered circulating miRs repertoire. You et al. showed that, miR-27a was among the most down-regulated miRs in the serum of patients with Osteoporosis compared to healthy individuals (You et al., 2016). Also, miR-133a and miR-21-5p were found to be down-regulated in the plasma of osteoporotic women and are considered as potential biomarkers for postmenopausal osteoporosis (Li et al., 2014). Several other studies have reported a number of differentially expressed miRs in tissue and liquid biopsies of osteoporosis patients, revealing a strong link between miR levels and bone metabolism (for detailed description see Hackl et al. (2016)). Importantly, different groups using ovariectomy-induced osteoporosis animal models have pointed at the therapeutic potential of certain miRs: antagomir oligonucleotides against miR-214-3p (Wang et al., 2013) or delivering of synthetic miR-34a enhanced bone formation in these animals (Krzeszinski et al., 2014). These studies highlight the urgent need for further state-of-the-art analyses in order to reveal the maximum potential of miR based tools for the diagnosis, prevention and possible therapy of age-related musculoskeletal disorders.

For instance, genome wide association studies (GWAS) have revealed the importance of several genetic factors in the pathophysiology of OA, where variants of 18 genes have been associated with OA susceptibility (Evangelou et al., 2011). These genes have been reported to be involved in the regulation of processes like apoptosis, low grade inflammation and disturbances in the lipid homeostasis, but, how exactly these mechanisms contribute to the development of OA remains elusive (Glyn-Jones et al., 2015). The missing molecular links could lay within the involvement of miRs in such processes, as recent studies demonstrate.

For example, many miRs have been shown to be implicated in the inflammatory process, mainly by regulating levels of several inflammatory mediators such as pro-inflammatory cytokines and reactive oxygen species (ROS), such as nitric oxide (NO) (Goldring and Otero, 2011; Scanzello, 2017). Among them, miR-502-5p was found to target the TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) and inhibit NF- κ B signaling pathway (Zhang et al., 2016), miR-130a was shown to regulate TNF- α expression (Li et al., 2015a,b) and miR-149 was shown to have a regulatory effect on pro-inflammatory cytokines such as TNF α , IL1 β and IL6 (Santini et al., 2014). Also, miR-373 targets the P2X purinoceptor 7 (P2 $\times$ 7R) and suppressed inflammation (Jin et al., 2017). Furthermore, cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with the pathogenesis of chronic inflammation and pain in osteoarthritis (OA). In another recent study, miR-558 and miR-199a were shown to directly suppress COX-2 in chondrocytes (Park et al., 2013a,b), (Akhtar and Haqqi, 2012).

Chondrocyte apoptosis is another one of the major characteristics in OA pathogenesis since it is leading to cartilage degradation (Blanco et al., 1998; Hashimoto et al., 1998a,b; Lotz et al., 1999). MiR-181a, which is down-regulated in OA patients, is targeting Glycerol-3-

Phosphate Dehydrogenase 1-Like Protein (GPD1L) and regulates chondrocyte apoptosis (Zhai et al., 2017). MiR-9, which expression was significantly reduced in OA chondrocytes compared to normal, is targeting protogenin (PRTG). Over-expression of PRTG activates caspase-3 signaling and results in increased apoptosis. An up-regulated miR in OA patients, miR-15a-5p, is targeting VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A) and is contributing to apoptosis and matrix degradation (Chen and Tian, 2017). Also, miR-146a, which was found to be over-expressed in OA, is suggested to be involved in human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. It may contribute to the mechanical injury of chondrocytes by increasing the levels of VEGF and damaging the transforming growth factor (TGF)- β signaling pathway through the targeted inhibition of Smad4 in cartilage (Jin et al., 2014). Moreover, in another study the expression of miR-139 was found to be up-regulated in the damaged region of the OA articular cartilage as compared with the unaffected region of the cartilage of the same patient. These results further support the hypothesis of miR-139-mediated down-regulation of the monocyte chemoattractant protein-1-induced protein-1 (MCP1), a modulator of inflammatory reactions, that promotes IL-6 expression in OA (Makki and Haqqi, 2015).

Another one of the different aspects of OA is the disturbance in lipid homeostasis through deregulation of genes that are involved in reverse cholesterol transport. In a study that was performed in our laboratory, it was demonstrated that miR-33a expression levels were significantly increased in OA chondrocytes compared to normal chondrocytes. It was also shown that this miR regulates cholesterol synthesis through PI3 K/Akt pathway as well as cholesterol efflux-related genes ABCA1 and ApoA1 in OA chondrocytes (Kostopoulou et al., 2015).

Besides studies pointing at the indirect evidence that link processes important for the pathogenesis of OA to miRs function(s) (for review see (Le et al., 2013)), our group was the first to demonstrate the differential expression of 16 miRs in OA cartilage as compared to control cartilage (Iliopoulos et al., 2008). Although numerous data on miRs, including large scale detection and functional experiments, have been accumulated since that first report, their exact role in OA remains unclear. The need to identify their role together with the recent discovery of miRs in circulation, is making further investigation on miRs in OA imperative for disease diagnosis, prognosis and possible for their therapeutic potential.

In this review we discuss therefore reports of miRs found to be deregulated in OA and/or have been demonstrated to play crucial roles in cellular processes associated with OA pathogenesis. We present these studies by grouping them in 3 categories, a) studies of expression profiling (including the recently discovered circulating miRs), b) functional *in vitro* studies and c) *in vivo* studies using animal models of OA. We especially focus in critically presenting the different experimental approaches used. We believe that by analyzing the restrictions as well as by acknowledging the strong points of the different approaches, we will contribute in paving the way towards the establishment of miRs as potential biomarkers and prospective therapeutic agents in OA.

2. MiRs expression profiling studies in OA

MiR profiling can be defined as either the measurement of the relative abundance of a group of miRs of specific biological interest or the full profiling of all miRs in a given sample. Because each miR potentially inhibits the expressions of a number of genes, this “miR signature” reflects a gene expression repertoire that determines the developmental stage, differentiation status or potentially a disease etiopathology. Therefore when comparing the profiling analysis of the healthy cartilage to that of the osteoarthritis patient this turns into an “OA signature”, which could prove highly useful when studying the underlying mechanistic regulatory network.

Profiling of such small RNAs involves particular challenges, but recent technological advances are able to overcome many of these

barriers, and a wide range of approaches and platforms are now available for miR profiling (Pritchard et al., 2012). The experimental approaches that are widely used for miRs expression profiling are i) reverse transcription followed by quantitative real time PCR (qRT-PCR), ii) hybridisation-based methods *i.e.* miR microarrays and iii) the high-throughput sequencing *i.e.* microRNA-seq, and each one of them has its advantages and weaknesses (Pritchard et al., 2012). Usually a microarray analysis is followed by qRT-PCR verification and in most cases these approaches are combined with further *in silico* studies and in some cases also with functional *in vitro* or *in vivo* analyses.

miRs are expressed in a tissue-specific manner and therefore profiling studies in general have to overcome the major obstacle of cell heterogeneity of the tissues under analysis (Hoefig and Heissmeyer, 2010). But since chondrocytes are the single cell type present in the mature cartilage this is not an issue when searching for the “OA miR signature”.

2.1. Microarrays/qRT-PCR

As mentioned above, our study in 2008 was the first to perform miR microarray profiling for 365 miRs and detected 16 miRs that were deregulated in the cartilage of OA patients as compared to healthy cartilage. From the deregulated miRs, 9 miRs (miR-483, miR-22, miR-377, miR-103, miR-16, miR-223, miR-30b, miR-23b and miR-509) were up-regulated and 7 (miR-29a, miR-140, miR-25, miR-337, miR-210, miR-26a and miR-373) were down-regulated in OA compared to normal samples (Iliopoulos et al., 2008). These data from miR screening were associated with proteomic analysis by bioinformatics tools which resulted in the identification of a network linking inflammation and metabolism deregulation to OA. Furthermore, we specifically validated in *in vitro* experiments the miR-22-dependent regulation of BMP7 and PPARA, both implicated in metabolic pathways in the cartilage (Iliopoulos et al., 2008).

In a paper of 2009, Jones et al. analyzed the expression of 157 miRs by RT-PCR and identified 17 miRs in OA cartilage and 30 miRs in OA bone that were differentially expressed compared to control tissues. Among them, miR-9, miR-98, which were found up-regulated both in OA bone and OA cartilage and miR-146a, which was down-regulated in OA cartilage were further analyzed. Bioinformatics tools for pathway analysis combined with *in vitro* functional assays in chondrocytes, suggested a role for these miRs in mediating IL-1 β induced production of TNF- α , further confirming a potential miR dependent regulation of the inflammation process (Jones et al., 2009).

In the study of Diaz-Prado et al. (2012) expression levels of 723 miRs were studied using the human miR microarray kit (Agilent Technologies, Spain) and found that 7 miRs were differentially expressed between OA and normal human chondrocytes: in specific, miR-483-5p was found up-regulated, while 6 miRs (miR-149-3p, miR-582-3p, miR-1227, miR-634, miR-576-5p, and miR-641) were down-regulated in OA chondrocytes. *In silico* analyses predicted that important pathways for OA pathogenesis, such as the TGF- β , Wnt, Erb and mTOR signaling, are potentially regulated by the these differentially expressed miRs, which suggests a diagnostic and/or therapeutic potential of the identified miRs (Diaz-Prado et al., 2012).

In 2012 Swingle and co-workers, in a study that used microarrays analysis and RT-PCR verification, identified miR-455 to be differentially expressed during chondrogenesis as well in the aging articular cartilage (Swingle et al., 2012). They also reported that miR-455 has a role in regulating the TGF β signaling that provides a link between this pathway and the age-related etiopathology of OA.

Recently, Prasad et al. (Prasad et al., 2016) combined microarray analysis verified by RT-PCR with the use of an OA rat meniscectomy model. Initially, the researchers used subchondral bone samples from patients undergoing knee replacement surgery and screened for miRs associated with the sclerotic status in the pathogenesis of OA. They identified 8 down regulated miRs that were further

validated by qRT-PCR (miR-211-5p, miR-33b-5p, miR-483-5p, miR-199a-5p, miR-551b, miR-708-5p, miR-199a-3p and miR-590-5p). These altered miRs were further analyzed *in silico* for their predicted targets with the Ingenuity Pathway Analysis software (IPA, 2012 Ingenuity Systems) which resulted in five miRs with previously validated experimentally target genes. Of these five miRs, four were also shown to be deregulated in the OA rat model. These miRs (miR-199a-5p, miR-199a-3p, miR-590-5p and miR-211-5p) is suggested to be involved in the sclerosis of the bone that occur in the early stages of OA development which can lead to cartilage degeneration. Further studies in this direction could therefore turn these molecules into therapeutic agents that can manipulate the progression of the disease.

2.2. miR sequencing

In a recent study by Crowe et al. (2016), RNA seq was conducted in order to find new miRs deregulated in human OA cartilage. According to this study, 990 known miRs were found. Among them, 20 miRs appeared to have the highest number of sequencing reads (the 20 miRs: miR-140-3p, miR-10b, miR-101, miR-140-5p, miR-26a, let-7b, miR-320a, miR-23b, let-7a, miR-23a, miR-27b, miR-125b, miR-27a, miR-100, miR-21, miR-24, let-7c, let-7f, miR-30d, miR-99b) (Crowe et al., 2016). Also, they identified 1621 potentially novel miRs, 6 of which were validated by northern analysis in SW1353 chondrosarcoma cells and by qRT-PCR comparing hip cartilage from OA patients and patients with fracture in their neck femur. Three (3) of the novel miRs were found also to be deregulated in cartilage models of chondrogenesis, chondrocyte differentiation or cartilage injury. After this, miRs mimics of these 3 miRs or their inhibitors were inserted into human articular cells and microarray analysis was conducted. Among these miRs, special emphasis was attributed to miR-3085-3p, which appears to be highly expressed in cartilage. This miR was shown by bioinformatics, microarray assay, luciferase assay, and western blot to directly target the integrin subunit alpha 5 (ITGA5) mRNA and to reduce its protein levels in chondrocytes. ITGA5 is known to be involved in cartilage homeostasis (Crowe et al., 2016).

3. Circulating miRs

The detection of miRs in human biological fluids such as plasma, serum and synovial fluid (Murata et al., 2010; Weber et al., 2010) led in the quest of miR signatures that could differentiate the pathological from the physiological condition. Circulating miRs are, as we mentioned earlier, considered to be attractive molecules to serve as biomarkers for OA diagnosis or/and prognosis. Apart from their usefulness as potential disease biomarkers, circulating miRs might also act as long-distance signals, since they could be released from cells within extracellular vesicles which protects them from degradation (Turchinovich et al., 2011).

Different studies have examined the miR profile in different body fluids such as synovial fluid, serum, plasma or blood cells in an attempt to find new biomarkers for prediction and better treatment of osteoarthritis. Cuadra et al., performed miR expression profiling for 384 miRs in the plasma of patients with OA vs control and found that 12 miRs (in specific, miR-16, miR-20b, miR-29c, miR-30b, miR-93, miR-126, miR-146a, miR-184, miR-186, miR-195, miR-345 and miR-885-5p) are overexpressed in OA patients. *In silico* analyses predicted possible target genes of these miRs that are associated with cartilage homeostasis, and therefore suggested their involvement in OA pathogenesis and their usefulness as disease biomarkers (Borgonio Cuadra et al., 2014).

In another recent study, the expression of miR-146a, miR-155, miR-181a and miR-223 was evaluated by qPCR and was found to be higher in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of OA patients compared to healthy individuals (Okuhara et al., 2012). Moreover, Murata et al., quantified the expression levels of miR-16, miR-132, miR-146a,

miR-155 and miR-223 in the synovial fluid from patients with Rheumatoid Arthritis (RA) and OA and in the plasma from RA, OA patients and healthy controls by RT-PCR. They have shown that miR-16, miR-146a, miR-155 and miR-223 levels in synovial fluid were differentiated expressed between patients with RA and OA (Murata et al., 2010).

A recent work studying miR profile in the synovial fluid found 7 miRs upregulated (in specific, miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-29c-3p, miR-34a-5p and miR-186-5p) in late-stage OA patients compared to early-stage OA patients and miR-378a-5p was identified as the mainly detectable differentially expressed circulating miR in late-stage OA (Li et al., 2016).

Additionally, Beyer et al., used a cohort of 816 patients, which they followed for a period of 15 years and pooled serum from 13 patients, of the 67 in total that had received one or more total joint replacement surgery and from 13 control individuals matched for sex, menopausal status, age and body mass index of the 749 individuals that did not need surgery. They analyzed in these samples the expression profiling of 374 miRs and revealed that 12 of them were differentiated expressed between the two groups. QPCR was conducted for validation of these results in the whole cohort and shown that let-7e, miR-454 and miR-885-5p could serve as potential predictors for severe OA of the knee and hip joints requiring arthroplasty (Beyer et al., 2015).

There is also one study where an animal model of post-traumatic OA by destabilization of medial meniscus (DMM) and a model of inflammatory arthritis by intra-articular injection of methylated-bovine-serum-albumin (AIA) were used for screening circulating miRs expression differences in the different forms of arthritis. Although the authors found two miRs that their expression was significantly altered in the late stage of the disease, they were unable to verify these results by qPCR. Also they did not observe any significant difference between early and progressive post-traumatic OA, and these results led the authors to suggest that circulating serum miRs may not be as useful as potential biomarkers as expected (Kung et al., 2017).

The observed inconsistency of the reported studies, is probably due to the lack of standardized methods. Variances between the results may be attributed to differences in the designing of each study of circulating miR profiling, such as the type of body fluid, the miR extraction method, lack of standard endogenous control, platform used to examine the miR profile (Moldovan et al., 2014) or even the stage of disease (early or late) and the OA phenotype. For instance, when plasma is the selected as the body fluid for the analyses, technical variables like the centrifugation conditions and physiological values or circumstances (white blood cell counts, red blood cell hemolysis) may influence significantly the miR profile, indicating the need for cautious designing of such studies (McDonald et al., 2011).

In general, miR signatures in joint tissues and circulation that were obtained from the above studies are presenting a great variation, except for a few miRs that are common in more than one study. The heterogeneity in approaches and platforms that were used, including the number of miRs that were quantified and the number of samples analyzed, is one possible explanation of the discrepancy. Another major aspect in the high-throughput expression profiling studies is that screening miRs by microarrays and RNA seq requires further validation by qPCR in a bigger cohort (Pritchard et al., 2012). The majority of the above studies have confirmed their data by qPCR. However, the number of samples is restricted and in most cases is the same samples that have been used in the miR profiling assay. Moreover, most of the profiling studies are limited to the identification of an OA miR signature while the biological context of such a signature was not explored. In order to be explored, a few studies have performed a combined analysis where the profiling analysis was accompanied with bioinformatics analysis and/or *in vitro* assays (Diaz-Prado et al. (2012), Iliopoulos et al. (2008), Jones et al. (2009) and Prasad et al. (2016)). The study of Crowe et al. (2016) is of great interest, as they aimed to identify and validate novel miRs by combining data from deep sequencing, computational analysis, mouse models as well as *in vitro* assays. (Crowe et al., 2016).

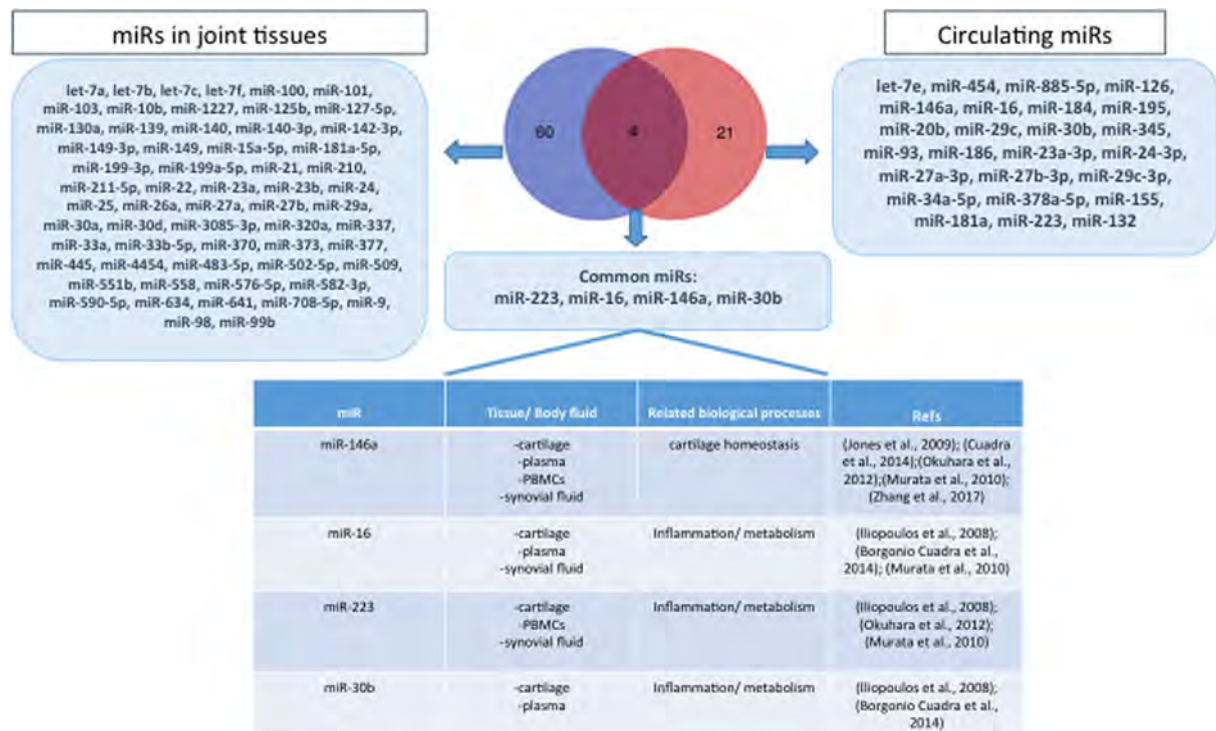


Fig. 1. MiRNAs differentially expressed in osteoarthritis (OA). MiRNAs in joint tissues and in circulation of OA patients. The 4 common miRNAs are highlighted and the processes that these are involved are listed.

Based on the studies reported here –bearing in mind the above mentioned limitations- we graphically present miRNAs differentially expressed in OA patients both in joint tissues as well as in circulation, highlighting the ones in common. We additionally provide information regarding the involvement of these miRNAs in different biological processes, based in studies in OA joint tissues (Fig. 1).

Nevertheless, it is evident that the abundance of information obtained from miR profiling studies in OA should be followed by *in vitro* and *in vivo* studies, firstly for validation but also in order to elucidate the involvement of specific miRNAs in the OA pathogenic pathways. In the following paragraphs we are presenting a collection of studies that performed such assays.

4. Functional experiments in OA

4.1. In vitro assays

There are different approaches to identify miR target genes and to study the biological effects and the signaling pathways that are implicating specific miRNAs in OA. Several technologies including reporter assays, in situ hybridizations, over-expression and silencing technologies, have been developed to elucidate miR function.

In order to confirm the predicted target genes of miR sequences by computational algorithms, mainly luciferase reporter assay methods are used. Another approach for determining miR targets has been to increase or decrease the intracellular concentration of a miR and measure the target gene expression. This is usually performed by transfection of miR mimics and/or inhibitors in chondrocytes cultures. These OA chondrocytes cultures with modulated miRNAs, are contributing to the investigation of the signaling pathways that are implicating specific miRNAs to OA pathogenesis.

In accordance with this approach, Miyaki et al. in 2009 screened for differential expression of miRNAs using microarrays and quantitative PCR in human articular chondrocytes as compared to human mesenchymal stem cells (MSC). This method revealed that miR-140 expression was reduced in OA cartilage and in the same samples expression of

proteinase ADAMTS-5 increased and Col2a1 expression decreased. Using dsRNA mimicking miR-140 in chondrocytes culture showed that miR-140 suppresses ADAMTS-5 mRNA levels, therefore confirming the imbalance of anabolic-catabolic responses in OA and pointing at miR-140 as a potential regulator of this processes (Miyaki et al., 2009).

In a similar study in 2013, researchers using mimic and inhibitor of miR-127-5p identified its importance in regulating the levels of MMP-13 and suggesting a contributing role of their interplay in the pathogenesis of the disease (Park et al., 2013a,b).

MiR-21 was identified in 2014 to be essential for the regulation of the expression of growth differentiation factor 5 (GDF5) in a study that used qPCR combined with gene target analysis with bioinformatics tools and followed by overexpression of miR-21 in human chondrocytes in an *in vitro* functional approach (Zhang et al., 2014).

Overexpression and inhibition were the basic experimental means in another study that revealed that miR-30a specifically binds to the 3'-UTR of Sox-9 and therefore controls extracellular matrix (ECM) degradation *in vitro* but also *in vivo*, as proved by the use of a collagenase-induced osteoarthritis rat model (Chang et al., 2016a).

Nakamura et al. aimed at identifying the role of miRNAs in cartilage degeneration associated with facet joint (FJ) OA. They firstly performed screening of 2100 miRNAs in facet cartilage followed by validation by qPCR analysis and identified miR-181a-5p and miR-4454 to be significantly up-regulated in moderate to severe FJ OA. They then performed further functional studies in FJ OA chondrocytes using miR-181a-5p or miR-4454 mimic or inhibitor. Mimic experiments revealed that both miRNAs are involved in promoting the expression of inflammatory, catabolic, and cell death markers. Furthermore, inhibition of these miRNAs resulted in reversal of this destructive phenotype *in vitro* (Nakamura et al., 2016).

Li and colleagues in 2016 hypothesize that different miRNAs interact in regulating OA related genes, as it is the case for several cancers and cardiovascular diseases. This hypothesis was tested for the first time in an *in vitro* model and revealed the synergistic actions of two miRNAs (miR-29a and miR-140) in controlling the MMP13 and TIMP1 gene expression that regulate ECM expression (Li et al., 2015a,b).

Unlike the last report, in the majority of the *in vitro* studies researchers are focusing in only one miR-one (or few) target(s) mRNA interaction. So, there is a need of broader analytical approaches, combining data from high throughput studies for miRs, mRNAs and proteins using global analysis platforms. Also, more emphasis should be given in the study of the molecular mechanisms that are leading to changes in miRs expression, such as DNA methylation studies, genetic association studies for copy number variations (CNVs) or single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in regions of specific miRs or miR biogenesis genes. Furthermore, there is a lack of meta-analysis studies that could combine data from different miR studies.

Additionally, even though these *in vitro* studies could be rather informative regarding the function specific miRs, they should be accompanied by *in vivo* experiments in order to strengthen the biological relevance of their findings.

4.2 *In vivo* assays

Most of the studies on miR manipulations in *in vivo* animal models have mainly used oligonucleotide-based approaches by inserting an antagomir (microRNA antagonist) to bind and block a specific miR, or a miR mimic in order to increase its levels. These may be delivered by microinjection of miR mimics/inhibitors or by viral infection. Another approach is the use of either transgenic animals that overexpress a specific miR and/or knock-out animals with loss of function of a specific miR.

An example of using viral delivery systems to create a transgenic mouse with manipulated miR expression levels is a study that suggested the role of miR-483-5p in hypertrophy, extracellular matrix degradation, and cartilage angiogenesis during OA development. MiR-483-5p was found up-regulated in OA patients and in the experimental OA mouse model. Intra-articular injection of lentivirus LV3-miR-483-5p and doxycycline-inducible miR-483 transgenic (TG483) mice demonstrated enhanced severity of OA that was induced to the animals by destabilization of the medial meniscus. On the contrary, injection of antago-miR-483-5p improved the symptoms of the experimental OA. Also, these experiments showed that miR-483-5p has cartilage matrix protein matrilin 3 (Matn3) and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (Timp2) as its direct targets (Wang et al., 2017).

Another study showed that overexpression of miR-142-3p by lentiviral delivery in OA mouse model reduced high mobility group Box 1 (HMGB1) expression, NF- κ B signaling, and pro-inflammatory cytokines expression, highlighting a role of miR-142-3p in protecting chondrocytes from apoptosis and inflammation. It was bioinformatics tools that predicted initially the HMGB1 as the target of miR-142-3p followed by dual-luciferase reporter assay confirmation before turning to the animal model (Wang et al., 2016).

In another study, the role of miR-30a and its target Sox-9 in the degradation of ECM in OA was investigated. Firstly, the authors found that the expression of miR-30a was up-regulated and Sox-9 was down-regulated in chondrocytes from OA patients as compared to the chondrocytes of healthy individuals. Similarly with the above mentioned study, luciferase assay confirmed the bioinformatics prediction that Sox-9 is a direct target of miR-30a. Finally, the *in vivo* approach confirmed that intra-articular injection with miR-30a inhibitor reverses the effects of ECM degradation in a collagenase-induced OA rat model (Chang et al., 2016b).

Interestingly, another study showed that miR-210 reduces inflammation by inhibiting NF- κ B pathway. The authors reported that they treated chondrocytes with LPS and showed that expression levels of miR-210 were increased (Zhang et al., 2015a,b). Also, transfection with miR-210 mimic inhibited the expression of pro-inflammatory cytokines. Luciferase activity assay confirmed the bioinformatics prediction that death receptor-6 (DR6) is a direct target of miR-210. Additionally, both miR-210 mimic and DR6 siRNA transfection inhibited NF- κ B signaling. In the OA rat model, that the researchers created by

anterior cruciate ligament transection (ACLT), injection into its articular cavity with miR-210-expressing lentivirus inhibited the expression of cytokines, NF- κ B and DR6 (Zhang et al., 2015a,b).

In a different study it was indicated that miR-370 and miR-373 are involved in OA pathogenesis by targeting SHMT-2 and MECP-2 (genes that are implicated in the DNA methylation process), respectively. The authors showed that introduction of miR-370 or miR-373 into the cartilage of mice that had undergone destabilization of the medial meniscus (DMM) significantly reduced cartilage degradation (Song et al., 2015).

Similarly, Dai et al. reported that the miR-101 inhibitor reduces cartilage degradation when injected into rats' knees with mono-iodoacetate-induced arthritis (MIA). Furthermore, microarray profiling and qPCR revealed that miR-101 inhibition results in deregulation of genes that are involved in the cartilage degradation process (Dai et al., 2015).

Miyaki et al. in a 2010 study created a miR-140 knock out (KO) mouse. The same researchers had previously reported, as we mentioned above, using an *in vitro* approach that MiR-140 is a cartilage specific miR that is expressed in differentiated human articular chondrocytes. In this study, the creation of the miR-140 KO mouse aimed at revealing its role in cartilage development and homeostasis. Interestingly, the miR-140 knock out (KO) mouse developed an age-related OA phenotype. On the contrary, when experimental OA was induced (antigen-induced OA) in transgenic mice overexpressing miR-140 the animals didn't show any abnormalities in their articular cartilage (Miyaki et al., 2010). Moreover, a study published in June 2017 went a step further by injecting intra-articularly miR-140 in rats and reported the alleviation in OA progression by modulating ECM homeostasis, and therefore proposed this approach as a potential therapy for OA (Si et al., 2017).

A recent report also used different mouse models in order to investigate the role of miR-146a in OA development. They showed that the articular cartilage degeneration of miR-146a knockout (KO) mice was less obvious when compared with that of the wild-type mice in spontaneous and instability-induced OA. Also, miR-146a, which is induced by pro-inflammatory cytokines, aggravated suppression of cartilage anabolism. Furthermore, luciferase reporter assay showed that miR-146a targets Camk2d and Ppp3r2, both of which contribute to cartilage homeostasis (Zhang et al., 2017).

Interestingly, Song et al. went into investigating the interplay between miRs and another class of noncoding RNAs, the long noncoding RNAs (lncRNAs) (Song et al., 2014). The exact physiological importance of lncRNAs remains elusive, but several reports have shown that they can modulate the availability of specific miRs that regulate the autophagy pathway implicating them in the pathogenesis of OA (D'Adamo et al., 2017). Song and co-workers introduced miR-21 with lenti-viruses into the cartilage of DMM OA mouse models and demonstrated that this leads to cartilage destruction. This could be reversed by ectopic expression of Growth Arrest-Specific 5 (GAS5) lncRNA and therefore suggested GAS5 as a negative regulator of miR-21 (Song et al., 2014).

All the above studies have shown that the increase or decrease in expression of specific miRs could significantly influence OA onset and/or progression. Therefore, the major gain of the *in vitro* and *in vivo* studies, as the ones mentioned above, is the demonstration of the clinical potential of miRs' expression manipulation (silencing or up-regulating) as an emerging treatment approach.

The overall current situation regarding the experimental schemes so far adopted as well as the future in miR-based diagnosis and therapeutics for OA, as we analyzed here, is graphically represented in Fig. 2.

5. Conclusions

Based on accumulating scientific reports, miRs are presented as attractive molecules to be used as biomarkers for OA diagnosis or/and therapeutic intervention. Especially miRs presence and relatively easy

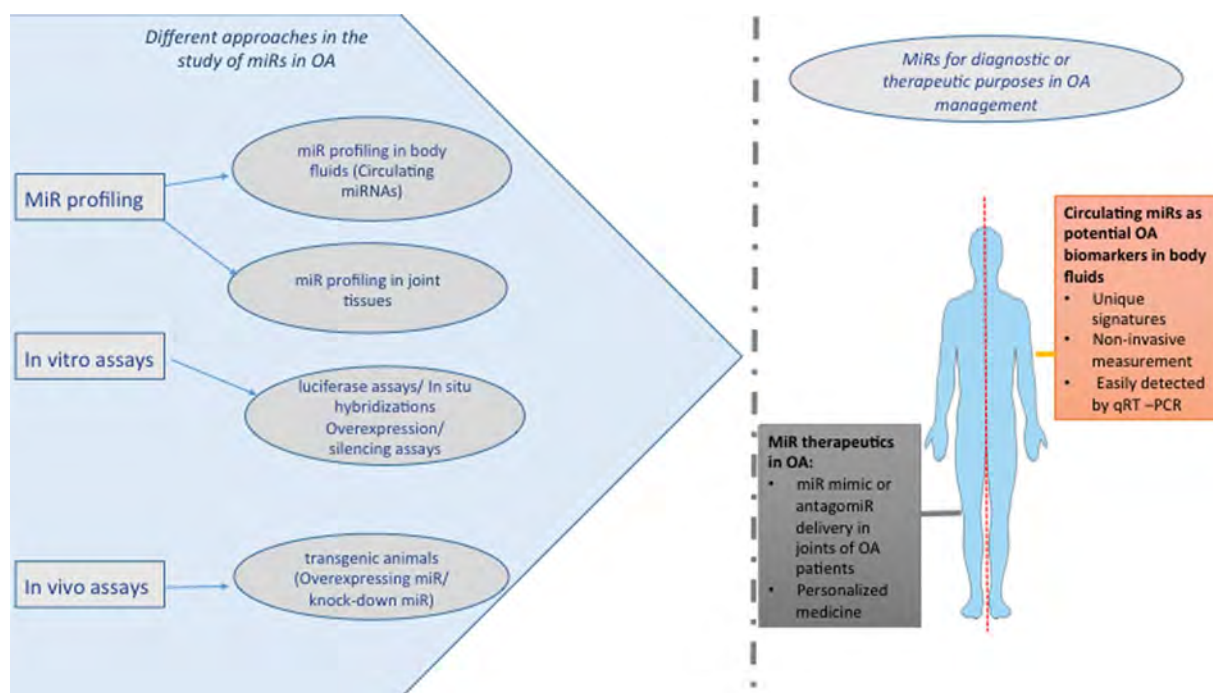


Fig. 2. Experimental approaches for studying miRNAs' biological role aiming towards their use in the clinical management of osteoarthritis (OA).

Different experimental strategies have been developed to study miR biology using molecular and/or bioinformatics techniques. MiR profiling in joint tissues and in body fluids can be conducted with microarray expression profiling, sequencing of miRs or by qRT-PCR. Moreover, the expression of specific miRs can be overexpressed or down-regulated for assessing their effect on potential miR targets that have been predicted by bioinformatics tools. Then miR functions can be examined *in vivo* in disease models by overexpressing or silencing of specific miRs. This experimental scheme is expected to have a great impact on the OA clinical management. Especially circulating miRs can be used as potential biomarkers for OA diagnosis, whereas manipulation of their expression could be used for the development of novel miR-based therapeutic approaches.

measurement in biological fluids, is increasing both their diagnostic power as well as their disease progress monitoring ability. Also, based on the fact that miRs can regulate the expression of several target-genes, and providing that knowledge will accumulate towards the better understanding of these interactions' impact on the etiopathology of OA, overexpressing or down-regulating a specific miR could prove of highly therapeutic impact.

To date, according to ClinicalTrials.gov (<http://clinicaltrials.gov>), there are only three human clinical trials (NCT02555514, NCT02905864 and NCT02931344) that are using miRs as biomarkers in knee OA and there are no clinical trials testing miRs as therapeutic agents. It is therefore evident, that although increasing knowledge for miRs is accumulating, there are several obstacles to overcome before applying this knowledge to clinical trials.

But actually, based on the literature surveyed here, it is not unrealistic to predict that it is only a matter of (relatively short) time until a clear miRs expression profile for osteoarthritis is established, which will prove powerful for disease identification in early stages. On the contrary, further functional studies are needed, in order to elucidate a) if the identified, by expression profiling analyses, changes in expression of miRs form part of a causal network, or if they are merely consequences of the disease, and b) identify the specific miR and target-mRNA interplay(s), as well as the exact biological pathways that these interplays regulate. Furthermore, emphasis should be given in clarifying the, yet rather obscure, complex miRs regulation, both at the transcriptional (gene expression) and posttranscriptional level (miR processing) which will allow directed manipulation of miRs expression and therefore pave the way towards personalized therapeutics for this age-related disease.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

EN is a fellow of the Excellence IKY/SIEMENS grant scheme.

References

- Akhtar, N., Haqqi, T.M., 2012. MicroRNA-199a* regulates the expression of cyclooxygenase-2 in human chondrocytes. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 1073–1080. <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200519>.
- Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogoseva-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., Tait, J.F., Tewari, M., 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5003–5008. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1019055108>.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116 (2), 281–297. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5).
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>.
- Beyer, C., Zampetaki, A., Lin, N.-Y., Kleyer, A., Perricone, C., Iagnocco, A., Distler, A., Langley, S.R., Gelse, K., Sesselmann, S., Lorenzini, R., Niemeier, A., Swoboda, B., Distler, J.H.W., Santer, P., Egger, G., Willeit, J., Mayr, M., Schett, G., Kiechl, S., 2015. Signature of circulating microRNAs in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 74 <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204698>. e18–e18.
- Bijlsma, J.W.J., Berenbaum, F., Laffey, F.P.J.G., 2011. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 377, 2115–2126. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60243-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60243-2).
- Blanco, F.J., Guitian, R., Vázquez-Martul, E., de Toro, F.J., Galdo, F., 1998. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis: a possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* 41, 284–289. [10.1002/1529-0131\(199802\)41:2<284::AID-ART12>3.0.CO;2-T](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(199802)41:2<284::AID-ART12>3.0.CO;2-T).
- Borgonio Cuadra, V.M., González-Huerta, N.C., Romero-Córdoba, S., Hidalgo-Miranda, A., Miranda-Duarte, A., 2014. Altered expression of circulating MicroRNA in plasma of patients with primary osteoarthritis and *In silico* analysis of their pathways. *PLoS One* 9, e97690. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097690>.
- Carosino, A.M., Recenti, R., Carosino, R., Piscitelli, E., Gozzini, A., Martinetti, V., Mavilia, C., Franchi, A., Danielli, D., Aglietti, P., Ciardullo, A., Galli, G., Tognarini, I., Moggi Pignone, A., Cagnoni, M., Brandi, M.L., 2007. Methodological models for *in vitro* amplification and maintenance of human articular chondrocytes from elderly patients. *Biogerontology* 8, 483–498. <http://dx.doi.org/10.1007/s10522-007-9088-4>.
- Chang, T., Xie, J., Li, H., Li, D., Liu, P., Hu, Y., 2016a. MicroRNA-30a promotes extracellular matrix degradation in articular cartilage via downregulation of Sox9. *Cell Prolif.* 49, 207–218. <http://dx.doi.org/10.1111/cpr.12246>.

- Chang, T., Xie, J., Li, H., Li, D., Liu, P., Hu, Y., 2016b. MicroRNA-30a promotes extracellular matrix degradation in articular cartilage via downregulation of Sox9. *Cell Prolif.* 49, 207–218. <http://dx.doi.org/10.1111/cpr.12246>.
- Chen, H., Tian, Y., 2017. MiR-15a-5p regulates viability and matrix degradation of human osteoarthritis chondrocytes via targeting VEGFA. *Biosci. Trends* 10, 482–488. <http://dx.doi.org/10.5582/bst.2016.01187>.
- Chen, L.H., Chiou, G.Y., Chen, Y.W., Li, H.Y., Chiou, S.H., 2010. MicroRNA and aging: a novel modulator in regulating the aging network. *Ageing Res. Rev. (Suppl. 1)*, S59–S66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2010.08.002>.
- Crowe, N., Swingle, T.E., Le, L.T.T., Barter, M.J., Wheeler, G., Pais, H., Donell, S.T., Young, D.A., Dalmay, T., Clark, I.M., 2016. Detecting new microRNAs in human osteoarthritis chondrocytes identifies miR-3085 as a human, chondrocyte-selective, microRNA. *Osteoarthritis Cartil.* 24, 534–543. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2015.10.002>.
- D'Adamo, S., Cetrullo, S., Minguzzi, M., Silvestri, Y., Borzì, R.M., Flamigni, F., 2017. MicroRNAs and autophagy: fine players in the control of chondrocyte homeostatic activities in osteoarthritis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* <http://dx.doi.org/10.1155/2017/3720128>. Article ID 3720128.
- Dai, L., Zhang, X., Hu, X., Liu, Q., Man, Z., Huang, H., Meng, Q., Zhou, C., Ao, Y., 2015. Silencing of miR-101 prevents cartilage degradation by regulating extracellular matrix-related genes in a rat model of osteoarthritis. *Mol. Ther.* 23, 1331–1340. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2015.61>.
- Díaz-Prado, S., Cicione, C., Muñiz-Lopez, E., Hermida-Gomez, T., Oreiro, N., Fernandez-Lopez, C., Blanco, F.J., 2012. Characterization of microRNA expression profiles in normal and osteoarthritic human chondrocytes. *BMC Musculoskelet. Disord.* 13, 144. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2474-13-144>.
- Dimmeler, S., Nicotera, P., 2013. MicroRNAs in age-related diseases. *EMBO Mol. Med.* 5 (2), 180–190. <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201201986>.
- Evangelou, E., Valdes, A.M., Kerkhof, H.J.M., Stykarsdottir, U., Zhu, Y., Meulenbelt, I., Lories, R.J., Karassa, F.B., Tykzanowski, P., Bos, S.D., Akune, T., Arden, N.K., Carr, A., Chapman, K., Cupples, L.A., Dai, J., Deloukas, P., Doherty, M., Doherty, S., Engstrom, G., Gonzalez, A., Halldorsdottir, B.V., Hammond, C.L., Hart, D.J., Helgadóttir, H., Hofman, A., Ikegawa, S., Ingvarsson, T., Jiang, Q., Jonsson, H., Kaprio, J., Kawaguchi, H., Kisan, K., Kloppenburg, M., Kujala, U.M., Lohmander, L.S., Loughlin, J., Luyten, F.P., Mabuchi, A., McCaskie, A., Nakajima, M., Nilsson, P.M., Nishida, N., Ollier, W.E.R., Panoutsopoulou, K., van de Putte, T., Ralston, S.H., Rivadeneira, F., Saarela, J., Schulte-Merker, S., Shi, D., Slagboom, P.E., Sudo, A., Tamm, A., Tamm, A., Thorleifsson, G., Thorsteinsdottir, U., Tsezou, A., Wallis, G.A., Wilkinson, J.M., Yoshimura, N., Zeggini, E., Zhai, G., Zhang, F., Jonsdottir, I., Uitterlinden, A.G., Felson, D.T., van Meurs, J.B., Stefansson, K., Ioannidis, J.P.A., Spector, T.D., Spector, T.D., 2011. Translation Research in Europe Applied Technologies for Osteoarthritis (TreatOA), meta-analysis of genome-wide association studies confirms a susceptibility locus for knee osteoarthritis on chromosome 7q22. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 349–355. <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2010.132787>.
- Glyn-Jones, S., Palmer, A.J.R., Agricola, R., Price, A.J., Vincent, T.L., Weinans, H., Carr, A.J., 2015. Osteoarthritis. *Lancet* 386, 376–387. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60802-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60802-3).
- Goldring, M.B., Otero, M., 2011. Inflammation in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 23, 471–478. <http://dx.doi.org/10.1097/BOR.0b013e328349c2b1>.
- Hackl, M., Heilmeyer, U., Weiler, S., Grillari, J., 2016. Circulating microRNAs as novel biomarkers for bone diseases – complex signatures for multifactorial diseases? *Mol. Cell. Endocrinol.* 432, 83–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.10.015>.
- Hashimoto, S., Ochs, R.L., Komiya, S., Lotz, M., 1998a. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 41, 1632–1638. [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(199809\)41:9 < 1632::AID-ART14 > 3.0.CO;2-A](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(199809)41:9 < 1632::AID-ART14 > 3.0.CO;2-A).
- Hashimoto, S., Ochs, R.L., Rosen, F., Quach, J., McCabe, G., Solan, J., Seegmiller, J.E., Terkeltaub, R., Lotz, M., 1998b. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3094–3099.
- Hoefig, K.P., Heissmeyer, V., 2010. Measuring microRNA expression in size-limited FACS-sorted and microdissected samples. *Methods Mol. Biol.* 667, 47–63. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-811-9_4.
- Ibáñez-Ventoso, C., Yang, M., Guo, S., Robins, H., Padgett, R.W., Driscoll, M., 2006. Modulated microRNA expression during adult lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5, 235–246. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00210.x>.
- Iliopoulos, D., Malizos, K.N., Oikonomou, P., Tsezou, A., 2008. Integrative MicroRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS One* 3. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003740>.
- Jeon, O.H., Kim, C., Laberge, R.M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A.P., Chung, J.W., Kim, D.H., Poon, Y., David, N., Baker, D.J., Van Deursen, J.M., Campisi, J., Elisei, J.H., 2017. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat. Med.* 23, 775–781. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4324>.
- Jin, L., Zhao, J., Jing, W., Yan, S., Wang, X., Xiao, C., Ma, B., 2014. Role of miR-146a in human chondrocyte apoptosis in response to mechanical pressure injury in vitro. *Int. J. Mol. Med.* 34, 451–463. <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2014.1808>.
- Jin, R., Shen, M., Yu, L., Wang, X., Lin, X., 2017. Adipose-derived stem cells suppress inflammation induced by IL-1 β through down-regulation of P2 $\times$ 7R mediated by miR-373 in chondrocytes of osteoarthritis. *Mol. Cells* 40, 222–229. <http://dx.doi.org/10.14348/molcells.2017.2314>.
- Jones, S.W., Watkins, G., Le Good, N., Roberts, S., Murphy, C.L., Brockbank, S.M.V., Needham, M.R.C., Read, S.J., Newham, P., 2009. The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF- α and MMP13. *Osteoarthritis Cartil.* 17, 464–472. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2008.09.012>.
- Kobayashi, T., Lu, J., Cobb, B.S., Rodda, S.J., McMahon, A.P., Schipani, E., Merckenschlager, M., Kronenberg, H.M., 2008. Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1949–1954. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0707900105>.
- Kostopoulou, F., Malizos, K.N., Papathanasiou, I., Tsezou, A., 2015. MicroRNA-33a regulates cholesterol synthesis and cholesterol efflux-related genes in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* 17, 42. <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-015-0556-y>.
- Krzeszinski, J.Y., Wei, W., Huynh, H., Jin, Z., Wang, X., Chang, T.C., Xie, X.J., He, L., Mangala, L.S., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K., Mendell, J.T., Wan, Y., 2014. MiR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgfr2. *Nature* 512, 431–435. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13375>.
- Kung, L.H.W., Zaki, S., Ravi, V., Rowley, L., Smith, M.M., Bell, K.M., Bateman, J.F., Little, C.B., 2017. Utility of circulating serum miRNAs as biomarkers of early cartilage degeneration in animal models of post-traumatic osteoarthritis and inflammatory arthritis. *Osteoarthritis Cartil.* 25, 426–434. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2016.09.002>.
- Le, L.T.T., Swingle, T.E., Clark, I.M., 2013. Review: the role of MicroRNAs in osteoarthritis and chondrogenesis. *Arthritis Rheum.* 65, 1963–1974. <http://dx.doi.org/10.1002/art.37990>.
- Leidinger, P., Backes, C., Deutscher, S., Schmitt, K., Mueller, S.C., Frese, K., Haas, J., Ruprecht, K., Paul, F., Stähler, C., Lang, C.J., Meder, B., Bartfai, T., Meese, E., Keller, A., 2013. A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. *Genome Biol.* 14, R78. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2013-14-7-r78>.
- Lemey, C., Milharet, O., Lemaître, J.-M., 2015. iPSCs as a major opportunity to understand and cure age-related diseases. *Biogerontology* 16, 399–410. <http://dx.doi.org/10.1007/s10522-015-9579-7>.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>.
- Li, H., Wang, Z., Fu, Q., Zhang, J., 2014. Plasma miRNA levels correlate with sensitivity to bone mineral density in postmenopausal osteoporosis patients. *Biomarkers* 19, 553–556. <http://dx.doi.org/10.3109/1354750X.2014.935957>.
- Li, X., Zhen, Z., Tang, G., Zheng, C., Yang, G., 2015a. MiR-29a and miR-140 protect chondrocytes against the anti-proliferation and cell matrix signaling changes by IL-1 β . *Mol. Cells* 39, 103–110. <http://dx.doi.org/10.14348/molcells.2016.2179>.
- Li, Z.-C., Han, N., Li, X., Li, G., Liu, Y.-Z., Sun, G.-X., Wang, Y., Chen, G.-T., Li, G.-F., 2015b. Decreased expression of microRNA-130a correlates with TNF- α in the development of osteoarthritis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 2555–2564.
- Li, Y.-H., Tavallae, G., Tokar, T., Nakamura, A., Sundararajan, K., Weston, A., Sharma, A., Mahomed, N.N., Gandhi, R., Jurisica, I., Kapoor, M., 2016. Identification of synovial fluid microRNA signature in knee osteoarthritis: differentiating early- and late-stage knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartil.* 24, 1577–1586. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2016.04.019>.
- Lotz, M., Hashimoto, S., Kühn, K., 1999. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartil.* 7, 389–391. <http://dx.doi.org/10.1053/joca.1998.0220>.
- Makki, M.S., Haqqi, T.M., 2015. miR-139 Modulates MCP1/IL-6 expression and induces apoptosis in human OA chondrocytes. *Exp. Mol. Med.* 47, e189. <http://dx.doi.org/10.1038/emmm.2015.66>.
- Margis, R., Margis, R., Rieder, C.R.M., 2011. Identification of blood microRNAs associated to Parkinson's disease. *J. Biotechnol.* 152, 96–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.023>.
- Martin, J.A., Klingelutz, A.J., Moussavi-Harami, F., Buckwalter, J.A., 2004. Effects of oxidative damage, and telomerase activity on human articular cartilage chondrocyte senescence. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 59, 324–337.
- McDonald, J.S., Milosevic, D., Reddi, H.V., Grebe, S.K., Algacir-Schminich, A., 2011. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin. Chem.* 57, 833–840. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2010.157198>.
- Mimura, S., Iwama, H., Kato, K., Nomura, K., Kobayashi, M., Yoneyama, H., Miyoshi, H., Tani, J., Morishita, A., Himoto, T., Deguchi, A., Nomura, T., Sakamoto, T., Fujita, K., Maeda, E., Izuishi, K., Okano, K., Suzuki, Y., Masaki, T., 2014. Profile of microRNAs associated with aging in rat liver. *Int. J. Mol. Med.* 34, 1065–1072. <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2014.1892>.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogoda-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Notoboom, J., O'Brian, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.K., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M., 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 10513–10518. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0804549105>.
- Miyaki, S., Nakasa, T., Otsuki, S., Grogan, S.P., Higashiyama, R., Inoue, A., Kato, Y., Sato, T., Lotz, M.K., Asahara, H., 2009. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis Rheum.* 60, 2723–2730. <http://dx.doi.org/10.1002/art.24745>.
- Miyaki, S., Sato, T., Inoue, A., Otsuki, S., Ito, Y., Yokoyama, S., Kato, Y., Takemoto, F., Nakasa, T., Yamashita, S., Takada, S., Lotz, M.K., Ueno-Kudo, H., Asahara, H., 2010. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev.* 24, 1173–1185. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1915510>.
- Moldovan, L., Batte, K.E., Trgovcich, J., Wisler, J., Marsh, C.B., Piper, M., 2014. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 371–390. <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12236>.
- Mori, M.A., Raghavan, P., Thomou, T., Boucher, J., Robida-Stubbs, S., MacOtel, Y., Russell, S.J., Kirkland, J.L., Blackwell, T.K., Kahn, C.R., 2012. Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metab.* 16, 336–347. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.017>.
- Murata, K., Yoshitomi, H., Tanida, S., Ishikawa, M., Nishitani, K., Ito, H., Nakamura, T., 2010. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 12, R86. [http://dx.doi.org/10.1186/](http://dx.doi.org/10.1186/10.1186/)

- ar3013.
- Nakamura, A., Rampersaud, Y.R., Sharma, A., Lewis, S.J., Wu, B., Datta, P., Sundararajan, K., Endisha, H., Rossomacha, E., Rockel, J.S., Jurisica, I., Kapoor, M., 2016. Identification of microRNA-181a-5p and microRNA -4454 as mediators of facet cartilage degeneration. *JCI Insight* 1. <http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.86820>.
- Neogi, T., Zhang, Y., 2013. Epidemiology of OA. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 39, 1–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rdc.2012.10.004>.
- Okoro, T., Morrison, V., Maddison, P., Lemmey, A.B., Andrew, J.G., 2013. An assessment of the impact of behavioural cognitions on function in patients partaking in a trial of early home-based progressive resistance training after total hip replacement. *Disabil. Rehabil.* 35, 2000–2007. <http://dx.doi.org/10.3109/09638288.2013.770082>.
- Okuhara, A., Nakasa, T., Shibuya, H., Niimoto, T., Adachi, N., Deie, M., Ochi, M., 2012. Changes in microRNA expression in peripheral mononuclear cells according to the progression of osteoarthritis. *Mod. Rheumatol.* 22, 446–457. <http://dx.doi.org/10.1007/s10165-011-0536-2>.
- Park, S.J., Cheon, E.J., Kim, H.A., 2013a. MicroRNA-558 regulates the expression of cyclooxygenase-2 and IL-1 β -induced catabolic effects in human articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 21, 981–989. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2013.04.012>.
- Park, S.J., Cheon, E.J., Lee, M.H., Kim, H.A., 2013b. MicroRNA-127-5p regulates matrix metalloproteinase 13 expression and interleukin-1 β -induced catabolic effects in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 65, 3141–3152. <http://dx.doi.org/10.1002/art.38188>.
- Pimentel, F., Bonilla, P., Ravishanker, Y.G., Contag, A., Gopal, N., LaCour, S., Lee, T., Niemz, A., 2015. Technology in MicroRNA profiling: circulating MicroRNAs as noninvasive cancer biomarkers in Breast cancer. *J. Lab. Autom.* 20, 574–588. <http://dx.doi.org/10.1177/2211068214561788>.
- Prasad, I., Batra, J., Perry, S., Gu, W., Crawford, R., Xiao, Y., 2016. Systematic identification, characterization and target gene analysis of microRNAs involved in osteoarthritis subchondral bone pathogenesis. *Calcif. Tissue Int.* 99, 43–55. <http://dx.doi.org/10.1007/s00223-016-0125-7>.
- Price, J.S., Waters, J.G., Darrah, C., Pennington, C., Edwards, D.R., Donell, S.T., Clark, I.M., 2002. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* 1, 57–65. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1474-9728.2002.00008.x>.
- Pritchard, C.C., Cheng, H.H., Tewari, M., 2012. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat. Rev. Genet.* 13, 358–369. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3198>.
- Santini, P., Politi, L., Vedova, P.D., Scandurra, R., Scotto d'Abusco, A., 2014. The inflammatory circuitry of miR-149 as a pathological mechanism in osteoarthritis. *Rheumatol. Int.* 34, 711–716. <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-013-2754-8>.
- Scanzello, C.R., 2017. Chemokines and inflammation in osteoarthritis: insights from patients and animal models. *J. Orthop. Res.* 35, 735–739. <http://dx.doi.org/10.1002/jor.23471>.
- Scharstuhl, A., Schewe, B., Benz, K., Gaissmaier, C., Böhning, H.-J., Stoop, R., 2007. Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology. *Stem Cells* 25, 3244–3251. <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2007-0300>.
- Si, H.B., Zeng, Y., Liu, S.Y., Zhou, Z.K., Chen, Y.N., Cheng, J.Q., Lu, Y.R., Shen, B., 2017. Intra-articular injection of microRNA-140 (miRNA-140) alleviates osteoarthritis (OA) progression by modulating extracellular matrix (ECM) homeostasis in rats. *Osteoarthr. Cartil.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2017.06.002>.
- Song, J., Ahn, C., Chun, C.-H., Jin, E.-J., 2014. A long non-coding RNA, GAS5, plays a critical role in the regulation of miR-21 during osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* 32, 1628–1635. <http://dx.doi.org/10.1002/jor.22718>.
- Song, J., Kim, D., Chun, C.-H., Jin, E.-J., 2015. miR-370 and miR-373 regulate the pathogenesis of osteoarthritis by modulating one-carbon metabolism via SHMT-2 and MECP-2, respectively. *Aging Cell* 14, 826–837. <http://dx.doi.org/10.1111/accel.12363>.
- Swingler, T.E., Wheeler, G., Carmont, V., Elliott, H.R., Barter, M.J., Abu-Elmagd, M., Donell, S.T., Boot-Handford, R.P., Hajihosseini, M.K., Münsterberg, A., Dalmay, T., Young, D.A., Clark, I.M., 2012. The expression and function of microRNAs in chondrogenesis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 64, 1909–1919. <http://dx.doi.org/10.1002/art.34314>.
- Tacutu, R., Budovsky, A., Yanai, H., Fraifeld, V.E., 2011. Molecular links between cellular senescence, longevity and age-related diseases – a systems biology perspective. *Aging (Albany, NY)* 3, 1178–1191. <http://dx.doi.org/10.18632/aging.100413>.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., Burwinkel, B., 2011. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 39, 7223–7233 [gkr254 [pii] r10.1093/nar/gkr254].
- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., Remaley, A.T., 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* 13, 423–435. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2210>.
- Vijayan, M., Reddy, P.H., 2016. Peripheral biomarkers of stroke: focus on circulatory microRNAs. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* 1862 (10), 1984–1993. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2016.08.003>.
- Wang, G.-K., Zhu, J.-Q., Zhang, J.-T., Li, Q., Li, Y., He, J., Qin, Y.-W., Jing, Q., 2010. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur. Heart J.* 31, 659–666. <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehq013>.
- Wang, X., Guo, B., Li, Q., Peng, J., Yang, Z., Wang, A., Li, D., Hou, Z., Lv, K., Kan, G., Cao, H., Wu, H., Song, J., Pan, X., Sun, Q., Ling, S., Li, Y., Zhu, M., Zhang, P., Peng, S., Xie, X., Tang, T., Hong, A., Bian, Z., Bai, Y., Lu, A., Li, Y., He, F., Zhang, G., Li, Y., 2013. MiR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat. Med.* 19, 93–100. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3026>.
- Wang, X., Guo, Y., Wang, C., Yu, H., Yu, X., Yu, H., 2016. MicroRNA-142-3p inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting HMGB1. *Inflammation* 39, 1718–1728. <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-016-0406-3>.
- Wang, H., Zhang, H., Sun, Q., Wang, Y., Yang, J., Yang, J., Zhang, T., Luo, S., Wang, L., Jiang, Y., Zeng, C., Cai, D., Bai, X., 2017. Intra-articular delivery of antago-miR-483-5p inhibits osteoarthritis by modulating matrilin 3 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Mol. Ther.* 25, 715–727. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jymthe.2016.12.020>.
- Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., Huang, K.H., Lee, M.J., Galas, D.J., Wang, K., 2010. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.* 56, 1733–1741. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>.
- Williams, J., Smith, F., Kumar, S., Vijayan, M., Reddy, P.H., 2017. Are microRNAs true sensors of ageing and cellular senescence? *Ageing Res. Rev.* 35, 350–363. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2016.11.008>.
- Xu, M., Bradley, E.W., Weivoda, M.M., Hwang, S.M., Pirtskhalava, T., Decklever, T., Curran, G.L., Ogronik, M., Jurk, D., Johnson, K.O., Lowe, V., Tchkonja, T., Westendorf, J.J., Kirkland, J.L., 2017. Transplanted senescent cells induce an osteoarthritis-like condition in mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 72, 780–785. <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/glw154>.
- You, L., Pan, L., Chen, L., Gu, W., Chen, J., 2016. MiR-27a is essential for the shift from osteogenic differentiation to adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in postmenopausal osteoporosis. *Cell. Physiol. Biochem.* 39, 253–265. <http://dx.doi.org/10.1159/000445621>.
- Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Koppel, T., Jhantigh, M.N., Lutgens, E., Wang, S., Olson, E.N., Schöber, A., Weber, C., 2009. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci. Signal.* 2 <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2000610>. ra81-ra81.
- Zhai, X., Meng, R., Li, H., Li, J., Jing, L., Qin, L., Gao, Y., 2017. MiR-181a modulates chondrocyte apoptosis by targeting glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein (GPD1L) in osteoarthritis. *Med. Sci. Monit.* 23, 1224–1231.
- Zhang, Y., Jia, J., Yang, S., Liu, X., Ye, S., Tian, H., 2014. MicroRNA-21 controls the development of osteoarthritis by targeting GDF-5 in chondrocytes. *Exp. Mol. Med.* 46, e79. <http://dx.doi.org/10.1038/emmm.2013.152>.
- Zhang, D., Cao, X., Li, J., Zhao, G., 2015a. MiR-210 inhibits NF- κ B signaling pathway by targeting DR6 in osteoarthritis. *Sci. Rep.* 5, 12775. <http://dx.doi.org/10.1038/srep12775>.
- Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., Mi, S., 2015b. Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinf.* 13 (1), 17–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>.
- Zhang, G., Sun, Y., Wang, Y., Liu, R., Bao, Y., Li, Q., 2016. MiR-502-5p inhibits IL-1 β -induced chondrocyte injury by targeting TRAF2. *Cell. Immunol.* 302, 50–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.01.007>.
- Zhang, X., Wang, C., Zhao, J., Xu, J., Geng, Y., Dai, L., Huang, Y., Fu, S.-C., Dai, K., Zhang, X., 2017. miR-146a Facilitates osteoarthritis by regulating cartilage homeostasis via targeting Camk2d and Ppp3r2. *Cell. Death. Dis.* 8, e2734. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2017.146>.
- Zhou, H.W., Lou, S.Q., Zhang, K., 2004. Recovery of function in osteoarthritis chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA in vitro. *Rheumatology* 43, 555–568. <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/keh127>.

RESEARCH

Open Access



Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes

E. Ntounou¹, M. Tzetis², M. Braoudaki^{2,3,4}, G. Lambrou^{3,4}, M. Poulou², K. Malizos⁵, N. Stefanou⁵,
L. Anastasopoulou¹ and A. Tsezou^{1,6*}

Abstract

Background: MicroRNAs (miRNAs) in circulation have emerged as promising biomarkers. In this study, we aimed to identify a circulating miRNA signature for osteoarthritis (OA) patients and in combination with bioinformatics analysis to evaluate the utility of selected differentially expressed miRNAs in the serum as potential OA biomarkers.

Methods: Serum samples were collected from 12 primary OA patients, and 12 healthy individuals were screened using the Agilent Human miRNA Microarray platform interrogating 2549 miRNAs. Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were constructed to evaluate the diagnostic performance of the deregulated miRNAs. Expression levels of selected miRNAs were validated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in all serum and in articular cartilage samples from OA patients ($n = 12$) and healthy individuals ($n = 7$). Bioinformatics analysis was used to investigate the involved pathways and target genes for the above miRNAs.

Results: We identified 279 differentially expressed miRNAs in the serum of OA patients compared to controls. Two hundred and five miRNAs (73.5%) were upregulated and 74 (26.5%) downregulated. ROC analysis revealed that 77 miRNAs had area under the curve (AUC) > 0.8 and $p < 0.05$. Bioinformatics analysis in the 77 miRNAs revealed that their target genes were involved in multiple signaling pathways associated with OA, among which FoxO, mTOR, Wnt, p13K/akt, TGF- β signaling pathways, ECM-receptor interaction, and fatty acid biosynthesis. qRT-PCR validation in seven selected out of the 77 miRNAs revealed 3 significantly downregulated miRNAs (hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-671-3p, and hsa-miR-140-3p) in the serum of OA patients, which were in silico predicted to be enriched in pathways involved in metabolic processes. Target-gene analysis of hsa-miR-140-3p, hsa-miR-33b-3p, and hsa-miR-671-3p revealed that *InsR* and *IGF1R* were common targets of all three miRNAs, highlighting their involvement in regulation of metabolic processes that contribute to OA pathology. Hsa-miR-140-3p and hsa-miR-671-3p expression levels were consistently downregulated in articular cartilage of OA patients compared to healthy individuals.

Conclusions: A serum miRNA signature was established for the first time using high density resolution miR-arrays in OA patients. We identified a three-miRNA signature, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-671-3p, and hsa-miR-33b-3p, in the serum of OA patients, predicted to regulate metabolic processes, which could serve as a potential biomarker for the evaluation of OA risk and progression.

Keywords: Biomarker, Circulating miRNAs, Hsa-miR-140-3p, Hsa-miR-33b-3p, Hsa-miR- 671-3p, Metabolic, miR-array, Osteoarthritis

* Correspondence: atsezou@med.uth.gr

¹Laboratory of Cytogenetics and Molecular Genetics, Faculty of Medicine, Biopolis, University of Thessaly, 41500 Larissa, Greece

⁶Department of Biology, Faculty of Medicine, University of Thessaly, Larissa, Greece

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Osteoarthritis (OA) is the most common chronic degenerative joint disease and a leading cause of pain and disability. Its prevalence is steadily increasing and is expected to be the greatest cause of disability by 2030 [1]. OA is defined as a heterogeneous disease consisting of a group of distinct joint disorders with common biological, morphological, and clinical outcomes [2]. To date, several risk factors, including aging, obesity, sex, joint injury, and heredity have been implicated in disease development and progression [3, 4]. Recently, an association has been suggested between OA and metabolic syndrome or metabolic risk factors, as hypertension, overweight, dyslipidemia, and insulin resistance, and a new OA subtype, metabolic OA, has been introduced [5–7]. As the above metabolic factors can be modified, it becomes evident that understanding the molecular mechanisms which are involved in OA pathogenesis is essential for the discovery of OA personalized therapies. However, until now, despite the significant burden that OA imposes in patients and in healthcare systems [8], there is absence of effective non-arthroplasty treatment options for disease management. One major challenge for the development of effective therapy for OA is the detection of the disease at an early stage. To date, the standard method for disease diagnosis and severity is the radiograph, which appears to be limited to detection in late disease stages and has weakness in monitoring disease progression [9]. Therefore, the identification of non-invasive and sensitive serum biomarkers will assist OA diagnosis, prognosis, and early treatment before the onset of radiographic findings.

MicroRNAs (miRNAs) are a novel group of universally present small non-coding RNAs, approximately 22–28 nucleotides in length, which regulate gene expression at the post-transcriptional level through mRNA degradation or translational repression. Each miRNA can regulate a large number of genes by binding mainly to the 3'UTR of mRNA targets [10]. Recent studies have implicated miRNAs as promising clinical biomarkers in various diseases including cancer, diabetes, and cardiovascular disease [11–14]. MiRNAs have also been associated with processes involved in OA pathogenesis, such as cartilage homeostasis, extracellular matrix regulation, endochondral ossification, bone metabolism, apoptosis, autophagy, inflammation, and lipid metabolism [15, 16]. Our group was among the pioneers to suggest the involvement of miRNAs in OA pathogenesis by demonstrating the differential expression of 16 miRNAs in OA compared to healthy articular cartilage [17].

Recently, the use of microarrays for the global characterization of miRNA expression profiling is becoming a strong research tool that provides useful information on the pathogenesis of many diseases [12]. Several microRNA profiling studies have been performed in different

OA tissues and have led to the identification of numerous differentially expressed miRNAs between OA joint tissues and controls [17, 18]. However, in the majority of these studies, the number of miRNAs tested was limited, ranging from 157 to 723 miRNAs, compared to 2588 mature miRs recently released from the Sanger Institute and University of Manchester miRbase (release June 2014) allowing for many more miRNAs to be identified [19].

Moreover, miRNAs have been discovered in circulation, however, the origin and the biological functions of the circulating miRNAs in a disease remain poorly understood. Evidence suggests that circulating miRNAs could be transferred in the circulation through microvesicles, exosomes, Ago protein complexes, or HDL and that they are either byproducts of the cellular content or are mediating the inter-cellular signaling reflecting the pathophysiological state of the cell [20–23]. Alterations in their expression levels in abnormal conditions along with their stability in circulation and surprisingly long half-life of approximately 5 days in plasma [24] have implicated them as attractive molecules for disease prognosis and/or progression [11]. Circulating miRNAs have been demonstrated as important biomarkers in many diseases, as diabetes type II [25] metabolic syndrome [26] Alzheimer's, hypertension, osteoporosis, Parkinson's disease, and cancer [12]. Recently, a limited number of studies highlighted the role of circulating miRNAs as potential biomarkers for assessment of prognosis and/or progression in osteoarthritis [23, 27, 28]. However, a systematic analysis of serum miRNA profiling in osteoarthritis has not yet been performed.

In the present study, we performed miRNA profiling using high-density miRNA-arrays in serum of OA patients and in combination with bioinformatics analysis evaluated the utility of selected differentially expressed miRNAs as potential OA biomarkers.

Methods

Patient samples

Serum samples were collected from 12 patients with primary OA (9 females, 3 males, ages 69.83 ± 4.83 years) undergoing total knee replacement surgery at the Orthopaedics Department of the University Hospital of Larissa. Radiographs were obtained before surgery and were graded using the Kellgren-Lawrence system according to the following criteria: grade 1 (doubtful narrowing of joint space and possible osteophytes), grade 2 (definite osteophytes and possible narrowing of joint space), grade 3 (moderate multiple osteophytes, definite narrowing of joint space and some sclerosis, and possible deformity of bone ends), and grade 4 (large osteophytes, marked narrowing of joint space, severe sclerosis, and definite deformity of bone ends). All OA patients had a Kellgren-Lawrence grade ≥ 3 . The assessment of the radiographs by two independent expert observers was blinded. Patients

with rheumatoid arthritis and other autoimmune disease as well as chondrodysplasias, infection-induced OA, and post-traumatic OA were excluded from the study. As controls, serum samples were obtained from 12 healthy individuals (6 females, 6 males, ages 64.25 ± 5.04 years) undergoing knee fracture repair surgery, with no history of joint disease, who did not show clinical manifestations compatible with OA when specifically explored by radiography. The clinical characteristics of OA patients and the control cohort are shown in Table 1. All individuals who participated in the study were of Greek origin. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval by the local ethical committee of the University Hospital of Larissa.

Articular cartilage samples ($n = 12$) were collected from femoral condyles and tibial plateaus of the same OA patients undergoing total knee replacement surgery. Normal articular cartilage was obtained from small free cartilaginous fragments of 7 out of the 12 healthy individuals undergoing knee fracture repair surgery. Signed informed consent was obtained from all OA and healthy individuals prior to surgery and/or blood drawing.

Table 1 Clinical characteristics of OA patients and healthy controls

Sample	Group	Sex	Age	BMI	K-L score
01OA	OA	F	68	29	4
02OA	OA	M	69	29	4
03OA	OA	F	64	33.3	4
04OA	OA	F	77	33	3
05OA	OA	F	70	28	3
06OA	OA	M	71	28.5	4
07OA	OA	M	63	34.59	3
08OA	OA	F	66	27.6	4
09OA	OA	F	77	28	3
10OA	OA	F	66	32.4	4
11OA	OA	F	76	30.5	4
12OA	OA	F	71	39.1	4
1A	Control	F	65	23.79	0
2A	Control	M	75	23.5	0
3A	Control	F	63	22	0
4A	Control	M	68	29.74	0
5A	Control	M	66	29.38	0
6A	Control	F	60	23	0
7A	Control	F	68	28	0
8A	Control	M	64	29	0
9A	Control	M	63	27	0
10A	Control	F	54	30	0
11A	Control	F	63	21.6	0
12A	Control	F	62	20.2	0

RNA extraction and microRNA expression profiling by microarray in serum of OA patients and healthy individuals

Total RNA was extracted from serum samples using the RiboEXTMLS kit (GeneAll, Seoul, Korea). RNA quantity and quality were evaluated using a spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis, Nanogen Inc.). Total RNA samples were spiked using the microRNA Spike-In Kit (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) to assess the labeling and hybridization efficiencies. Labeling and hybridization were performed using the miRNA complete Labeling and Hybridization Kit (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Samples were hybridized to the SurePrint G3 Human miRNA, 8X60K platform (miR-Base release 21.0, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) containing probes for the detection of 2549 human miRNAs. Images were scanned using Agilent Microarray Scanner (G2565CA) controlled by Agilent Scan Control 7.0 software. The signal after background subtraction was exported directly into Agilent Feature Extraction Software version 4.0.1.21 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Normalization was performed using quantile algorithm. MicroRNAs were considered as differentially expressed (DE) if they obtained a p value < 0.05 and a false discovery rate (FDR) ≤ 0.05 .

ROC analysis

Receiver Operating Characteristic curves (ROC) analysis was performed using the MATLAB® simulation environment and was used to calculate the area under the curve (AUC) value along with standard error and 95% confidence intervals. ROC curves were considered significant with AUC value > 0.8 and a p value < 0.05 .

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) validation of selected miRNAs in serum of OA and healthy individuals

The expression levels of 7 selected miRNAs screened with miRNA microarrays, as mature hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p, and hsa-miR-671-3p, were evaluated in serum samples from 12 OA patients and 12 healthy controls. More specifically, reverse transcription was carried out with 100 ng of total RNA using MiScript II Reverse Transcription Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). The relative quantification of selected differentially expressed miRNAs was performed by qRT-PCR reaction with the miScript SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) and MiScript Primer Assays (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA), using an ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reactions were performed in duplicate. The relative expression levels were calculated

using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Normalized gene expression values for each gene were generated based on cycle threshold (CT) values for each of the genes. Hsa-miR-25-1 was used as endogenous control, as it exhibited minimum variance between the controls and patients in miRNA microarray analysis. Also, its stability was confirmed using the NormFinder software [29].

Primary cultures of OA and normal and articular chondrocytes

Articular cartilage was dissected and subjected to digestion with 1 mg/ml pronase (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) for 30 min and then the sample was centrifuged and the pellet was subjected to digestion with 1 mg/ml collagenase P (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) for 3 h at 37 °C. Chondrocytes were counted and checked for viability using trypan blue staining. More than 95% of the cells were viable after isolation. Chondrocytes were cultured with Dulbecco's modified Eagles medium/Ham's F-12 (DMEM/F-12) (GIBCO, BRL, UK) plus 5% fetal bovine serum (FBS, GIBCO, BRL, UK) and 100 U/ml penicillin-streptomycin, and were incubated at 37 °C under a humidified 5% CO₂ atmosphere until reaching confluence. Chondrocytes were kept in culture for one passage, while types I and II collagen ratios were evaluated in all samples to exclude dedifferentiation events.

RNA extraction and quantification of miRNA expression from OA and healthy articular cartilage

Total cellular RNA was extracted from cultured chondrocytes using Trizol reagent (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK). RNA quantity and quality was evaluated using a spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis, Nanogen Inc.). Reverse transcription was conducted using the SuperScript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific Inc., USA), using primers specific for hsa-miR-33b-3p, has-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-671-3p, and U6 small nuclear RNA (RNU6B) stem-loop RT primer to generate the cDNA as previously described [30]. MiRNA expression was verified by qRT-PCR. Reactions were done in duplicate. The reactions were performed using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers (forward and reverse) for each miRNA. For the quantification of the relative expression of each miRNA, the threshold cycle (Ct) values were normalized against the endogenous reference U6. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used [30].

Statistical analyses and data analyses

Multiparameter analyses were performed with the MATLAB® simulation environment (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA). In particular, data pre-processing was

performed in Microsoft Excel® and data processing was performed within the Matlab® v.7.6.0 (The MathWorks Inc. Natick, MA, USA) computing environment, using the Bioinformatics Toolbox. For background correction, the well-performing multiplicative background correction (MBC) approach was followed [31]. In terms of filtering, as low signal intensity measurements are less reliable in terms of the impact of noise on them, than high gene expression measurements, an intensity-dependent filtering [32, 33] with an absolute threshold value of 10 was used, in order to exclude low quality features. A threshold of 1 was set as a cut-off value, meaning that spot intensity should be at least the same as that of the background. The quantile normalization method was used for further processing [34]. In order to identify potentially differentially expressed (DE) genes between samples and among genes of the same experiment a two-tailed Student's *t* test was used to test the mean differences between the two groups. Genes that received a $p < 0.05$ were considered as DE. Further on, the false discovery rate (FDR) has been calculated as described previously [35–37]. There was a FDR of 0.007% for $p < 0.05$.

Continuous variables are expressed as median ± standard deviation unless indicated differently. k-means and hierarchical clustering (HCL) analyses of microRNA expression were performed using all differentially expressed (DE) miRNAs with Euclidian distance.

RNA target prediction for selected miRNAs was performed with TargetScan v. 7.0 [38] and DIANA Tools, a collection of web-tools for miRNA functional annotation analysis [39]. Functional annotation was performed with the Webgestalt web-tool [40] and DIANA tools. Furthermore, KEGG pathway enrichment analysis was conducted for the target genes using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) online tools [41] with the cut-off criterion of $p < 0.05$.

Venn diagrams were generated with the Venn Diagram Calculator from the Bioinformatics, Evolutionary Genomics Group of the University of Gent.

Results

MicroRNA microarray profiling in serum of OA patients and healthy individuals

Among the 2549 miRNAs tested using the Agilent 8 × 60 K miRNA-array platform, a total of 279 miRNAs were found to be differentially expressed (205 upregulated and 74 downregulated) ($FDR < 0.008$, $p < 0.05$) in the serum of OA patients compared to healthy individuals (Fig. 1a, b).

Classification methods were used in order to detect patterns in gene expression. Unsupervised two-way hierarchical clustering (HCL) with Euclidian distance and k-means analyses could not discriminate accurately between OA and normal serum samples (data not shown).

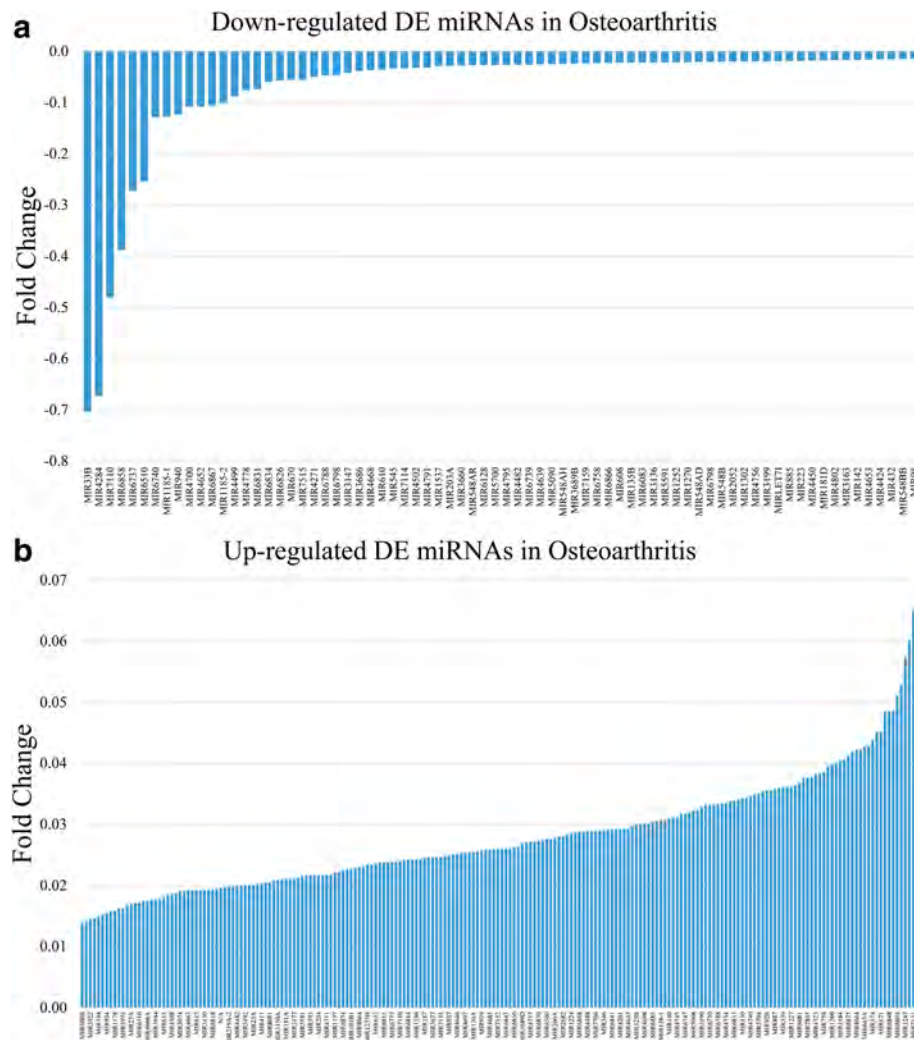


Fig. 1 **a** Graphical representation of the *downregulated* differentially expressed (DE) miRNAs between OA patients and healthy individuals. Fold change has been estimated by calculating the $\log_2$ of the OA over control ratio. **b** Graphical representation of the *upregulated* differentially expressed (DE) miRNAs between OA patients and healthy individuals. Fold change has been estimated by calculating the $\log_2$ of the OA over control ratio

Diagnostic value of miRNAs in serum

Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were established to evaluate the diagnostic value of deregulated miRNAs in discriminating between OA patients and healthy individuals. ROC analysis revealed that 77 miRNAs had an area under the curve (AUC) > 0.8 at a $p < 0.05$ significance level, that could thus separate OA from control samples. ROC analysis results are summarized in Additional file 1: Table S1. Among the 77 miRNAs, 7 miRNAs, hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-671-3p, and hsa-miR-140-3p, were selected for further validation based on the fact that they were in the top 20 up- or downregulated miRNAs as found in microarray microRNA expression profiling presented in Fig. 1a, b. More specifically, miR-33b-3p and miR-4284 were among the top upregulated,

and miR-663a, miR150-5p, miR-1233-3p, miR-671-3p, and miR-140-3p were downregulated.

ROC curve analysis of the seven selected miRNAs is presented in Fig. 2.

Validation of selected miRNAs expression in serum of OA and healthy individuals by qRT-PCR

We verified by qRT-PCR the expression levels of the seven selected miRNAs (hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p, and hsa-miR-671-3p) in all serum samples. Among these seven miRNAs, 3 miRNAs, hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-671-3p, and hsa-miR-140-3p, were found significantly downregulated in OA serum samples compared to controls ($p < 0.05$) (Fig. 3a).

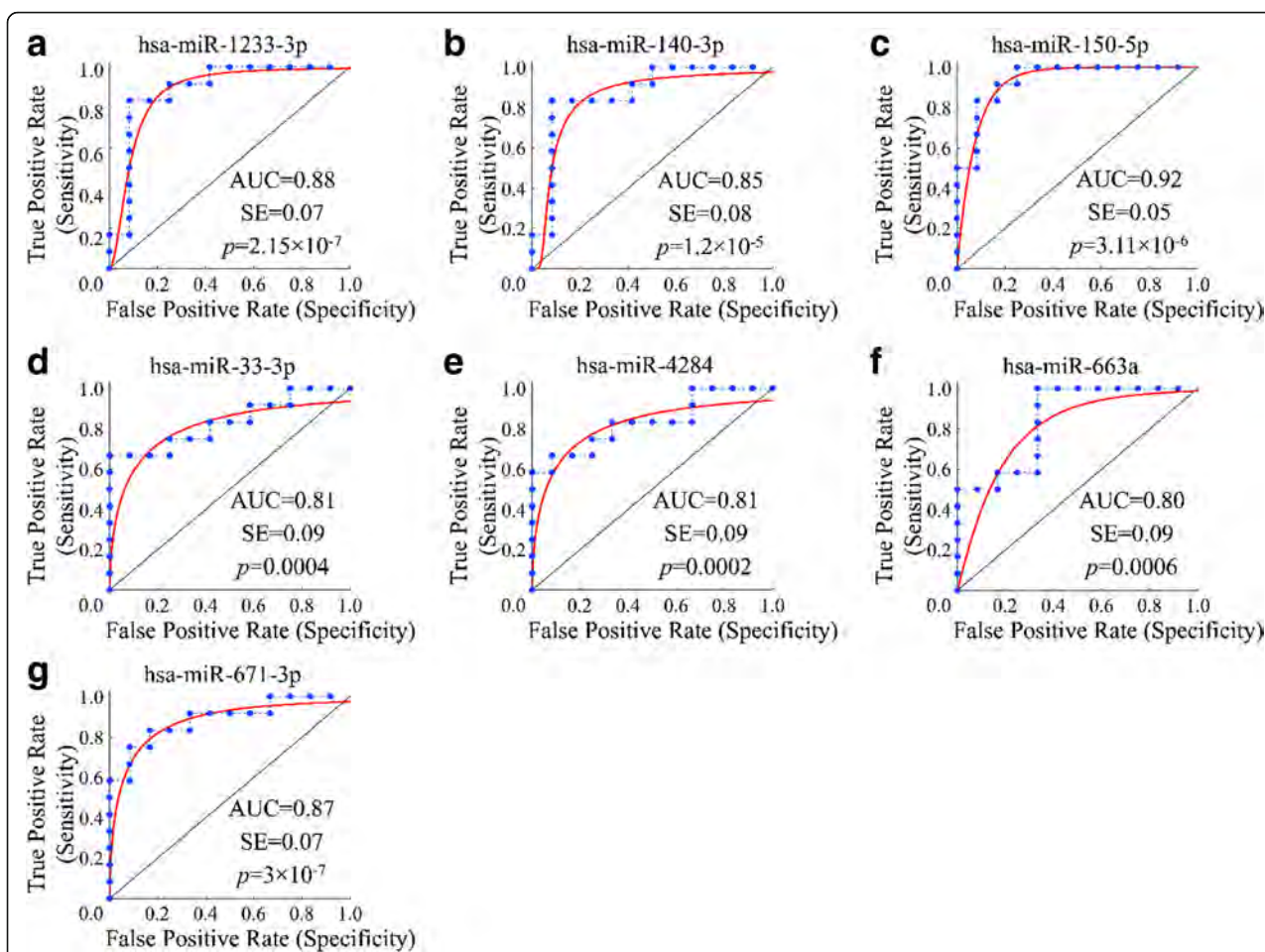


Fig. 2 ROC analysis of miRNAs separating OA from control samples. Seven miRNAs were selected for further analysis and verification. Hsa-miR-1233-3p (a), hsa-miR-140-3p (b), hsa-miR-150-5p (c), hsa-miR-33-3p (d), hsa-miR-4284 (e), hsa-miR-663a (f), and hsa-miR-671-3p (g) manifested an area under the curve (AUC) value > 0.8 (AUC > 0.8) and $p < 0.01$

Moreover, we found that hsa-miR-33b-3p and hsa-miR-4284 expression levels coincided between microarray analysis and qRT-PCR, exhibiting decreased expression in serum of OA samples compared to controls. Hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p, and hsa-miR-671-3p, which were marginally over-expressed in microarray analysis, appeared to be downregulated with qRT-PCR. This discrepancy might be due to technical limitations of the microarray methodology (Fig. 3b).

Pathway analysis and target gene prediction

Pathway enrichment analysis of the 77 miRNAs that were found significant in ROC analysis revealed that these DE miRNAs are potentially involved in pathways associated with OA pathogenesis, as among others, thyroid hormone, FoxO, mTOR, sphingolipoid, MAPK, PI3K-Akt, Wnt, ErbB, estrogen and TGF-beta signaling pathways, ECM-receptor interaction, and fatty acid biosynthesis. Annotated pathways are summarized in Table 2.

Furthermore, by considering the qRT-PCR data, we focused on predicted target genes, by TargetScan, of the three miRNAs (hsa-miR-140-3p, hsa-miR-33b-3p, and hsa-miR-671-3p) that were found downregulated in the serum of OA patients. It appeared (Fig. 4) that these genes are predicted targets of two or more of the three miRNAs. More specifically, 28 genes were co-targeted by at least 2 miRNAs. Among these, *INSR* and *IGF1R* were targeted by all three miRNAs, while *ADCY7*, *VANGL1*, *WNT5A*, *PPP3R2*, *TGFBRI*, *FZD4*, *BRAF*, and *CREB5* were co-targeted by hsa-miR-140-3p, and hsa-miR-671-3p, *RPTOR*, *CDKN1A*, *PRKCB*, *ADCYA1*, *PDPK1*, *MAPK1*, *ADCY2*, *TCS1*, *Kras*, *CBL*, *CHRM3*, *SGL1*, *CREB1*, *KCNN3*, *PRKCI*, *PPP2R5E*, and *KCNJ11* were co-targeted by hsa-miR-33b-3p, and hsa-miR-140-3p and *KCNN1* were co-targeted by hsa-miR-671-3p and hsa-miR-33b-3p.

Pathway enrichment analysis (Additional file 2: Table S2) revealed that the target genes of hsa-miR-140-3p, hsa-miR-33b-3p, and hsa-miR-671-3p are potentially involved in 48 common signaling pathways, including

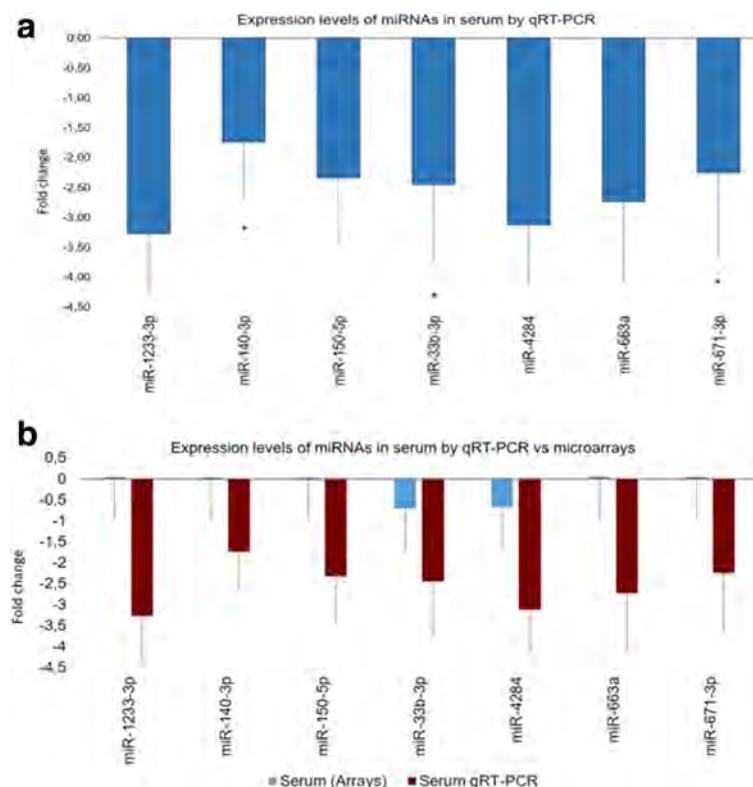


Fig. 3 a Diagram of relative miRNA expression levels by qRT-PCR in the serum of healthy individuals ($n = 12$) and OA patients ($n = 12$). MiR-25-1 was used for normalization of the real-time PCR data. $*p < 0.05$ as measured using an unpaired Student's t test. Hsa-miR-140-3p, hsa-miR-671-3p, and hsa-miR-33b-3p were significantly downregulated in serum samples of OA patients compared to healthy individuals. **b** Comparative diagram of miRNA expression levels between miRNA microarray analysis and as validated by qRT-PCR in serum samples of OA patients ($n = 12$) and healthy individuals ($n = 12$). The expression levels of hsa-miR-33b-3p and hsa-miR-4284 coincided between the two methodologies, while hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-663a, and hsa-miR-671-3p were marginally overexpressed in microarray analysis and appeared to be down-regulated with qRT-PCR

thyroid hormone synthesis, FoxO signaling pathway, insulin secretion, chemokine signaling pathway, MAPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, estrogen signaling pathway, regulation of lipolysis in adipocytes, glucagon signaling pathway, and calcium signaling pathway, whereas 40 common pathways were predicted common between miR-140-3p and miR-33b-3p, such as mTOR signaling pathway, osteoclast differentiation, Ras signaling pathway, type II diabetes mellitus, adipocytokine signaling pathway, thyroid hormone signaling pathway, insulin signaling pathway, insulin resistance, sphingolipid signaling pathway, sphingolipid metabolism, and ErbB signaling pathway. Furthermore, five pathways were predicted between miR-140-3p and miR-671-3p, including Wnt signaling pathway, endocrine and other factor-regulated, and calcium reabsorption (Fig. 5).

Disease annotation

Based on the previous list of the revealed miRNAs, we further investigated their association with known diseases. It appeared that the miRNAs we identified participate in

arthritis, joint diseases, and rheumatic disease. Interestingly, our identified miRNAs included hsa-miR-140-3p, which participated in arthritis, joint diseases, and rheumatoid disease. On average, hsa-miR-140-3p was found to be downregulated in all OA samples. The results of the Disease Annotation are summarized in Table 3.

miRNA expression in OA and healthy articular cartilage samples

We next evaluated by qRT-PCR the expression levels of the 7 selected miRNAs (hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p and hsa-miR-671-3p) in 12 OA and 7 healthy articular cartilage samples. The expression levels of hsa-miR-140-3p, hsa-miR-150-5p, and hsa-miR-671-3p were significantly decreased in OA articular cartilage compared to healthy cartilage ($p < 0.05$) (Fig. 6). No significant differences were observed for hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, and hsa-miR-1233-3p expression levels between OA and healthy articular cartilage.

Table 2 Summary of 77 miRNAs that were found significant in ROC analysis in common annotated pathways

KEGG pathway	<i>p</i> value	#genes	#miRNAs
Proteoglycans in cancer	3.10E-11	156	64
Morphine addiction	1.07E-05	68	54
Circadian entrainment	1.07E-05	78	55
Adherens junction	3.37E-05	62	57
Phosphatidylinositol signaling system	6.91E-05	61	55
Axon guidance	6.91E-05	100	56
Glutamatergic synapse	6.91E-05	92	56
Thyroid hormone signaling pathway	0.000101627	90	62
Ras signaling pathway	0.000108175	167	66
Fatty acid biosynthesis	0.000111286	9	17
Retrograde endocannabinoid signaling	0.000113352	78	52
Rap1 signaling pathway	0.000113352	157	64
Dopaminergic synapse	0.000186561	101	57
Pathways in cancer	0.000227243	284	69
Hippo signaling pathway	0.000362414	111	62
N-Glycan biosynthesis	0.000416091	35	41
Inflammatory mediator regulation of TRP channels	0.000430502	74	48
GABAergic synapse	0.000725271	68	58
Long-term depression	0.001178836	48	46
Serotonergic synapse	0.001245646	81	51
TGF-beta signaling pathway	0.001498476	58	54
Pancreatic cancer	0.001536223	53	49
FoxO signaling pathway	0.001905724	98	59
ErbB signaling pathway	0.002223208	66	51
MAPK signaling pathway	0.002252012	183	66
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	0.002265893	102	61
Wnt signaling pathway	0.002265893	104	63
Melanoma	0.002526033	56	49
Long-term potentiation	0.002526033	54	52
Nicotine addiction	0.004752071	29	43
Prion diseases	0.006877062	20	36
Circadian rhythm	0.006877062	26	41
PI3K-Akt signaling pathway	0.006877062	235	70
Prostate cancer	0.006944825	67	57
Neurotrophin signaling pathway	0.008178726	88	58
Oxytocin signaling pathway	0.008178726	111	62
mTOR signaling pathway	0.00860707	48	54
Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption	0.009616617	34	47
Renal cell carcinoma	0.009616617	52	47
Platelet activation	0.010946918	94	55
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0.010946918	102	60
Endocytosis	0.010946918	144	63

Table 2 Summary of 77 miRNAs that were found significant in ROC analysis in common annotated pathways (Continued)

KEGG pathway	p value	#genes	#miRNAs
Non-small cell lung cancer	0.011911365	43	47
Cholinergic synapse	0.012031519	79	56
Glioma	0.012204133	47	48
cGMP-PKG signaling pathway	0.01268481	117	67
Endometrial cancer	0.01424854	40	54
Estrogen signaling pathway	0.01424854	70	55
Choline metabolism in cancer	0.01424854	73	62
Chronic myeloid leukemia	0.01491545	54	52
Calcium signaling pathway	0.01491545	126	59
GnRH signaling pathway	0.015627113	68	51
Gap junction	0.015668053	62	51
Amphetamine addiction	0.016450563	49	52
T cell receptor signaling pathway	0.018715138	76	52
Glycosaminoglycan biosynthesis-heparan sulfate/heparin	0.021909011	18	29
Dorso-ventral axis formation	0.021911194	23	40
ECM-receptor interaction	0.02302011	59	49
Focal adhesion	0.023875829	143	62
Regulation of actin cytoskeleton	0.027660198	149	66
Sphingolipid signaling pathway	0.035172679	80	57
Small cell lung cancer	0.046657913	62	45
Cocaine addiction	0.046657913	36	49
Ubiquitin-mediated proteolysis	0.046657913	98	61

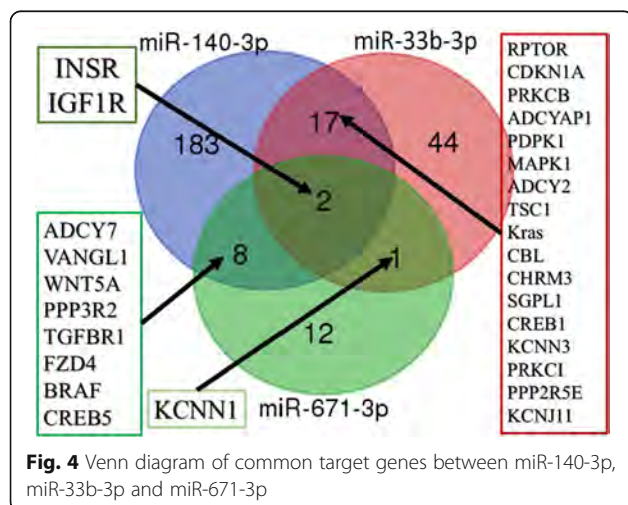
Discussion

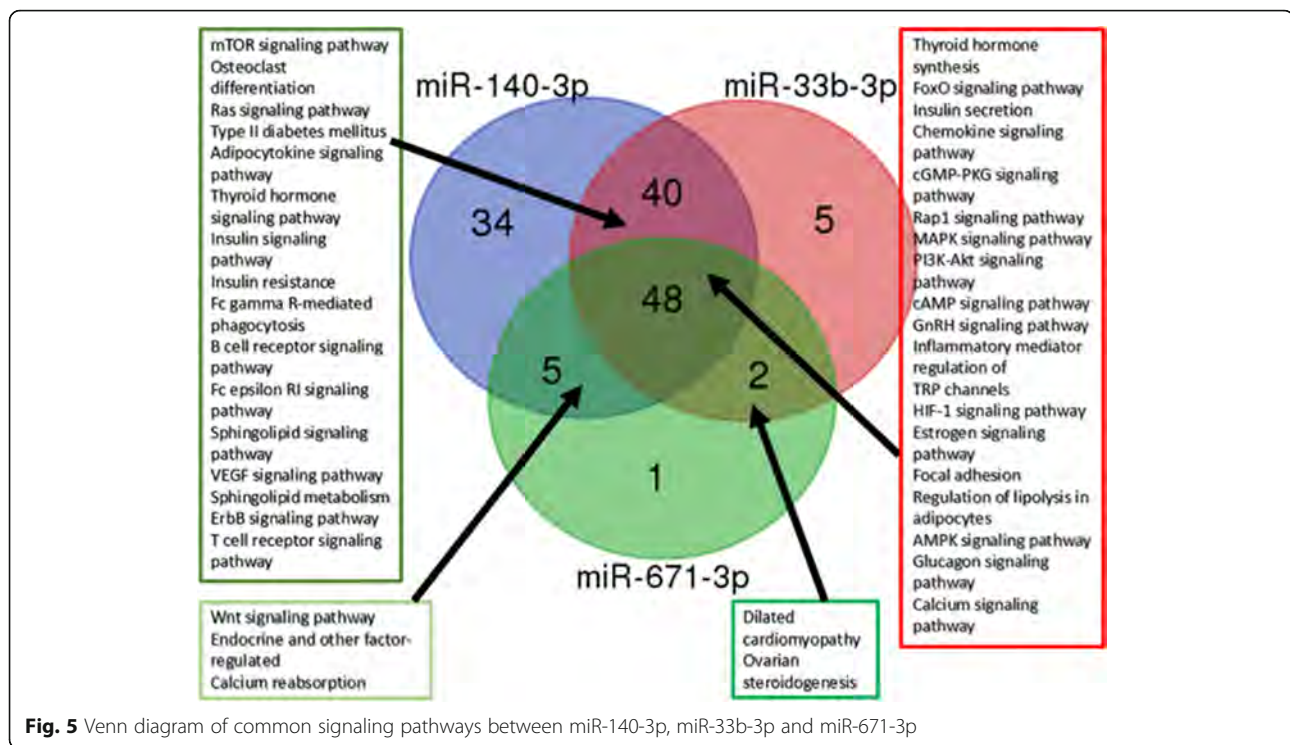
To our knowledge, this is the first study to establish a potential global serum miRNA signature in OA patients using a high-resolution microarray technology interrogating 2549 miRNAs. We identified a three-miRNA signature, including hsa-miR-140-3p, hsa-miR-671-3p, and hsa-miR-33b-3p, which was downregulated in the serum

of OA patients compared to controls and in silico predicted to be involved in regulating metabolic factors.

Recent evidence points that circulating miRNAs could derive from tissue injury [42] or adipose tissue depots [43], it could thus be speculated that serum miRNAs in OA could potentially have derived from cartilage degeneration, apoptosis, or inflammation, and miRNA expression profiling in OA serum could thus constitute a disease fingerprint.

To date, limited studies have been conducted, mainly using low-density arrays and qRT-PCR for the identification of circulating miRNA expression profile in serum, plasma or blood of OA patients, with inconsistent results among different studies. More specifically, Okuhara et al., investigated the expression of hsa-miR-146a, hsa-miR-155, hsa-miR-181a, and hsa-miR-223 by qRT-PCR in peripheral blood mononuclear cells of OA patients and healthy controls and correlated their expression to disease progression [44]. In a subsequent study, the expression of 380 miRNAs using TaqMan low density arrays was evaluated in the plasma of patients with primary osteoarthritis and controls and 12 miRNAs (hsa-miR-16, hsa-miR-20b, hsa-miR-29c, hsa-miR-30b, hsa-miR-93, hsa-miR-126, hsa-miR-146a, hsa-miR-184,





hsa-miR-186, hsa-miR-195, hsa-miR-345, and hsa-miR-885) were identified being over-expressed in OA patients [28]. A more recent study by Beyer et al. [27] identified let-7e in the serum of a large population-based cohort of OA patients necessitating arthroplasty as a potential predictor for severe knee or hip osteoarthritis; however, its expression was not confirmed in OA articular cartilage samples. The inability among the published studies to reveal consistent differentially expressed circulating miRNAs in OA could be attributed to differences in the study design, as selection of patients, disease status, and differences in ethnicity [45], and to different platforms and bioinformatics tools used in each study.

In the current setting among the 2549 miRNAs screened using a high-density microarray platform, we identified 279 miRNAs of which 205 upregulated and 74 downregulated, that were differentially expressed in serum between OA patients and healthy individuals. Hierarchical clustering analysis (HCA) using the miRNA signatures failed to demonstrate clear differences between OA and control serum samples. This inability of HCA might be due to the small sample size or to other technical issues, as the low dynamic range of miRNA microarrays compared to qRT-PCR to accurately identify fold-changes for miRNAs present in both high and low abundance [46].

In order to evaluate the diagnostic role of the circulating miRNAs in OA serum, we established ROC curves using a strict filtering approach. We determined 77 miRNAs that showed significant sensitivity and specificity

with area AUC values > 0.8, suggesting those miRNAs as potential OA biomarkers. Many of these miRNAs have yet unknown roles that remain to be revealed. To evaluate the biological information provided by the 77 miRNAs through ROC analysis, we performed pathway enrichment analysis, which revealed that their target genes were commonly enriched in OA related pathways, such as ECM-receptor interaction, mTOR, PI3K/Akt, Wnt, TGF- β and adipocytokine signaling pathways, insulin resistance, FoxO, autophagy, and fatty acid metabolism (Table 2).

We, next, validated with qRT-PCR, which offers high accuracy, sensitivity, and dynamic range [46] the expression levels of 7 selected out of the 77 DE miRNAs, which were among the top 20 up- or downregulated in the microarray screening, namely, hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-4284, hsa-miR-663a, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-140-3p, and hsa-miR-671-3p, in serum and in OA and healthy articular cartilage samples. We found that three miRNAs, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-671-3p, and hsa-miR-33b-3p, were significantly downregulated in the serum of OA patients compared to controls, and in addition, hsa-miR-140-3p and hsa-miR-671-3p were also significantly downregulated in OA compared to healthy articular cartilage (Figs. 3a, b and 6).

Hsa-miR-140 plays an important role in cartilage homeostasis and chondrogenesis [47–49] and has been previously reported with differential expression in OA cartilage [44, 50] but not in serum. Recently, it was

Table 3 Disease annotation of participation of selected miRNAs among others in arthritis, joint diseases, and rheumatic diseases

Index	UserID	Value	Gene symbol	Gene name	EntrezGene	Ensembl
Database: disease Name: Carcinoma, Small Cell ID:DB_ID:PA446661						
C = 278; O = 3; E = 0.21; R = 14.54; rawP = 0.0011; adjP = 0.0121						
1	MIR185	NA	MIR185	microRNA 185	406,961	NULL
2	MIR138-1	NA	MIR138-1	microRNA 138-1	406,929	NULL
3	MIR200A	NA	MIR200A	microRNA 200a	406,983	NULL
Database: disease Name: Lymphoma, Large-Cell, Diffuse ID:DB_ID:PA446313						
C = 262; O = 2; E = 0.19; R = 10.29; rawP = 0.0162; adjP = 0.0307						
1	MIR4488	NA	MIR4488	microRNA 4488	100,616,470	NULL
2	MIR4492	NA	MIR4492	microRNA 4492	100,616,376	NULL
Database: disease Name: Arthritis ID:DB_ID:PA443430						
C = 302; O = 2; E = 0.22; R = 8.93; rawP = 0.0211; adjP = 0.0307						
1	MIR140	NA	MIR140	microRNA 140	406,932	NULL
2	MIR346	NA	MIR346	microRNA 346	442,911	NULL
Database: disease Name: Neoplasms ID:DB_ID:PA445062						
C = 854; O = 3; E = 0.63; R = 4.73; rawP = 0.0251; adjP = 0.0307						
1	MIR185	NA	MIR185	microRNA 185	406,961	NULL
2	MIR138-1	NA	MIR138-1	microRNA 138-1	406,929	NULL
3	MIR200A	NA	MIR200A	microRNA 200a	406,983	NULL
Database: disease Name: Hematologic Neoplasms ID:DB_ID:PA446827						
C = 273; O = 2; E = 0.20; R = 9.87; rawP = 0.0175; adjP = 0.0307						
1	MIR671	NA	MIR671	microRNA 671	768,213	NULL
2	MIR758	NA	MIR758	microRNA 758	768,212	NULL
Database: disease Name: Brain Neoplasms ID:DB_ID:PA443557						
C = 198; O = 2; E = 0.15; R = 13.61; rawP = 0.0095; adjP = 0.0307						
1	MIR326	NA	MIR326	microRNA 326	442,900	NULL
2	MIR200A	NA	MIR200A	microRNA 200a	406,983	NULL
Database: disease Name: Joint Diseases ID:DB_ID:PA444661						
C = 266; O = 2; E = 0.20; R = 10.13; rawP = 0.0166; adjP = 0.0307						
1	MIR140	NA	MIR140	microRNA 140	406,932	NULL
2	MIR346	NA	MIR346	microRNA 346	442,911	NULL
Database: disease Name: Rheumatic Diseases ID:DB_ID:PA445555						
C = 295; O = 2; E = 0.22; R = 9.14; rawP = 0.0202; adjP = 0.0307						
1	MIR140	NA	MIR140	microRNA 140	406,932	NULL
2	MIR346	NA	MIR346	microRNA 346	442,911	NULL
Database: disease Name: Hematologic Diseases ID:DB_ID:PA444395						
C = 316; O = 2; E = 0.23; R = 8.53; rawP = 0.0230; adjP = 0.0307						
1	MIR671	NA	MIR671	microRNA 671	768,213	NULL
2	MIR150	NA	MIR150	microRNA 150	406,942	NULL
Database: disease Name: Carcinoma ID:DB_ID:PA443610						
C = 522; O = 2; E = 0.39; R = 5.16; rawP = 0.0571; adjP = 0.0628						
1	MIR138-1	NA	MIR138-1	microRNA 138-1	406,929	NULL
2	MIR200A	NA	MIR200A	microRNA 200a	406,983	NULL

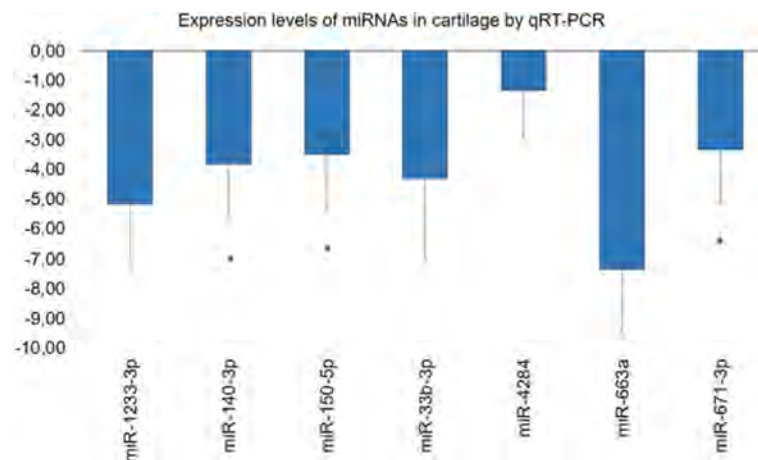


Fig. 6 Diagram of relative miRNA expression levels by qRT-PCR in normal ($n = 7$) and osteoarthritic (OA) chondrocytes ($n = 12$). U6 was used for normalization of the real-time PCR data. All miRNAs appeared to be downregulated with respect to control samples. Fold change has been calculated as the $\log_2$ transformed ratio of the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ of OA samples over control samples (asterisks depict a significant difference between the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ of OA samples and $2^{-\Delta\Delta C_t}$ of control samples in cartilage tissues at the $p < 0.05$ level). Hsa-miR-140-3p, hsa-miR-671-3p, and hsa-miR-150p were significantly downregulated in serum samples of OA patients compared to healthy individuals

shown that miR-140 is required for adipogenesis [51] and that decreased levels of miR-140 were found in the plasma of patients with morbid obesity influencing *TGF β 1* expression levels [51], suggesting a new role of miR-140 in metabolic processes and obesity, main contributors in OA development. Disease Association Annotation in our study revealed that among the differentially expressed miRNAs, hsa-miR-140-3p was involved in arthritic diseases. Regarding hsa-miR-671-3p and hsa-miR-33b, there are no reports on their involvement in OA pathogenesis. Human miR-33 has two isoforms, hsa-miR-33a and hsa-miR-33b, which share the same seed sequence, have the same predicted targets, and are both regulating lipid and cholesterol metabolism [19, 52]. Our group has highlighted the role of hsa-miR-33a in regulating cholesterol transport genes [53]. Recently, miR-33b was shown to regulate adipocyte differentiation [54] and miR-33a different functions of macrophages having a role in development and progress of atherosclerosis [55]. Regarding miR-671, besides its role in cancer cell migration [56], it was recently indicated that it regulates apoptotic genes such as *caspase 8*, *p38*, Myc-associated factor X (*MAX*), and Ras protein-specific guanine nucleotide releasing factor 1 (*RASGRF1*) in neurons of mice [56] and that it suppresses macrophage-mediated inflammation in orbital fat-derived stem cells by upregulating *IL-1RA* and *TNFR1* expressions [57, 58] highlighting its potential role in apoptosis and inflammation, both processes involved in OA.

Target gene analysis of hsa-miR-140-3p, hsa-miR-33b-3p, and hsa-miR-671-3p revealed that 28 genes were co-targeted by at least two miRNAs. Among common target-genes were insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*), insulin receptor (*InsR*), transforming growth factor beta

receptor 1 (*TGF β 1*), cAMP responsive element binding protein 5 (*CREB5*), nuclear factor κ B (*NF κ B*), and tumor necrosis factor α (*TNF α*), genes enriched in inflammatory and metabolic processes as revealed by pathway analysis (Figs. 4 and 5). An interesting finding in the in silico prediction analysis was that *InsR* and *IGF1R* were common targets of all three hsa-miR-140-3p, hsa-miR-33b-3p, and hsa-miR-671. Insulin is mediating its effects by binding to the specific high affinity insulin receptor (*InsR*), or with lower affinity to the structural- and functionally related insulin-like growth factor receptor (*IGFR*) [59]. Taking into consideration that OA is a metabolic disease [6], that insulin resistance plays a key role in the metabolic syndrome [3], and that recently a correlation was demonstrated between radiographic OA severity and insulin resistance [7], our in silico prediction analysis adds to the above evidence, suggesting a possible role of insulin resistance in OA. Along the same thought process, another interesting finding in our study was that cAMP responsive element binding protein 5 (*CREB5*), co-targeted by hsa-miR-140-3p and hsa-miR-671-3p, was significantly enriched in insulin secretion and TNF signaling pathways. *CREB5* is a primary regulator of adipogenesis, that is also involved in regulating innate immune system, aging-associated inflammation and glucose homeostasis [60, 61] and under obese conditions promotes insulin resistance by activating the transcriptional repressor ATF3 and by downregulating the expression of adiponectin as well as insulin-sensitive glucose transporter 4 (*GLUT4*) [62].

All above suggest that the in silico predictions in the present study are highlighting the possible implication of circulating hsa-miR-140-3p, hsa-miR-33b-3p, and hsa-miR-671-3p as novel serum-based biomarkers for

osteoarthritis prognosis and underlining their involvement in the regulation of metabolic processes that contribute to OA pathology. However, functional studies need to be conducted to verify our bioinformatics analysis and to shed light on the metabolic pathways through which the above miRNA signature leads to OA onset and development. In addition, standardized protocols for circulating miRNA isolation and analysis in larger cohorts of different ethnicities must be established before their use in clinical practice.

Conclusions

A serum miRNA signature was established, for the first time, using high-density resolution miR-arrays in OA patients, and their deregulation was verified in articular cartilage samples. We identified a three-miRNA signature, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-671-3p, and hsa-miR-33b-3p, in serum predicted to regulate metabolic processes, which could serve as a potential biomarker for the evaluation of OA risk and progression.

Additional files

Additional file 1: ROC analysis of miRNA expression values for OA and control serum samples. (DOCX 18 kb)

Additional file 2: Pathway enrichment analysis for target genes of hsa-miR-33b-3p, hsa-miR-140-3p and hsa-miR-671-3p using DAVID database ($p < 0.05$). (XLSX 29 kb)

Abbreviations

AUC: Area under the curve; *CREB5*: cAMP responsive element binding protein 5; CT: Cycle threshold; DAVID: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; DE: Differentially expressed; FBS: Fetal bovine serum; FDR: False discovery rate; *GLUT4*: Insulin-sensitive glucose transporter 4; HCA: Hierarchical clustering analysis; HCL: Hierarchical clustering; HDL: High-density lipoprotein; *IGF1R*: Insulin-like growth factor 1 receptor; *IGFR*: Insulin-like growth factor receptor; *InsR*: High affinity insulin receptor; MAX: Myc-associated factor X; miRNAs: MicroRNAs; *Nfkb*: Nuclear Factor kB; OA: Osteoarthritis; qRT-PCR: Quantitative real-time PCR; *RASGRF1*: Ras protein-specific guanine nucleotide releasing factor 1; ROC: Receiver Operating Characteristic curves; *TGFBRT1*: Transforming growth factor beta receptor 1; *TNfa*: Tumor necrosis factor α

Acknowledgements

Authors would like to thank the patients and healthy controls for consenting to give material for this work.

Funding

The project was funded by a fellowship of Excellence IKY/SIEMENS given to E. Ntounmou.

Availability of data and materials

The majority of data generated or analyzed during this study are included in this manuscript (and its supplementary information files). Additional datasets (micro-RNA array raw data) used and/or analyzed during the current study are available upon reasonable request from the corresponding author atsezou@med.uth.gr. The electronic databases used for pathway/target gene analysis are as follows:

- TargetScan <http://www.targetscan.org>. Accessed 18 June 2017.

- Webgestalt web-tool <http://www.webgestalt.org/>. Accessed 18 June 2017.
- DIANA tools <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/>. Accessed 18 June 2017.
- DAVID <https://david.ncifcrf.gov/>. Accessed 18 June 2017.
- Venn Diagram Generator <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Accessed 18 June 2017.

Authors' contributions

MK, SN, and AL were involved in the provision of clinical samples, including articular cartilage samples, in clinical characterization of all samples, and acquisition of data. LG was involved in data acquisition, bioinformatics, and statistical analysis. BM was involved in microarray screening, NE in experimental and bioinformatics analysis and drafting the manuscript, PM in acquisition and interpretation of data, TM in article conception and results interpretation and TA was involved in article conception, experimental design, interpretation, and revisiting critically the article for important intellectual content and approved the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Consent was obtained from each participant. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval by the local ethical committee of the University Hospital of Larissa.

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The Authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Laboratory of Cytogenetics and Molecular Genetics, Faculty of Medicine, Biopolis, University of Thessaly, 41500 Larissa, Greece. ²Laboratory of Medical Genetics, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece. ³First Department of Pediatrics, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece. ⁴University Research Institute for the Study and Treatment of Childhood Disease and Malignant Diseases, National and Kapodistrian University of Athens, "Aghia Sophia" Children's Hospital, Athens, Greece. ⁵Department of Orthopaedics, Faculty of Medicine, University of Thessaly, Larissa, Greece. ⁶Department of Biology, Faculty of Medicine, University of Thessaly, Larissa, Greece.

Received: 21 August 2017 Accepted: 29 November 2017

Published online: 12 December 2017

References

1. Cross M, Smith E, Hoy D, Nolte S, Ackerman I, Fransen M, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(7):1323–30. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204763.
2. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol*. 2007;213(3):626–34. doi: 10.1002/jcp.21258.
3. Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartil*. 2009;17(8):971–9. doi: 10.1016/j.joca.2009.03.002.
4. Felson DT. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*. 2006;354(8):841–8. doi: 10.1056/NEJMc051726.
5. Zhuo Q, Yang W, Chen J, Wang Y. Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(12):729–37. doi: 10.1038/nrrheum.2012.135.
6. Kluzek S, Newton JL, Arden NK. Is osteoarthritis a metabolic disorder? *Br Med Bull*. 2015;115(1):111–21. doi: 10.1093/bmb/ldv028.
7. Tootsi K, Martson A, Kals J, Paapstel K, Zilmer M. Metabolic factors and oxidative stress in osteoarthritis: a case-control study. *Scand J Clin Lab Invest*. 2017;1–7. doi: 10.1080/00365513.2017.1354255.

8. Sharif B, Kopec J, Bansback N, Rahman MM, Flanagan WM, Wong H, et al. Projecting the direct cost burden of osteoarthritis in Canada using a microsimulation model. *Osteoarthr Cartil.* 2015;23(10):1654–63. doi: 10.1016/j.joca.2015.05.029.
9. Reichmann WM, Maillefer JF, Hunter DJ, Katz JN, Conaghan PG, Losina E. Responsiveness to change and reliability of measurement of radiographic joint space width in osteoarthritis of the knee: a systematic review. *Osteoarthr Cartil.* 2011;19(5):550–6. doi: 10.1016/j.joca.2011.01.023.
10. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 2004;432(7014):235–40. doi: 10.1038/nature03120.
11. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008;18(10):997–1006. doi: 10.1038/cr.2008.282.
12. Kumar S, Vijayan M, Bhatti JS, Reddy PH. MicroRNAs as peripheral biomarkers in aging and age-related diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017; 146:47–94. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.12.013.
13. Miles GD, Seiler M, Rodriguez L, Rajagopal G, Bhanot G. Identifying microRNA/mRNA dysregulations in ovarian cancer. *BMC research notes.* 2012;5:164. doi: 10.1186/1756-0500-5-164.
14. Taurino C, Miller WH, McBride MW, McClure JD, Khanin R, Moreno MU, et al. Gene expression profiling in whole blood of patients with coronary artery disease. *Clin Sci.* 2010;119(8):335–43. doi: 10.1042/CS20100043.
15. van Meurs JB. Osteoarthritis year in review 2016: genetics, genomics and epigenetics. *Osteoarthr Cartil.* 2017;25(2):181–9. doi: 10.1016/j.joca.2016.11.011.
16. Sondag GR, Haqqi TM. The role of MicroRNAs and their targets in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2016;18(8):56. doi: 10.1007/s11926-016-0604-x.
17. Iliopoulos D, Malizos KN, Oikonomou P, Tsezou A. Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS One.* 2008;3(11): e3740. doi: 10.1371/journal.pone.0003740.
18. Li YH, Tavallaei G, Tokar T, Nakamura A, Sundararajan K, Weston A, et al. Identification of synovial fluid microRNA signature in knee osteoarthritis: differentiating early- and late-stage knee osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2016;24(9):1577–86. doi: 10.1016/j.joca.2016.04.019.
19. Aryal B, Singh AK, Rotllan N, Price N, Fernandez-Hernando C. MicroRNAs and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2017;28(3):273–80. doi: 10.1097/MOL.0000000000000420.
20. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol.* 2012;22(3):125–32. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.12.001>.
21. Turchinovich A, Burwinkel B. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol.* 2012;9(8):1066–75. <https://doi.org/10.4161/rna.21083>.
22. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011;13(4):423–33. doi: 10.1038/ncb2210.
23. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell.* 2010;39(1):133–44. doi: 10.1016/j.molcel.2010.06.010.
24. Gantier MP, McCoy CE, Rusinova I, Saulep D, Wang D, Xu D, et al. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(13):5692–703. doi: 10.1093/nar/gkr148.
25. Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(9):513–21. doi: 10.1038/nrendo.2013.86.
26. Parrizas M, Novials A. Circulating microRNAs as biomarkers for metabolic disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2016;30(5):591–601. doi: 10.1016/j.beem.2016.08.001.
27. Beyer C, Zampetaki A, Lin NY, Kleyer A, Perricone C, Iagnocco A, et al. Signature of circulating microRNAs in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74(3):e18. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204698.
28. Borgonio Cuadra VM, Gonzalez-Huerta NC, Romero-Cordoba S, Hidalgo-Miranda A, Miranda-Duarte A. Altered expression of circulating microRNA in plasma of patients with primary osteoarthritis and in silico analysis of their pathways. *PLoS One.* 2014;9(6):e97690. doi: 10.1371/journal.pone.0097690.
29. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64(15):5245–50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
30. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):e179. doi: 10.1093/nar/gni178.
31. Zhang D, Zhang M, Wells MT. Multiplicative background correction for spotted microarrays to improve reproducibility. *Genet Res.* 2006;87(3):195–206. doi: 10.1017/S0016672306008196.
32. Causton H, Quackenbush J, Brazma A. Microarray gene expression data analysis: a beginner's guide. Malden: Blackwell Publishing; 2003.
33. Cleveland W. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J Am Stat Assoc.* 1979;74(Dec):829–36.
34. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics (Oxford, England).* 2003;19(2):185–93.
35. Klipper-Aurbach Y, Wasserman M, Braunspeigel-Weintrob N, Borstein D, Peleg S, Assa S, et al. Mathematical formulae for the prediction of the residual beta cell function during the first two years of disease in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Med Hypotheses.* 1995;45(5):486–90.
36. Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(16):9440–5.
37. Storey JD, Tibshirani R. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in DNA microarrays. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ).* 2003;224:149–57.
38. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *elife.* 2015;4 doi: 10.7554/eLife.05005.
39. Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, et al. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue):W169–73. doi: 10.1093/nar/gkt393.
40. Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Web Server issue):W741–8. doi: 10.1093/nar/gki475.
41. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol.* 2003;4(5):P3.
42. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engle PW, Vlasakova K, Muniappa N, Tanaka WK, et al. Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem.* 2009;55(11):1977–83. doi: 10.1373/clinchem.2009.131797.
43. Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature.* 2017;542(7642):450–5. doi: 10.1038/nature21365.
44. Okuhara A, Nakasa T, Shibuya H, Niimoto T, Adachi N, Deie M, et al. Changes in microRNA expression in peripheral mononuclear cells according to the progression of osteoarthritis. *Mod Rheumatol.* 2012;22(3):446–57. doi: 10.1007/s10165-011-0536-2.
45. Wang X, Sundquist J, Zoller B, Memon AA, Palmer K, Sundquist K, et al. Determination of 14 circulating microRNAs in Swedes and Iraqis with and without diabetes mellitus type 2. *PLoS One.* 2014;9(1):e86792. doi: 10.1371/journal.pone.0086792.
46. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet.* 2001;29(4):365–71. doi: 10.1038/ng1201-365.
47. Nicolas FE, Pais H, Schwach F, Lindow M, Kauppinen S, Moulton V, et al. Experimental identification of microRNA-140 targets by silencing and overexpressing miR-140. *RNA.* 2008;14(12):2513–20. doi: 10.1261/ma.1221108.
48. Miyaki S, Sato T, Inoue A, Otsuki S, Ito Y, Yokoyama S, et al. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev.* 2010;24(11):1173–85. doi: 10.1101/gad.1915510.
49. Karlens TA, Jakobsen RB, Mikkelsen TS, Brinchmann JE. microRNA-140 targets RALA and regulates chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by translational enhancement of SOX9 and ACAN. *Stem Cells Dev.* 2014;23(3):290–304. doi: 10.1089/scd.2013.0209.
50. Tardif G, Pelletier JP, Fahmi H, Hum D, Zhang Y, Kapoor M, et al. NFAT3 and TGF-beta/SMAD3 regulate the expression of miR-140 in osteoarthritis. *Arthritis research & therapy.* 2013;15(6):R197. doi: 10.1186/ar4387.
51. Gernapudi R, Wolfson B, Zhang Y, Yao Y, Yang P, Asahara H, et al. MicroRNA 140 promotes expression of long noncoding RNA NEAT1 in Adipogenesis. *Mol Cell Biol.* 2016;36(1):30–8. doi: 10.1128/MCB.00702-15.
52. Hochberg MC, Tracy JK, Hawkins-Holt M, Flores RH. Comparison of the efficacy of the tumour necrosis factor alpha blocking agents adalimumab,

- etanercept, and infliximab when added to methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(Suppl 2):ii13–6.
53. Kostopoulou F, Malizos KN, Papathanasiou I, Tsezou A. MicroRNA-33a regulates cholesterol synthesis and cholesterol efflux-related genes in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis research & therapy*. 2015;17:42. doi: 10.1186/s13075-015-0556-y.
 54. Kuhn BM, Nodzynski T, Errafi S, Bucher R, Gupta S, Aryal B, et al. Flavonol-induced changes in PIN2 polarity and auxin transport in the Arabidopsis thaliana rol1-2 mutant require phosphatase activity. *Sci Rep*. 2017;7:41906. doi: 10.1038/srep41906.
 55. Dlouha D, Hubacek JA. Regulatory RNAs and cardiovascular disease—with a special focus on circulating microRNAs. *Physiol Res*. 2017;66(Supplementum 1):S21–38.
 56. Nan A, Chen L, Zhang N, Liu Z, Yang T, Wang Z, et al. A novel regulatory network among LncRpa, CircRar1, MiR-671 and apoptotic genes promotes lead-induced neuronal cell apoptosis. *Arch Toxicol*. 2017;91(4):1671–84. doi: 10.1007/s00204-016-1837-1.
 57. Tan X, Fu Y, Chen L, Lee W, Lai Y, Rezaei K, et al. miR-671-5p inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by downregulating FOXM1 expression in breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(1):293–307. 10.18632/oncotarget.6344.
 58. Lien GS, Liu JF, Chien MH, Hsu WT, Chang TH, Ku CC, et al. The ability to suppress macrophage-mediated inflammation in orbital fat stem cells is controlled by miR-671-5p. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(4):97. doi: 10.1186/scrt486.
 59. Li G, Barrett EJ, Wang H, Chai W, Liu Z. Insulin at physiological concentrations selectively activates insulin but not insulin-like growth factor I (IGF-I) or insulin/IGF-I hybrid receptors in endothelial cells. *Endocrinology*. 2005;146(11):4690–6. doi: 10.1210/en.2005-0505.
 60. Mayr BM, Canettieri G, Montminy MR. Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10936–41. doi: 10.1073/pnas.191152098.
 61. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(8):599–609. doi: 10.1038/35085068.
 62. Qi L, Saberi M, Zmuda E, Wang Y, Altarejos J, Zhang X, et al. Adipocyte CREB promotes insulin resistance in obesity. *Cell Metab*. 2009;9(3):277–86. doi: 10.1016/j.cmet.2009.01.006.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

