



**ΠΜΣ: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Ο ρόλος της οστεονεκτίνης στην  
οστεοαρθρίτιδα»**

**ΑΛΕΞΙΟΥ ΜΑΡΙΑ**  
**ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**Εργαστήριο: ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**  
**Δ/ντρια: Ασπασία Τσέζου, Καθηγ. Ιατρ. Γενετικής**

**ΛΑΡΙΣΑ 2013**





**ΠΜΣ: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Ο ρόλος της οστεονεκτίνης στην  
οστεοαρθρίτιδα»**

**ΑΛΕΞΙΟΥ ΜΑΡΙΑ**  
**ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**Εργαστήριο: ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**  
**Δ/ντρια: Ασπασία Τσέζου, Καθηγ. Ιατρ. Γενετικής**

**ΛΑΡΙΣΑ 2013**

# ***Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή***

**κ. Γερμενής Αναστάσιος**

**Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας**

---

**κ. Μαλίζος Κωνσταντίνος**

**Καθηγητής Ορθοπαιδικής**

---

**κα. Τσέζου Ασπασία**

**Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής**

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Λάρισας υπό την επίβλεψη και την καθοδήγηση της κ. Ασπασίας Τσέζου, Καθηγήτριας Ιατρικής Γενετικής. Της εκφράζω τις ευχαριστίες μου για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και την ευκαιρία που μου προσέφερε. Θα ήθελα επιπλέον, να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Μαλίζο, Καθηγητή Ορθοπαιδικής, για την άψογη συνεργασία μας, καθώς επίσης και τον κ. Γερμενή Αναστάσιο, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας, υπεύθυνο του Π.Μ.Σ., για την ευκαιρία που μου προσέφερε να συμμετάσχω στο εν λόγω πρόγραμμα σπουδών.

Θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω, ιδιαίτερα, τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου στις υποψήφιες διδάκτορες Παπαθανασίου Ιωάννα, Κωστοπούλου Φωτεινή και Εύη Μουρμούρα για τη συμβουλευτική καθοδήγηση και τη μύησή μου στις μεθοδολογίες της εργαστηριακής έρευνας. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους συναδέλφους στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής με τους οποίους συνεργάστηκα αρμονικά καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

*Αλεξίου Μαρία*

*Λάρισα, 18 Οκτωβρίου 2013*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	8
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	10
A.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	11
A.1.1. Η οστεονεκτίνη .....	14
A.1.1.1. Το γονίδιο της οστεονεκτίνης .....	15
A.1.1.2. Η πρωτεΐνη της οστεονεκτίνης .....	16
A.1.2. Ο ρόλος της οστεονεκτίνης στην εξωκυττάρια ουσία των ιστών .....	18
A.1.2.1. Ο ρόλος της οστεονεκτίνης στην αναδόμηση της ECM .....	18
A.1.2.1.1. Η αλληλεπίδραση της οστεονεκτίνης με τα δομικά συστατικά της ECM	18
A.1.2.1.1α. Η αλληλεπίδραση της οστεονεκτίνης με το κολλαγόνο .....	19
A.1.2.1.1β. Η αλληλεπίδραση της οστεονεκτίνης με άλλα δομικά συστατικά της ECM	20
A.1.2.1.2. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στις MMPs .....	20
A.1.2.2. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στους αυξητικούς παράγοντες .....	21
A.1.2.2.1. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στον TGF-β .....	21
A.1.2.2.2. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στον FGF-2 .....	22
A.1.2.2.3. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στον VEGF .....	23
A.1.2.2.4. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στους αυξητικούς παράγοντες IGF-1 και PDGF .....	24
A.1.2.3. Η πρόσδεση της οστεονεκτίνης σε υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας .....	24
A.1.2.3.1. Οι υποδοχείς ιντεγκρινών .....	25
A.1.2.3.2. Η πρωτεΐνη προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων 1 (VCAM-1) .....	25
A.1.2.4. Σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγει η οστεονεκτίνη .....	26
A.1.2.4.1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη .....	26
A.1.2.4.2. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια PI3K/Akt και MAPK .....	27
A.1.2.5. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στην επιβίωση των κυττάρων .....	27
A.1.3. Ο ρόλος της οστεονεκτίνης στα οστά .....	27
A.1.4. Ο ρόλος της οστεονεκτίνης στο λιπώδη ιστό .....	28

A.2. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs).....	29
A.2.1. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί και οστεοαρθρίτιδα .....	31
A.2.2. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του SPARC.....	34
A.3. ΣΚΟΠΟΣ.....	36
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	37
B.1. Υλικό και μέθοδοι.....	38
B.1.1. Συλλογή δειγμάτων.....	38
B.1.2. Επιλογή του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού του SPARC +12647 G>C (rs1053411).....	39
B.1.3. Απομόνωση DNA από αίμα .....	40
B.1.4. Διαδικασία διαχωρισμού των αλληλομόρφων (Allelic Discrimination Assays)	41
B.1.5. Στατιστική ανάλυση.....	45
B.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46
B.2.1.Μελέτη συσχέτισης: συσχέτιση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) +12647 G>C (rs1053411) του γονιδίου SPARC με την προδιάθεση για ανάπτυξη ΟΑ.. .....	46
B.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	50
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	52

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εκφυλιστική αρθρίτιδα, γνωστή και ως οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ), αποτελεί την συχνότερη πάθηση των αρθρώσεων και κύρια αιτία σωματικής αναπηρίας στην τρίτη ηλικία. Το κυριότερο χαρακτηριστικό της είναι ο προοδευτικός εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου και συνοδεύεται από πόνο και δυσλειτουργία των προσβεβλημένων αρθρώσεων. Θεωρείται πολυπαραγοντική ασθένεια, η ακριβής αιτιολογία της οποίας παραμένει αδιευκρίνιστη σε μεγάλο βαθμό. Ωστόσο, η εκτεταμένη μηχανική επιβάρυνση των αρθρώσεων, η ηλικία, το φύλο, η παχυσαρκία, προϋπάρχουσες παθήσεις των αρθρώσεων καθώς και η γενετική προδιάθεση συγκαταλέγονται στους κύριους παράγοντες κινδύνου. Προς το παρόν δεν υπάρχει ικανοποιητική θεραπευτική αντιμετώπιση παρόλο που η ασθένεια ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό αναπηρίας στις βιομηχανοποιημένες περιοχές, κατάσταση που αναμένεται να επιβαρυνθεί με την αυξανόμενη γήρανση του πληθυσμού. Τα μοριακά γεγονότα και η παθοφυσιολογία των εκφυλιστικών αλλοιώσεων της άρθρωσης που οδηγούν στο κλινικό σύνδρομο της ΟΑ έχει διευκρινιστεί σε πολύ μικρό βαθμό αν και έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στον καθορισμό των πιθανών μηχανισμών που ευθύνονται για την καταστροφή του χόνδρου. Τα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας του αρθρικού χόνδρου έχει βρεθεί, ότι εκτός από τις εμβιομηχανικές ιδιότητες που προσδίδουν στον ιστό, συμβάλλουν και στην πρόοδο και την εξέλιξη της ΟΑ.

Η οστεονεκτίνη, γνωστή και ως SPARC, είναι μία κυτταροθεμελιακή πρωτεΐνη που συναντάται στην ECM του αρθρικού χόνδρου και παρουσιάζει την ικανότητα να διαμεσολαβεί αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και της ECM, συμμετέχοντας σε διεργασίες που απαιτούν αλλαγές σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις, είτε σε φυσιολογικές είτε σε παθολογικές καταστάσεις. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs), του SPARC, έχουν ανιχνευθεί σε ασθένειες του μυοσκελετικού συστήματος, αλλά όχι στην οστεοαρθρίτιδα. Λαμβάνοντας υπόψη την αύξηση της έκφρασης της οστεονεκτίνης στην ΟΑ, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ήταν η ανίχνευση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στο γονίδιο της οστεονεκτίνης και η συσχέτιση του SNP +12647 G>C (rs1053411) με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου.

Για τη διεκπεραίωση της εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 691 δείγματα περιφερικού αίματος από ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Την ομάδα μελέτης αποτέλεσαν



ασθενείς που υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική γόνατος, λόγω πρωτοπαθούς OA (n=341) και την ομάδα ελέγχου άτομα που νοσηλεύτηκαν για ακρωτηριασμούς ή σοβαρά κατάγματα, χωρίς κανένα ιστορικό OA (n=350). Μετά την απομόνωση DNA, τα δείγματα προετοιμάστηκαν κατάλληλα για τον προσδιορισμό των γονοτύπων μέσω της διαδικασίας διαχωρισμού των αλληλομόρφων (Allelic Discrimination Assays).

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προκειμένου να μελετηθεί η συσχέτιση του SNP +12647 G>C (rs1053411) με τον κίνδυνο ανάπτυξης οστεοαρθρίτιδας. Παρατηρήθηκε, στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης του ομόζυγου παθολογικού γονοτύπου CC του SNP +12647 G>C (rs1053411). Τα αποτελέσματα επίσης κατέδειξαν ότι κλινικοί παράμετροι, όπως το φύλο, ο BMI, η ηλικία και ο βαθμός αλλοίωσης του αρθρικού χόνδρου (κλίμακα Kellgren-Laurence), οι οποίοι αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες για την ανάπτυξη OA, δεν σχετίζονται με τη συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων αλλά ούτε και με τη συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων στις δύο ομάδες που μελετήθηκαν.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας εργασίας αποδεικνύουν ότι άτομα με τον ομόζυγο παθολογικό γονότυπο CC του SNP +12647 G>C (rs1053411) παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη OA. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να διαλευκανθεί η εμπλοκή ή μη του SPARC στην παθογένεια της νόσου.

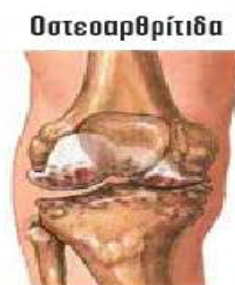
## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## A.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εκφυλιστική αρθρίτιδα, γνωστή και ως οστεοαρθρίτιδα (OA), είναι η πιο συχνή πάθηση των αρθρώσεων, αποτελώντας την πιο κοινή μορφή αρθρίτιδας (50% όλων των μορφών αρθρίτιδας). Το κυριότερο χαρακτηριστικό της νόσου είναι ο προοδευτικός εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου (**Εικόνα 1**), του ιστού που καλύπτει τα άκρα των οστών στις αρθρώσεις, ο οποίος σταδιακά καθίσταται μαλακός και διαβρώνεται κατά τόπους. Αλλοιώσεις, όμως υφίστανται σταδιακά και οι υπόλοιποι ιστοί της άρθρωσης με αποτέλεσμα την ανάπτυξη φλεγμονής στον αρθρικό υμένα (υμενίτιδα), την αντιδραστική παραγωγή νέου οστού στην περιφέρεια της άρθρωσης (οστεόφυτα), την πάχυνση του αρθρικού θύλακα, την εμφάνιση βλαβών στο υποχόνδριο οστό, το μειωμένο ιξώδες του αρθρικού υγρού και την ατροφία των τενόντων και των μυών [1,2,3].



**Φυσιολογικός χόνδρος**



**Οστεοαρθρίτιδα**

**Εκφυλισμός αρθρικού χόνδρου**

Η OA αποτελεί μία χρόνια κατάσταση, που επηρεάζει κυρίως άτομα τρίτης ηλικίας (>65 ετών) και ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό αναπηρίας και χαμηλού βιοτικού επιπέδου σε όλες τις χώρες του δυτικού κόσμου (Ευρώπη, Ηνωμένες Πολιτείες, Καναδάς, Αυστραλία), κατάσταση που αναμένεται να επιβαρυνθεί με την αυξανόμενη γήρανση του πληθυσμού [4]. Σύμφωνα μάλιστα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ.), περίπου 40 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα και υπολογίζεται ότι ο αριθμός αυτός θα αυξηθεί στα 60 εκατομμύρια το 2020 [5]. Στην Ελλάδα, μελέτη προερχόμενη από το Ελληνικό Ίδρυμα Ρευματολογικών Ερευνών, έδειξε ότι το περίπου το 13,1% των ενηλίκων πάσχει από OA [6].

Παρόλο που περιγράφεται ως μη φλεγμονώδης ασθένεια, προκειμένου να διακρίνεται από τη φλεγμονώδη αρθρίτιδα, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ), είναι γνωστό ότι η φλεγμονή των αρθρώσεων συμβάλλει σημαντικά στην πρόοδο της ασθένειας [7].

**Εικόνα 1:** Φυσιολογικός και εκφυλισμένος χόνδρος.

Η ΟΑ διακρίνεται σε πρωτοπαθή ή ιδιοπαθή όταν η αιτία ανάπτυξής της δεν είναι εμφανής και ως εκ τούτου υποδηλώνεται η πολυπαραγοντικότητα της νόσου και σε δευτεροπαθή όταν εμφανίζεται ως αποτέλεσμα κάκωσης ή μίας ποικιλίας συγγενών, αναπτυξιακών, φλεγμονωδών και νευρολογικών διαταραχών (π.χ. νόσος Paget, σύνδρομο Ehlers- Danlos, αιμοχρωμάτωση, χονδροασβέστωση, νευροπαθητική αρθροπάθεια, κ.α.). Η ιδιοπαθής σπάνια εμφανίζεται σε άτομα νεαρότερα των 40 ετών, σε αντίθεση με τη δευτεροπαθή η οποία μπορεί να εμφανιστεί και σε νεαρότερες ηλικίες [8].

Οι τυπικές κλινικές εκδηλώσεις της ΟΑ είναι ο έντονος πόνος των προσβεβλημένων αρθρώσεων, η δυσκαμψία και η πλήρης απώλεια της λειτουργικότητας της άρθρωσης στα τελευταία στάδια της νόσου [9]. Όσον αφορά τον πόνο των αρθρώσεων, όσο πιο εκτεταμένη είναι η φθορά του αρθρικού χόνδρου, τόσο ισχυρότερος είναι. Παρόλα αυτά η συσχέτιση του πόνου με το βαθμό φθοράς ποικίλλει μεταξύ των αρθρώσεων αλλά και μεταξύ των διαφόρων ασθενών. Οποιαδήποτε άρθρωση του σώματος μπορεί να προσβληθεί από ΟΑ αν και αρχικά προσβάλλεται μόνο μία άρθρωση (**Εικόνα 2**). Ωστόσο, κάποιες αρθρώσεις (γόνατο, ισχίο, οσφυϊκή και αυχενική μοίρα της σπονδυλικής στήλης) προσβάλλονται συχνότερα εν συγκρίσει με άλλες (αγκώνας, ποδοκνημική).



**Εικόνα 2:** Αρθρώσεις που προσβάλλονται στην ΟΑ.

Η ΟΑ θεωρείται ένα πολυπαραγοντικό νόσημα, καθώς ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισής της έχει σχετιστεί με ένα ευρύ φάσμα παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων της ηλικίας, του φύλου, της παχυσαρκίας (BMI) και της γενετικής προδιάθεσης, περιβαλλοντικών και εμβιομηχανικών παραγόντων, όπως είναι η εκτεταμένη επιβάρυνση της άρθρωσης και η ύπαρξη προϋπάρχουσας πάθησης ή τραυματισμών, καθώς επίσης και μεταβολικών διαταραχών [10,11]. Γενικά, η συχνότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνει με την ηλικία, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι εμφανίζεται αναπόφευκτα με τη γήρανση, επισημαίνεται ωστόσο ότι απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα για την εκδήλωση της κλινικής συμπτωματολογίας [9]. Στους σημαντικούς παράγοντες κινδύνου συγκαταλέγονται επίσης το φύλο και ο δείκτης μάζας σώματος (Bone Mass Index-BMI). Αποτελέσματα μελετών δείχνουν ότι οι γυναίκες εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΑ γόνατος συγκριτικά με τους άντρες, ενώ σημαντική συσχέτιση έχει αναφερθεί μεταξύ του BMI και της

ΟΑ γόνατος [12,13]. Παρά την πολυπαραγοντική αιτιολογία της νόσου, η γενετική προδιάθεση έχει βρεθεί να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ΟΑ με ποσοστό που κυμαίνεται από 39% έως 65% [14,15]. Πράγματι, μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν μόρια του αρθρικού χόνδρου, συμπεριλαμβανομένων μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Extracellular Matrix-ECM), έχουν συσχετιστεί με περιπτώσεις πρώιμης εκδήλωσης της νόσου [16].

Παρόλο που έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στον καθορισμό των πιθανών μηχανισμών που ευθύνονται για τον προοδευτικό εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, τα μοριακά γεγονότα και η παθοφυσιολογία των εκφυλιστικών αλλοιώσεων που οδηγούν στο κλινικό σύνδρομο της ΟΑ έχουν διευκρινιστεί σε πολύ μικρό βαθμό. Ως εκ τούτου, δεν υπάρχουν μέθοδοι για την έγκαιρη διάγνωση σε πρώιμα στάδια ούτε αποτελεσματική θεραπεία, παρά μόνο συμπτωματική αντιμετώπιση της νόσου. Οι σύγχρονες θεραπευτικές μέθοδοι περιορίζονται στη χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών (NSAIDS) με σκοπό την ανακούφιση του ασθενούς από τον πόνο και σε χειρουργική αποκατάσταση της προσβληθείσας άρθρωσης. Γίνεται εκ των ανωτέρω, κατανοητή η επιτακτική ανάγκη για την κατανόηση της παθογένειας της οστεοαρθρίτιδας [17].

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα μόρια της ECM του αρθρικού χόνδρου, πέραν των μοναδικών εμβιομηχανικών ιδιοτήτων που προσδίδουν στον ιστό, διαδραματίζουν και κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης και του μεταβολισμού του, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στη διασφάλιση της ακεραιότητας του ιστού. Στην ΟΑ, υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι τα μόρια της ECM του χόνδρου συμμετέχουν στη ρύθμιση διεργασιών, όπως η φλεγμονή, η υπερτροφία, η απόπτωση των χονδροκυττάρων και η διείσδυση των αιμοφόρων αγγείων, που λαμβάνουν χώρα στα διάφορα στάδια ανάπτυξης της νόσου [16]. Παρόλα αυτά, η λειτουργία πολλών εξ' αυτών των μορίων είναι άγνωστη. Ένα πολλά υποσχόμενο μόριο που έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στην ECM του ΟΑ χόνδρου, αλλά ο λειτουργικός του ρόλος στον ιστό δεν είναι γνωστός, αποτελεί η κυτταροθεμελιακή πρωτεΐνη οστεονεκτίνη (SPARC) [18].

### A.1.1. Η οστεονεκτίνη

Η οστεονεκτίνη, γνωστή και ως SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) ή BM-40 ή πρωτεΐνη 43K, είναι μία πλειοτροπική γλυκοπρωτεΐνη 32-KDa που εντοπίζεται στην ECM των ιστών. Αρχικά, περιγράφηκε από τρεις διαφορετικές ερευνητικές ομάδες ως κύριο μη κολλαγόνο συστατικό των οστών του ανθρώπου και των βοοειδών αλλά και ως μία πρωτεΐνη που εκκρίνεται από κύτταρα που πολλαπλασιάζονται *in vitro* [19]. Σήμερα, ωστόσο είναι γνωστό ότι συναντάται στην ECM πολλών ιστών, συμπεριλαμβανομένου του αρθρικού χόνδρου [19,20].

Η οστεονεκτίνη αποτελεί μέλος της οικογένειας των κυτταροθεμελιακών πρωτεϊνών, οι οποίες παρόλο που συναντώνται στην ECM των ιστών διαδραματίζουν ρυθμιστικό παρά δομικό ρόλο, καθώς διαμεσολαβούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και της ECM, συμμετέχοντας με αυτόν τον τρόπο στη ρύθμιση μίας πληθώρας βιολογικών διεργασιών [21,22]. Οι κυτταροθεμελιακές πρωτεΐνες είναι διαφορετικές από τα κλασσικά μόρια προσκόλλησης, όπως η φιμπρονεκτίνη, η λαμινίνη, τα ινίδια κολλαγόνου τα οποία συμβάλλουν στη δομική σταθερότητα της θεμέλιας ουσίας. Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας, συμπεριλαμβανομένης της οστεονεκτίνης, έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τη λειτουργία των κυττάρων αλληλεπιδρώντας με τους υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας, τους αυξητικούς παράγοντες, τις κυτταροκίνες, τις πρωτεάσες καθώς επίσης και με δομικά στοιχεία της ECM, όπως το κολλαγόνο. Έχει βρεθεί ότι εκφράζονται κυρίως σε ιστούς που υφίστανται διαδικασίες οι οποίες απαιτούν αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων ή μεταξύ των κυττάρων και της ECM, όπως είναι για παράδειγμα η ανανέωση και η ανασύσταση των ιστών και η εμβρυονική ανάπτυξη. Συνεπάγεται ότι διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την ανάπτυξη των ιστών και την παθογένεια ασθενειών [22,23].

Η οστεονεκτίνη, έχει βρεθεί ότι εκφράζεται κυρίως κατά το σχηματισμό των ιστών κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη [24-28]. Παρόλα αυτά, έκφραση της πρωτεΐνης ανευρίσκεται και σε ενήλικους ιστούς, οι οποίοι υπόκεινται διαδικασίες επιδιόρθωσης ή αναδόμησης, όπως σε περιπτώσεις επούλωσης πληγών, ορισμένων νοσημάτων ή σε περιπτώσεις της φυσιολογικής διεργασίας ανανέωσης των ιστών. Παθολογικές καταστάσεις, όπως η αρθρίτιδα, ο σακχαρώδης διαβήτης, νοσήματα των νεφρών και η καρκινική μετάσταση, χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα έκφρασής της [29].

### **A.1.1.1. Το γονίδιο της οστεονεκτίνης**

Η οστεονεκτίνη είναι προϊόν του γονιδίου SPARC ή ON, το οποίο στον άνθρωπο εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 5q31-33 [30], ενώ στον ποντικό στο χρωμόσωμα 11 [31]. Το γονίδιο της οστεονεκτίνης είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένο κατά την εξέλιξη και εμφανίζει υψηλό βαθμό ομολογίας της αλληλουχίας και της οργάνωσής του στα σπονδυλωτά. Συγκεκριμένα, η αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδίου παρουσιάζει 92% ομολογία με την αντίστοιχη του ποντικού [19].

Όσον αφορά το ανθρώπινο γονίδιο έχει μέγεθος 25.9 kb και αποτελείται από 10 εξώνια. Το πρώτο εξώνιο εντοπίζεται στη μη κωδική περιοχή και ακολουθείται από ένα ιντρόνιο μεγάλου μήκους, το οποίο καταλαμβάνει περίπου το μισό μέγεθος του γονιδίου (10.6 kb). Το εξώνιο 10 του γονιδίου SPARC περιέχει ολόκληρη την 3' αμετάφραστη περιοχή (3' untranslated region-3' UTR), η οποία αποτελεί μία περιοχή των γονιδίων που επιδέχεται ρύθμιση και μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην έκφρασή τους [32].

Ο υποκινητής του γονιδίου της οστεονεκτίνης δε φέρει τυπικό κουτί TATA ή CAAT, αλλά αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από πουρίνες, καθώς περιέχει επαναλαμβανόμενα μοτίβα GGA [31,33]. Συγκεκριμένα, αποτελείται από δύο κουτιά GGA, τα GGA 1 και GGA 2, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται μία αλληλουχία 10 bp με χαμηλό περιεχόμενο σε πουρίνες. Τα κουτιά GGA δρουν ρυθμίζοντας θετικά την ενεργότητα του υποκινητή, ενώ αντίθετη δράση επιδεικνύει η παρεμβαλλόμενη αλληλουχία. Αξιοσημείωτο είναι ότι στο κουτί GGA 1 εντοπίζονται τρεις επάλληλες θέσεις πρόσδεσης του υποδοχέα Ρετινοειδούς Χ/Βιταμίνης D (RXR/VDR) μετά από το οποίο ακολουθεί ένα κουτί E [34]. Κατ' επέκταση το SPARC φέρει στοιχεία απόκρισης στο cAMP, σε θερμικό σοκ και σε γλυκοκορτικοειδή και έχει δειχθεί in vitro ότι η έκφρασή του είναι δυνατόν να ρυθμιστεί από το ρετινοϊκό οξύ, τη δεξαμεθαζόνη, το θερμικό σοκ και το βουτυρικό νάτριο [34-36]. Μεταλλάξεις έχουν δείξει ότι, επίσης, ότι αυξητικοί παράγοντες μπορούν να ρυθμίσουν είτε θετικά είτε αρνητικά την έκφρασή του (Πίνακας 1) [37]. Ο υποκινητής του γονιδίου επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι φέρει μία νησίδα CpG 300bp και επιδέχεται ρύθμιση από μεθυλοτρανσφεράσες [38-40].

Το γονίδιο SPARC στον άνθρωπο, κωδικοποιεί δύο μετάγραφα mRNA, ένα μεγέθους 2.2 kb και ένα λιγότερο κοινό μετάγραφο μεγέθους 3.0 kb. Παρά το

γεγονός ότι τα δύο αυτά μετάγραφα φέρουν όμοιες κωδικές αλληλουχίες, διαφέρουν στο ότι το μετάγραφο των 3.0 kb φέρει ένα επιπλέον σήμα πολυαδενυλίωσης [30]. Το mRNA της οστεονεκτίνης είναι πολύ σταθερό με χρόνο ημίσειας ζωής περισσότερο από 24 ώρες, αποτελώντας με ιδανικό μόριο-στόχο για η ρύθμισή του σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο από τα micro-RNAs [41]. Πράγματι, μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε οστεοβλάστες έδειξε ότι το miR-29 προσδένεται σε μία υψηλά συντηρημένη θέση στην 3'UTR του mRNA της οστεονεκτίνης και έχει σαν αποτέλεσμα την αποικοδόμησή του [42].

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ	ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ
Ρετινοϊκό οξύ	FGF-2
Δεξαμεθαζόνη	IL-1
Θερμικό σοκ	TNF-α
TGF-β1	LPS
Ακτιβίνη	PMA
BMP-2	EGF
IGF-1	PDGF
PDGF	Pb <sup>2+</sup>
Λεπτίνη	Γλυκόζη
Ινσουλίνη	Σταμπιλίνη-1

**Πίνακας 1:** Οι παράγοντες που έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου SPARC.

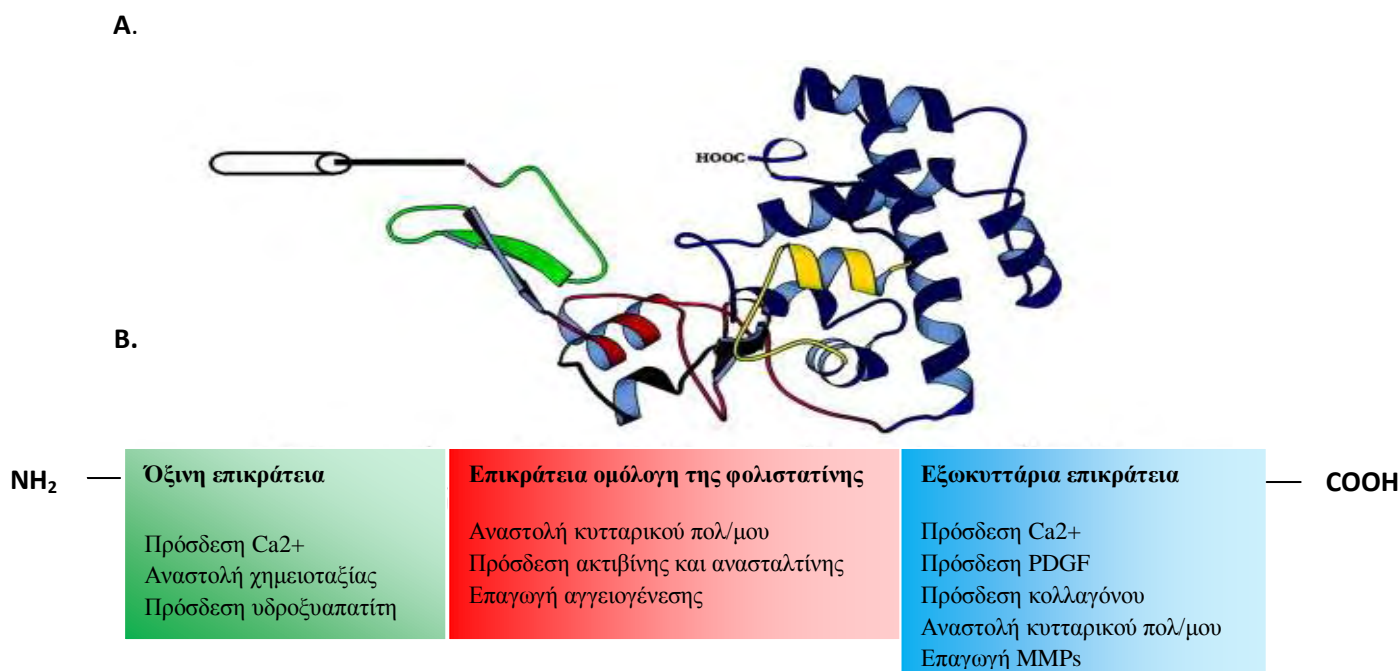
#### A.1.1.2. Η πρωτεΐνη της οστεονεκτίνης

Η αλληλουχία της πρωτεΐνης της οστεονεκτίνης, όπως και το γονίδιό της, εμφανίζει υψηλό βαθμό ομολογίας μεταξύ των ειδών. Η διατήρηση της ακριβούς θέσης των καταλοίπων κυστεΐνης από τον *C.elegans* μέχρι και τον άνθρωπο, υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο που παίζει η αναδίπλωση της πρωτεΐνης στη λειτουργία της. Στον άνθρωπο, η ώριμη μορφή της οστεονεκτίνης αποτελείται από 286 κατάλοιπα και έχει μάζα 32kDa. Ωστόσο, σε ορισμένους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του αρθρικού χόνδρου, η πρωτεΐνη υφίσταται γλυκοζυλίωση και άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με αποτέλεσμα μετά από



ηλεκτροφόρησή της σε πηκτή πολυακρυλαμίδης η πρωτεΐνη να μεταναστεύει στα 40-43kDa [43].

Όσον αφορά τη δομή της, η οστεονεκτίνη αποτελείται από τρεις διακριτές επικράτειες, καθεμία από τις οποίες επιτελεί διαφορετική λειτουργία. Συγκεκριμένα, η N-τελική επικράτεια είναι όξινη και έχει την ικανότητα να προσδένεται στον υδροξυαπατίτη, ένα φωσφορικό ορυκτό του ασβεστίου πλούσιο σε ιόντα υδροξυλίου, που αποτελεί βασικό δομικό συστατικό των οστών. Η δεύτερη επικράτεια είναι μία επικράτεια ομόλογη της φολιστατίνης και έχει την ικανότητα πρόσδεσης στην ηπαρίνη και στις πρωτεογλυκάνες και θεωρείται ότι είναι πιθανό να συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τέλος, η C-τελική επικράτεια είναι ικανή να προσδένει ιόντα ασβεστίου, ορισμένους τύπους κολλαγόνου που σχηματίζουν ίνες και τις μεταλλοπρωτεΐνες (Εικόνα 3). Η πρόσδεση των ιόντων ασβεστίου σε αυτή την επικράτεια μπορεί να επηρεάσει τη στερεοδιάταξή της και να προκαλέσει αλλαγές στην ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο κολλαγόνο και στις μεταλλοπρωτεΐνες [22,37].



**Εικόνα 3 :** Η δομή και οι λειτουργικές ιδιότητες της οστεονεκτίνης. **A.** Η δομή της πρωτεΐνης οστεονεκτίνης του ανθρώπου. Η όξινη επικράτεια απεικονίζεται με πράσινο, η επικράτεια ομόλογη της φολλιστατίνης με κόκκινο και η C-τελική επικράτεια με μπλε. **B.** Οι λειτουργικές ιδιότητες των τριών επικρατειών της πρωτεΐνης.

## **A.1.2. Ο ρόλος της οστεονεκτίνης στην εξωκυττάρια ουσία των ιστών**

Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των κυτταροθεμελιακών πρωτεϊνών, έτσι και η οστεονεκτίνη εμπλέκεται στη ρύθμιση μίας μεγάλης ποικιλίας βιολογικών διεργασιών. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην ικανότητά της να διαμεσολαβεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και της ECM [23, 37]. Έχει βρεθεί επίσης, ότι η οστεονεκτίνη συμμετέχει στην αναδόμηση της ECM των ιστών, αλληλεπιδρά με αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες και τροποποιεί τη δράση τους, προσδένεται σε υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας και επάγει ενδοκυττάρια σήματα και τέλος ασκεί ρυθμιστική δράση σε διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση.

### **A.1.2.1. Ο ρόλος της οστεονεκτίνης στην αναδόμηση της ECM**

Η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τη συγκρότηση, την οργάνωση και την αναδόμηση της ECM των ιστών, μέσω της ικανότητάς της να αλληλεπιδρά και να ασκεί ρυθμιστική δράση στα δομικά συστατικά και τις πρωτεάσες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας [44].

#### **A.1.2.1.1. Η αλληλεπίδραση της οστεονεκτίνης με τα δομικά συστατικά της ECM**

Η οστεονεκτίνη αλληλεπιδρά με έναν μεγάλο αριθμό δομικών συστατικών της ECM, με κυριότερο εκπρόσωπο το κολλαγόνο, μόριο το οποίο συναντάται σε αφθονία στην ECM πολλών ιστών. Στον αρθρικό χόνδρο, το κολλαγόνο καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της ECM του ιστού, συνιστώντας το 60% του ξηρού του βάρους και του παρέχει την ικανότητα να ανταπεξέρχεται σε δυνάμεις εφελκυσμού [16]. Ο κύριος τύπος κολλαγόνου του αρθρικού χόνδρου είναι το κολλαγόνο II, το οποίο συνιστά το 90-95% του συνολικού κολλαγόνου και αποτελεί το κύριο συστατικό των ιών κολλαγόνου στον ενήλικο ιστό. Ο χόνδρος, περιέχει επίσης, μικρότερες ποσότητες άλλων τύπων κολλαγόνου, όπως οι III, V, VI, IX, XII, XIII, XIV και XVI (ή «έλασσον κολλαγόνο») [45,46].

#### **A.1.2.1.1α. Η αλληλεπίδραση της οστεονεκτίνης με το κολλαγόνο**

Η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά τόσο με τύπους του κολλαγόνου που σχηματίζουν ίνες, όπως οι II, III, IV, όσο και με τύπους που έχουν άλλες λειτουργικές ιδιότητες, όπως οι I, IV, VIII, τους οποίους προσδένει με διαφορετική συγγένεια [47]. Ο βαθμός συγγένειας της οστεονεκτίνης με τους διάφορους τύπους κολλαγόνου επηρεάζεται από τα ιόντα ασβεστίου, την πέψη της πρωτεΐνης από πρωτεάσες και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίσταται [43, 48]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η διάσπαση της οστεονεκτίνης από τις MMPs και άλλες πρωτεάσες μπορεί να αυξήσει τη συγγένεια της πρωτεΐνης για το κολλαγόνο τύπων I, II, III, IV και V έως και δέκα φορές, καθώς η πέψη σε συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων αποκαλύπτει τη θέση πρόσδεσης της οστεονεκτίνης στο κολλαγόνο η οποία στην άθικτη πρωτεΐνη είναι μερικώς επικαλυπτόμενη [48]. Επιπλέον, η γλυκοζυλίωση που υφίσταται η οστεονεκτίνη σε ορισμένους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων του αρθρικού χόνδρου και του οστού, επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσής της στο κολλαγόνο. Η οστεονεκτίνη που συναντάται στην εξωκυττάρια ουσία του οστού φέρει δομές πλούσιες στο μονοσακχαρίτη μανόζη και εμφανίζει αυξημένη συγγένεια πρόσδεσης στο κολλαγόνο τύπου I συγκριτικά με τη μη γλυκοζυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης που παράγεται από τα αιμοπετάλια [43].

Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη ρυθμίζει την οργάνωση του κολλαγόνου σε ίνες και την περαιτέρω εναπόθεσή τους στην ECM των ιστών [47]. Μελέτες σε ποντικούς που δεν εκφράζουν οστεονεκτίνη, έχουν δείξει ότι η έλλειψη της πρωτεΐνης οδηγεί σε αλλαγές στη μορφολογία των ινών κολλαγόνου και σε σημαντική μείωση των επιπέδων του στους ιστούς ενήλικων ζώων. Για παράδειγμα, το δέρμα των ζώων αυτών περιέχει τη μισή ποσότητα κολλαγόνου σε σχέση με το δέρμα ποντικών αγρίου τύπου [49-51]. Επιπλέον, οι ίνες του κολλαγόνου σε αυτούς τους ποντικούς είναι μικρότερες και περισσότερο ομοιόμορφες σε διάμετρο, υποδεικνύοντας ότι η οστεονεκτίνη επηρεάζει τη διαδικασία συγκρότησης του κολλαγόνου σε ίνες [52]. Ο Giudici και οι συνεργάτες του έδειξαν με μία *in vitro* μελέτη ότι η ρύθμιση της συγκρότησης του κολλαγόνου σε ίνες από την οστεονεκτίνη λαμβάνει χώρα στα πρώιμα στάδια αυτής της διαδικασίας [53].

Παρόλα αυτά ο μηχανισμός μέσω του οποίου η οστεονεκτίνη συμμετέχει στην οργάνωση του κολλαγόνου σε ίνες δεν είναι γνωστός. Έχει προταθεί από ορισμένες μελέτες ότι η δράση της πρωτεΐνης ασκείται μέσω της ικανότητάς της να ρυθμίζει αρνητικά την αλληλεπίδραση του κολλαγόνου με τους υποδοχείς του, τον υποδοχέα

με επικράτεια δισκοϊδίνης (DDR2- Discoidin Domain Receptor 2) και των υποδοχέων ιντεγκρίνης. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη μπορεί να ρυθμίζει τη συγκρότηση του κολλαγόνου σε ίνες και την εναπόθεσή του στην ECM των ιστών συμμετέχοντας στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίσταται το μόριο, λειτουργώντας ως πρωτεΐνη συνοδός, ή ρυθμίζοντας την ωρίμανση του προκαλλαγόνου σε κολλαγόνο [44].

#### **A.1.2.1.1β. Η αλληλεπίδραση της οστεονεκτίνης με άλλα δομικά συστατικά της ECM**

Η οστεονεκτίνη, εκτός από το κολλαγόνο αλληλεπιδρά και με άλλα δομικά συστατικά της ECM των ιστών, όπως η βιτρονεκτίνη, η ινονεκτίνη, η θρομβοσπονδίνη και η λαμινίνη-1 [54-56]. Στην ECM του αρθρικού χόνδρου συναντώνται οι γλυκοπρωτεΐνες θρομβοσπονδίνη και ινονεκτίνη, οι οποίες και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οργάνωση της ECM τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Στην ΟΑ, τα επίπεδα έκφρασής τους παρατηρούνται αυξημένα και δεδομένα προτείνουν ότι συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου [16, 57,58].

Σύμφωνα με μελέτες, η έλλειψη οστεονεκτίνης, οδηγεί σε μείωση της παραγωγής της ινονεκτίνης, ενώ η παρουσία της ευνοεί την αλληλεπίδραση της ινονεκτίνης και της βιτρονεκτίνης με τους υποδοχείς ιντεγκρίνης στην επιφάνεια των κυττάρων 4T1, μία καρκινική κυτταρική σειρά ποντικού [55, 59]. Ωστόσο, φαίνεται ότι η οστεονεκτίνη ασκεί αντίθετη δράση στη λαμινίνη-1, καθώς σε ποντικούς που δεν εκφράζουν την οστεονεκτίνη ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα έκφρασης της λαμινίνης-1 στο επιθήλιο των φακών του οφθαλμού των ζώων [56].

#### **A.1.2.1.2. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στις MMPs**

Η οστεονεκτίνη ρυθμίζει επίσης, την έκφραση και την ενεργότητα των μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (MMPs). Οι MMPs είναι μία οικογένεια πρωτεασών που αποικοδομούν τις πρωτεΐνες της ECM, λαμβάνοντας με αυτόν τον τρόπο κεντρική θέση στις διεργασίες της αποδόμησης και της ανασύστασης των ιστών που λαμβάνουν χώρα είτε σε φυσιολογικές είτε σε παθολογικές καταστάσεις. Στον αρθρικό χόνδρο εκφράζονται αρκετά μέλη της οικογένειας των MMPs, τα επίπεδα έκφρασης των οποίων αυξάνονται σημαντικά

στην ΟΑ και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου κατά την ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου [60].

Μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη μπορεί να επάγει την ενεργότητα των MMP-1, MMP-3 και MMP-9 σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών αρθρικού υμένα και των μονοκυττάρων περιφερικού αίματος, και των MMP-2 και MMP-14 σε συγκεκριμένους τύπους καρκινικών κυττάρων [61,62]. Ωστόσο, χορήγηση οστεονεκτίνης σε κύτταρα μελανώματος δεν οδήγησε σε αύξηση της ενεργοποίησης της MMP-2, υποδεικνύοντας πιθανόν ότι η δράση που ασκεί η οστεονεκτίνη στις MMPs διαφέρει από ιστό σε ιστό [63-65]. Οι συγκεκριμένες δράσεις της πρωτεΐνης έχειδειχθεί ότι επιτελούνται μέσω των μοτίβων EF hand που φέρει στην C-τελική της επικράτεια [62].

#### **A.1.2.2. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στους αυξητικούς παράγοντες**

Η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την ενεργότητα αυξητικών παραγόντων που έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της ΟΑ, συμπεριλαμβανομένων των TGF-β, bFGF, VEGF, IGF και PDGF. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στους προαναφερθέντες παράγοντες ασκείται είτε άμεσα, όπως ισχύει για τον VEGF, είτε έμμεσα.

##### **A.1.2.2.1. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στον TGF-β**

Ο αναπτυξιακός παράγοντας μετασχηματισμού β (TGF-β), είναι μία πλειοτροπική κυτταροκίνη η οποία έχει την ικανότητα να ρυθμίζει διαδικασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και η μετανάστευση των κυττάρων, διαδραματίζοντας με αυτόν τον τρόπο σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την ομοιόσταση των ιστών. Στον αρθρικό χόνδρο, ο TGF-β, αφενός επάγει τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, αφετέρου αναστέλλει τη διαφοροποίησή τους σε υπερτροφικά. Επίσης, επάγει την παραγωγή και παράλληλα αναστέλλει την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών της ECM και καταστέλλει τις καταβολικές δράσεις μορίων, όπως η IL-1 και ο TNF-α. Στην ΟΑ, ο ρόλος δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος, καθώς ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ο αυξητικός αυτός παράγοντας διατηρεί τις αναβολικές του ιδιότητες και στον ΟΑ χόνδρο, ενώ από την άλλη μεριά υπάρχουν

μελέτες που δείχνουν ότι η χορήγησή του σε φυσιολογική άρθρωση μπορεί να επάγει το σχηματισμό οστεοφύτων, φλεγμονή και ινοπλασία του αρθρικού υμένα [66-68].

Όπως προαναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, ο TGF-β μπορεί να επάγει την έκφραση της οστεονεκτίνης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των χονδροκυττάρων [37]. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι και η οστεονεκτίνη μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση και την ενεργότητα του TGF-β. Μελέτες σε μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού έδειξαν ότι η οστεονεκτίνη, επάγει την έκφραση και την ενεργότητα του TGF-β, ενώ επιπλέον μελέτες και σε άλλους κυτταρικούς τύπους έδειξαν ότι μπορεί να επάγει τη φωσφορυλίωση της Smad2, μίας πρωτεΐνης που συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιεί ο αυξητικός παράγοντας [69-71]. Παρόλα αυτά, μελέτες σε εμβρυονικά κύτταρα νεφρού προερχόμενα από τον άνθρωπο (HEK293) και περικύτταρα, έδειξαν ότι η οστεονεκτίνη επιδρά αρνητικά στον TGF-β (72). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η οστεονεκτίνη ασκεί τη δράση της στον TGF-β δεν είναι γνωστός, άλλα πρόσφατη μελέτη σε περικύτταρα έδειξε ότι η γλυκοπρωτεΐνη έχει την ικανότητα να προσδένεται στην ενδογλυκίνη, μία μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που συναντάται στην κυτταρική επιφάνεια και αποτελεί μέρος του υποδοχέα του TGF-β (TGF-βR), και να ρυθμίζει την ενεργότητα της ιντεγκρίνης  $\alpha_v$  [73].

Τα αντικρουόμενα αυτά δεδομένα σχετικά με τη δράση της οστεονεκτίνης στον αυξητικό παράγοντα TGF-β, πιθανόν να οφείλονται στα διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγει ο TGF-β στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, το μικροπεριβάλλον του κάθε ιστού και/ή την πηγή της οστεονεκτίνης που χρησιμοποιήθηκε σε καθέναν από τους παραπάνω πειραματικούς χειρισμούς. Είναι επιπλέον πιθανόν, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοζυλίωση, που υφίσταται η γλυκοπρωτεΐνη σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους να τροποποιούν τις δράσεις και τις ενεργότητές της [43].

#### **A.1.2.2.2. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στον FGF-2**

Ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών 2 (FGF-2), γνωστός και ως βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (bFGF), είναι μέλος μίας οικογένειας αυξητικών παραγόντων που έχουν μιτογόνο, αγγειγόνο και νευροτροφική δράση. Ως εκ τούτου, συμμετέχουν σε μία πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών διαδικασιών, όπως είναι η ανάπτυξη των άκρων, η αγγειογένεση, η επούλωση των πληγών και η ανάπτυξη των όγκων [74]. Στην ΟΑ, ο FGF-2, θεωρείται ότι ασκεί

μιτογόνο δράση στα χονδροκύτταρα και αναστέλλει την ενεργότητα των αναβολικών παραγόντων, όπως οι IGF-1 και BMP-7 [68]. Οι FGFs ασκούν τη δράση τους μέσω πρόσδεσης σε μέλη της οικογένειας των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης FGFR.

Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι η οστεονεκτίνη ασκεί αρνητική δράση στην ενεργότητα του FGF-2. Μελέτες χορήγησης οστεονεκτίνης σε κύτταρα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη οδηγεί σε αναστολή της φωσφορυλίωσης του FGFR-1, του υποδοχέα μέσω του οποίου ο FGF-2 ασκεί τις δράσεις του, και της περαιτέρω ενεργοποίησης της MAPK και της σύνθεσης του DNA που φυσιολογικά επάγει ο αυξητικός παράγοντας [75]. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η οστεονεκτίνη ασκεί τη ρυθμιστική της δράση στον FGF-2, δεν είναι γνωστός, καθώς μελέτες απέτυχαν να δείξουν άμεση πρόσδεση της οστεονεκτίνης στον αυξητικό παράγοντα [75-76]. Παρόλα αυτά, μία μελέτη έχει δείξει ότι η ανασταλτική δράση της οστεονεκτίνης στον FGF-2 και στον VEGF-A, έναν άλλον αυξητικό παράγοντα, ασκείται από την ίδια περιοχή της πρωτεΐνης, προτείνοντας έτσι ότι η δράση της στον FGF-2 πιθανόν να ασκείται έμμεσα μέσω της αρνητικής ρύθμισης που ασκεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ των VEGF-A και VEGFR1, προϋποθέτοντας συνεργιστική δράση μεταξύ των δύο αυξητικών παραγόντων [77].

#### **A.1.2.2.3. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στον VEGF**

Ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) ασκεί τη δράση του μέσω των υποδοχέων VEGFR και είναι γνωστός για τον κεντρικό ρόλο που κατέχει στη διαδικασία της αγγειογένεσης. Η αγγειογένεση λαμβάνει χώρα σε ένα μεγάλο εύρος φυσιολογικών και παθολογικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένων των τελευταίων σταδίων ανάπτυξης της ΟΑ. Στον αρθρικό χόνδρο παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα έκφρασης του VEGF κατά την ανάπτυξη της νόσου και θεωρείται ότι ο αυξητικός παράγοντας συμβάλλει στην παθογένεια και την εξέλιξή της [78].

Η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τη δράση του VEGF-A. Ο VEGF-A ασκεί τη δράση του μέσω πρόσδεσης στους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2. Ο υποδοχέας VEGFR-2 είναι ο κύριος υποδοχέας μέσω του οποίου ο αυξητικός παράγοντας επάγει τις δράσεις του, ενώ η λειτουργία του VEGFR-1 θεωρείται ότι είναι επικουρική, έχοντας την ικανότητα να τροποποιεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγει ο πρώτος [79]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη προσδένεται άμεσα στον VEGF-A παρεμποδίζοντας την πρόσδεσή του στον VEGFR-1 και αναστέλλοντας την επακόλουθη φωσφορυλίωσή του [80,81]. Αυτή η δράση της

οστεονεκτίνης έχειδειχθεί ότι ενισχύει τη σηματοδότηση που επάγει ο αυξητικός παράγοντας μέσω του VEGFR-2 πιθανόν μέσω αναστολής της στρατολόγησης της φωσφατάσης SHP-1 στον υποδοχέα και επακόλουθης ενεργοποίησής του μέσω φωσφορυλίωσης [77,82].

#### **A.1.2.2.4. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στους αυξητικούς παράγοντες IGF και PDGF**

Ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1) είναι γνωστός για τις αναβολικές του δράσεις στους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του αρθρικού χόνδρου. Τα επίπεδα έκφρασης του αυξητικού παράγοντα και του υποδοχέα του στην ΟΑ παρατηρούνται αυξημένα, αλλά οι αναβολικές τους δράσεις καταστέλλονται από άλλα μόρια που, επίσης εκφράζονται σε αυξημένα επίπεδα στην ΟΑ [68]. Μελέτες έχουν δείξει, επίσης, ότι η οστεονεκτίνη ασκεί ρυθμιστική δράση στον IGF-1. Μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού που δεν εκφράζουν την οστεονεκτίνη εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα του αυξητικού παράγοντα. Επίσης, χορήγηση οστεονεκτίνης οδήγησε σε μείωση της μεταγραφής των γονιδίων των IGFs και IGFR1, της επακόλουθης φωσφορυλίωσης της ERK1/2, της έκφρασης της κυκλίνης D1, ενώ οδήγησε σε αύξηση του αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p27. Μελέτες απέτυχαν να ανιχνεύσουν άμεση πρόσδεση της πρωτεΐνης στον IFG [83].

Έχειδειχθεί επίσης, ότι η οστεονεκτίνη μπορεί να προσδεθεί στον PDGF και να μειώσει την ικανότητα πρόσδεσης του στον υποδοχέα του [77]. Στον αρθρικό χόνδρο, ο PDGF ασκεί θετική ρυθμιστική δράση στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων και επάγει την παραγωγή των πρωτεογλυκανών [84,85].

#### **A.1.2.3. Η πρόσδεση της οστεονεκτίνης σε υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας**

Μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να προσδένεται άμεσα σε υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας και να επάγει ενδοκυττάρια σήματα. Η οστεονεκτίνη έχειδειχθεί ότι είναι ικανή να προσδένεται σε υποδοχείς ιντεγκρινών, στη σταμπιλίνη-1 και στην πρωτεΐνη προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων 1 (VCAM-1) [77,86]. Στον αρθρικό χόνδρο έχει βρεθεί ότι εκφράζονται οι υποδοχείς



ιντεγκρινών, οι οποίοι μεσολαβούν τη δράση πολλών μορίων που συμμετέχουν στην παθογένεια της ΟΑ και η VCAM-1.

#### **A.1.2.3.1. Οι υποδοχείς ιντεγκρινών**

Αρκετές είναι οι μελέτες που έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να προσδένεται σε υποδοχείς ιντεγκρινών και να επάγει ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια [87]. Οι ιντεγκρίνες είναι υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας που μεταγουν σήματα από την ECM στα κύτταρα, συμμετέχοντας έτσι στη ρύθμιση του κυτταρικού τους κύκλου, το σχήμα και την κινητικότητα.

Οι ιντεγκρίνες σχηματίζουν ετεροδιμερή που αποτελούνται από ομάδες α και β σε διάφορους συνδυασμούς. Η ενδοκυττάρια επικράτεια της β υπομονάδας των ιντεγκρινών αλληλεπιδρά με την ILK, η οποία ενεργοποιεί καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Η ILK έχει την ικανότητα να φωσφορυλιώνει μόρια-στόχους, όπως τις Akt, GSK3β και την β υπομονάδα των ιντεγκρινών [88]. Μελέτη έχει δείξει ότι η οστεονεκτίνη αλληλεπιδρά με την υπομονάδα β1 και ακολούθως ενισχύει την ενεργοποίηση της ILK σε επιθηλιακά κύτταρα του φακού των οφθαλμών [87].

Μελέτες σε προλιποκύτταρα έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη προσδένεται στο σύμπλοκο ιντεγκρινών α5β1 [89]. Ωστόσο, άλλες μελέτες σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη και κύτταρα προερχόμενα από οδοντικό πολφό ανθρώπου έδειξαν ότι η γλυκοπρωτεΐνη ασκεί τη δράση της μέσω των υποδοχέων ιντεγκρίνης ανβ5 και ανβ3 και όχι μέσω των α5β1 και α2β1, υποδεικνύοντας ότι το ακριβές σύμπλοκο των υποδοχέων ιντεγκρίνης στο οποίο προσδένεται η οστεονεκτίνη και ασκεί τις δράσεις ποικίλλει μεταξύ των κυτταρικών τύπων [90,91].

#### **A.1.2.3.2. Η πρωτεΐνη προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων 1 (VCAM-1)**

Η VCAM-1 είναι μία σιαλογλυκοπρωτεΐνη κυτταρικής επιφανείας που προσδένεται σε υποδοχείς ιντεγκρίνης και επάγει τη συσσώρευση των κυττάρων [92]. Αρχικά βρέθηκε ότι εκφράζεται στο ενδοθήλιο των αγγείων που εκτίθεται σε κυτταροκίνες, όπου προωθεί την προσκόλληση των λευκοκυττάρων και τα προσελκύει σε περιοχές φλεγμονής. Στον αρθρικό χόνδρο, η VCAM-1 εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των μικροαγγείων, τους ινοβλάστες του αρθρικού υμένα και στα χονδροκύτταρα [93]. Στα χονδροκύτταρα, η έκφρασή της επάγεται από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ο TNF-α και η IL-1, και το υαλουρονικό οξύ, κύριο συστατικό της ECM του αρθρικού χόνδρου. Αυξημένα επίπεδα της πιθανόν

αντανακλούν βλάβες στον ιστό ή την ύπαρξη φλεγμονής. Επιπλέον, η VCAM-1 έχειδειχθεί ότι επάγει την αλληλεπίδραση των χονδροκυττάρων με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, συνεισφέροντας, συνεισφέροντας στον περαιτέρω εκφυλισμό του ιστού [94,95]. Μελέτες *in vivo* και *in vitro* έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη προσδένει τη VCAM-1 και ενισχύει την ενεργότητά της [96].

#### **A.1.2.4. Σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγει η οστεονεκτίνη**

Η οστεονεκτίνη μέσω της ικανότητάς της να αλληλεπιδρά με μόρια της ECM, να ρυθμίζει τη δράση αυξητικών παραγόντων και να προσδένεται σε υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας, έχει την ικανότητα να συμμετέχει σε διάφορα κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των μονοπατιών Wnt/ $\beta$ -κατενίνη, PI3K/Akt και MAPK.

##### **A.1.2.4.1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -κατενίνη**

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -κατενίνη, είναι ένα μονοπάτι που παίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη του σκελετικού συστήματος κατά την εμβρυογένεση, καθώς ρυθμίζει την τελική διαφοροποίηση των προγονικών μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες και χονδροκύτταρα. Στα χονδροκύτταρα, καταστέλλει τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε χονδροκύτταρα, αλλά απαιτείται για τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά [97]. Μελέτες έχουν δείξει ότι το μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -κατενίνη εμπλέκεται και στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, μία διαδικασία που λαμβάνει χώρα στα τελευταία στάδια ανάπτυξης της ΟΑ [98].

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να επάγει την ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -κατενίνη. Ο Nie και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η οστεονεκτίνη μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση της ILK, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται και αναστέλλει την ενεργότητα της GSK3 και οδηγεί σε συσσώρευση της  $\beta$ -κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των κυττάρων. Η  $\beta$ -κατενίνη σχηματίζει σύμπλοκο με τους μεταγραφικούς παράγοντες TCF/LEF και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που προάγουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε οστεοβλάστες [99].

#### **A.1.2.4.2. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια PI3K/Akt και MAPK**

Μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη μπορεί να επάγει ή να αναστείλλει την ενεργοποίηση των μονοπατιών PI3K/Akt και MAPK σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, τα οποία μπορεί να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή/και με το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη που επάγει η πρωτεΐνη [86].

#### **A.1.2.5. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στην επιβίωση των κυττάρων**

Η οστεονεκτίνη είναι ικανή να συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης των κυττάρων. Μελέτες σε διάφορους κυτταρικούς τύπους έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο και κατά επέκταση τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [100]. Ωστόσο, έχειδειχθεί ότι μπορεί να ενισχύσει τη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων όταν αυτά υποβάλλονται σε στρες [101]. Τα δεδομένα για τη δράση της οστεονεκτίνης στην απόπτωση των κυττάρων είναι αντικρουόμενα, καθώς ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι ασκεί προστατευτική δράση στα κύτταρα από την απόπτωση, ενώ άλλες ότι μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση κασπασών, οδηγώντας τα κύτταρα σε θάνατο. Συνεπάγεται, ότι είναι πιθανό η δράση της οστεονεκτίνης στην κυτταρική απόπτωση να διαφέρει από κυτταρικό τύπο σε κυτταρικό τύπο και πιθανόν να επηρεάζεται από άλλους παράγοντες της ECM και/ή τους τύπους των υποδοχέων που φέρει ο εκάστοτε κυτταρικός τύπος [100,102].

#### **A.1.3. Ο ρόλος της οστεονεκτίνης στα οστά**

Η οστεονεκτίνη αποτελεί μία από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες που συναντώνται στην εξωκυττάρια ουσία του οστού, καταλαμβάνοντας το 25% των μη κολλαγόνων πρωτεϊνών [103]. Ωστόσο, ο ρόλος της στο σκελετικό σύστημα δεν είναι πλήρως κατανοητός.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες αναδόμησης του οστού και διατήρησης της οστικής μάζας, καθώς ποντικοί που δεν εκφράζουν την οστεονεκτίνη αναπτύσσουν οστεοπενία χαμηλής δραστηριότητας (low-turnover), μία μορφή της νόσου που χαρακτηρίζεται από διαταραχή της οστικής αναδόμησης. Άλλες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι στα ζώα αυτά παρατηρούνται μειωμένες εμβιομηχανικές ιδιότητες και μειωμένη ποιότητα της

ECM του συμπαγούς οστού και αυξημένη λιπογένεση στο μυελό των οστών. Η οστεοπενία που εμφανίζουν οι ποντικοί αυτοί θεωρείται ότι οφείλεται σε μείωση του αριθμού των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, της οστικής μάζας και των ρυθμών αναδόμησης του οστού λόγω έλλειψης της οστεονεκτίνης. Η αυξημένη λιπογένεση που παρατηρείται έχει δειχθεί με *in vitro* και *in vivo* μελέτες ότι οφείλεται στην ικανότητα της οστεονεκτίνης να προωθεί τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες παρά σε λιποκύτταρα και να συμβάλλει στην επιβίωση των πρώτων [104,105]. Τις παραπάνω απόψεις ενισχύουν και δεδομένα από διάφορες μορφές οστεοπενίας, όπως η ατελής οστεογένεση και το σύνδρομο του εύθραυστου οστού, σε ζωικά μοντέλα, στις οποίες παρατηρείται μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης [106].

Μελέτες έχουν δείξει, επίσης, ότι η οστεονεκτίνη συμβάλλει σημαντικά και στη διαδικασία σχηματισμού του καινούριου οστού που λαμβάνει χώρα μετά από τραυματισμό, καθώς τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυξάνονται άμεσα μετά από τραυματισμό του οστού και τα κύτταρα του περιόστεου αρχίζουν διαδικασίες πολλαπλασιασμού και εναπόθεσης εξωκυττάριας ουσίας. Η άποψη αυτή ενισχύεται από μελέτες σε ζωικά μοντέλα διατακτικής οστεογένεσης, όπου παρατηρήθηκε ότι η οστεονεκτίνη εκφράζεται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα και τους οστεοβλάστες, κατά τη διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, τη διαδικασία σχηματισμού των μακρών οστών από προσχηματισμένο χόνδρο κατά την εμβρυογένεση [104,105].

Σε αντίθεση με τα παραπάνω δεδομένα, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα της οστεονεκτίνης στο οστό ποντικών που πάσχουν από οστεοπόρωση, οδηγώντας πιθανόν σε αύξηση του αριθμού των οστεοβλαστών και κατά συνέπεια των επιπέδων αναδόμησης του οστού. Η ίδια μελέτη έδειξε, ότι η πρωτεΐνη προκαλεί παράλληλα και αύξηση του αριθμού των λιποκυττάρων στο οστό, υποδεικνύοντας την πολλαπλή δράση της οστεονεκτίνης στον ιστό.

#### **A.1.4. Ο ρόλος της οστεονεκτίνης στο λιπώδη ιστό**

Η οστεονεκτίνη, εκτός από το οστό, παράγεται από διάφορους άλλους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του λιπώδους ιστού, ο οποίος αποτελεί σημαντική πηγή παραγωγής της πρωτεΐνης στον οργανισμό. Η οστεονεκτίνη παράγεται από τα λιποκύτταρα του ιστού και στη συνέχεια εκκρίνεται στην κυκλοφορία. Μάλιστα, τα επίπεδά της στην κυκλοφορία σχετίζονται θετικά με το BMI των ατόμων,

υποδεικνύοντας ότι η πλειοψηφία της πρωτεΐνης που συναντάται στην κυκλοφορία προέρχεται από το λιπώδη ιστό [107,108]. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης mRNA της πρωτεΐνης είναι αυξημένα στο λιπώδη ιστό παχύσαρκων ατόμων και μπορούν να αυξηθούν με την περαιτέρω πρόσληψη βάρους και να μειωθούν με την απώλειά του [107]. Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι η λεπτίνη, μία λιποκίνη που παίζει σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην ομοιοστασία του λιπώδους ιστού, αλλά και γενικότερα του οργανισμού, αυξάνει τα επίπεδα της οστεονεκτίνης, συμβάλλοντας πιθανόν στα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης που παρατηρούνται στο λιπώδη ιστό παχύσαρκων ατόμων, ενώ αντίθετα η οστεονεκτίνη οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της λεπτίνης [107,109]. Η λεπτίνη έχειδειχθεί ότι συμμετέχει στην παθογένεια της ΟΑ [110].

Στο λιπώδη ιστό, η οστεονεκτίνη έχει επίσης την ικανότητα να ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, όπως προαναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη αναστέλλει τη διαφοροποίηση των πρόδρομων λιποκυττάρων σε ώριμα κύτταρα πιθανόν μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -κατενίνης και της περαιτέρω αναστολής της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της λιπογένεσης [109].

## A.2. Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms- SNPs)

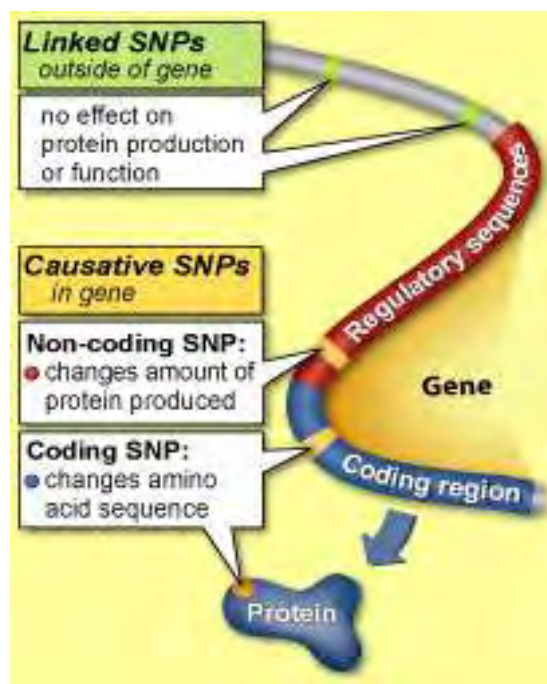
Είναι ευρέως αποδεκτό ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα είναι πολυμορφικό με τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs) να αποτελούν την πιο κοινή μορφή πολυμορφισμών [111]. Πρόκειται για μονονουκλεοτιδικές αλλαγές στην αλληλουχία του DNA (Εικόνα 4), οι οποίες εμφανίζονται με συχνότητα περίπου 1/300 νουκλεοτίδια [112,113].



**Εικόνα 4:** Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs).

Συμπεραίνεται ότι υπάρχουν περίπου 10 εκατομμύρια SNPs [114] (από τα οποία τα 4 εκατομμύρια είναι ήδη γνωστά) [115,116] μέσα στις 3 δισεκατομμύρια βάσεις του ανθρώπινου γονιδιώματος και στην παρουσία αυτών οφείλεται το 90% της ανθρώπινης ποικιλομορφίας, όπως η διαφορετικότητα του κάθε ατόμου, όπως η εμφάνιση, η απόκριση σε φάρμακα, η ευπάθεια σε διάφορες ασθένειες [111]. Παρόλα αυτά δεν θεωρείται SNP οποιαδήποτε μονονουκλεοτιδική αλλαγή αλλά μόνο όταν εμφανίζεται με συχνότητα τουλάχιστον >1% στο γενικό πληθυσμό [117].

SNPs δεν εντοπίζονται απαραίτητα μέσα σε γονίδια και ως εκ τούτου δεν επηρεάζουν πάντα τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Χωρίζονται σε 2 διακριτές κατηγορίες (Εικόνα 5). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν αυτά που δεν εντοπίζονται μέσα σε γονίδια (π.χ. περιοχές μεταξύ γονιδίων) και δεν επιδρούν στη λειτουργικότητα του πρωτεϊνικού προϊόντος (linked ή indicative SNPs). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει SNPs, τα οποία επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο λειτουργεί η πρωτεΐνη (causative SNPs) και ταξινομούνται σε 2 υποκατηγορίες, τα κωδικοποιούντα (coding SNPs) και τα μη κωδικοποιούντα (non-coding SNPs). Τα πρώτα



Εικόνα 5: Εντοπισμός SNPs.

εντοπίζονται μέσα στην κωδική περιοχή ενός γονιδίου και διακρίνονται σε συνώνυμα (synonymous, όταν η μονονουκλεοτιδική αλλαγή δεν οδηγεί σε αλλαγή αμινοξικού καταλοίπου) και σε μη-συνώνυμα (non-synonymous, όταν αλλάζει η αμινοξική αλληλουχία). Τα μη κωδικοποιούντα εντοπίζονται σε ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου (ιντρόνια, περιοχή υποκινητή, 3' και 5' αμετάφραστες περιοχές) και αλλάζουν το επίπεδο της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και ως εκ τούτου πόσο RNA και πρωτεΐνη παράγονται [117].

Παρόλο που τα περισσότερα δεν είναι ευθύνονται για ασθένειες ούτε έχουν κάποια επίδρασης στην κυτταρική λειτουργία, αποτελούν πολύτιμο εργαλείο στη γενετική, καθώς χρησιμεύουν ως δείκτες για τον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με συγκεκριμένη ασθένεια, άλλα και γιατί πιθανόν να βοηθούν στην πρόβλεψη του τρόπου με τον οποίο το άτομο αποκρίνεται σε φαρμακευτική αγωγή, στην ευπάθεια σε περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και της προδιάθεσης για ανάπτυξη μίας

ασθένειας. Χρησιμοποιούνται επίσης για έλεγχο πατρότητας, μελέτες συσχέτισης και σε προσπάθειες εξατομικευμένης ιατρικής. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν επίσης για την ανίχνευση της κληρονομικής γονιδίων που προδιαθέτουν για μία ασθένεια ανάμεσα σε οικογένειες [118,119]. Οι SNPs αποτελούν σημαντική πηγή για τη μελέτη γενετικά σύνθετων και πολυπαραγοντικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, της νόσου Alzheimer, του διαβήτη, καρδιαγγειακών ασθενειών αλλά και της οστεοαρθρίτιδας [120, 134]. Αν και ο πολυμορφισμός από μόνος του δεν επαρκεί για να προβλέψει την γενετική προδιάθεση πολυπαραγοντικών ασθενειών, δεδομένου ότι πολλοί γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν ρόλο, ωστόσο ανοίγει το δρόμο για περαιτέρω διερεύνηση.

SNPs που εντοπίζονται μέσα στην κωδική περιοχή γονιδίων δύναται να τροποποιήσουν την αμινοξική αλληλουχία της παραγόμενης πρωτεΐνης, μέσω μη-συνώνυμων (non-synonymous) αλλαγών [121-124]. Αυτές οι αλλαγές με τη σειρά τους, πιθανόν να έχουν αντίκτυπο στη δομή και τη λειτουργία του εκάστοτε πρωτεϊνικού προϊόντος. SNPs που βρίσκονται σε αμετάφραστες περιοχές (Untranslated region, UTR-SNPs), επιδρούν στη γονιδιακή έκφραση με το να επηρεάζουν ρυθμιστικά στοιχεία ή τη σταθερότητα του mRNA [125-127]. Μέχρι και σήμερα, βιοχημικά στοιχεία του τρόπου με τον οποίο UTR-SNPs, επηρεάζουν τη γονιδιακή λειτουργία είναι σπάνια. Η 5'UTR καθίσταται σημαντική καθώς περιέχει στοιχεία τα οποία ρυθμίζουν τη μεταγραφή (π.χ. μέσω μεθυλίωσης), τη μετάφραση (μέσω internal ribosomal entry fragments) αλλά και τη σταθερότητα του mRNA [128,129]. Εξίσου σημαντική με την 5'UTR, φαίνεται να είναι και η 3'UTR, όσον αφορά τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Πράγματι, πέραν του καλά καθορισμένου ρόλου της πολυαδενυλιωμένης ουράς, που προσδίδει στο mRNA προστασία από την αποικοδομητική δράση εξωνουκλεασών, υπάρχει ένας αριθμός μοτίβων μέσα στην 3'UTR που ρυθμίζουν τη σταθερότητα και την αποτελεσματικότητα με την οποία μεταφράζεται, συμπεριλαμβάνοντας θέσεις πρόσδεσης των micro-RNAs [130,131].

### **A.2.1. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί και οστεοαρθρίτιδα**

Πριν καν διενεργηθεί οποιαδήποτε προσέγγιση μοριακής γενετικής της φύσης της ΟΑ, ένας αριθμός επιδημιολογικών μελετών παρείχε σημαντικά στοιχεία σχετικά με τη γενετική συνιστώσα της ΟΑ, τοποθετώντας τη νόσο στην κατηγορία της

πολυγονιδιακής και πολυπαραγοντικής νόσου [132]. Αν και η οστεοαρθρίτιδα είναι νόσος με πολυπαραγοντική αιτιολογία, η γενετική προδιάθεση έχει βρεθεί να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ασθένειας με ποσοστό που κυμαίνεται από 39%-65% [14,15]. Στοιχεία που επιβεβαιώνουν την επίδραση του γονιδιώματος προέρχονται από ποικίλες πηγές, όπως μελέτες οικογενειών, μελέτες διδύμων, διερεύνηση σπάνιων γενετικών ανωμαλιών που σχετίζονται με την ΟΑ (π.χ. χονδροδυσπλασία), αναλύσεις σύνδεσης και συσχέτισης υποψηφίων γονιδίων, καθώς και μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-wide association scans-GWAS). Οι μελέτες γενετικής σύνδεσης, απέτυχαν να ανιχνεύσουν γονίδια που υποκρύπτουν αλληλόμορφα τα οποία σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΟΑ, παρόλο που είχε μελετηθεί και αναλυθεί μεγάλο μέρος του γονιδιώματος. Μεγάλη πρόοδος ακολουθήθηκε, όταν οι αναλύσεις σύνδεσης αντικαταστάθηκαν από τις αναλύσεις γενετικής συσχέτισης και ιδιαίτερα όταν οι μελέτες γενετικής συσχέτισης διενεργούνται σε μεγάλο αριθμό ατόμων (case-control cohorts) και με πυκνούς χάρτες πολυμορφικών μαρτύρων [134].

Μελέτες σύνδεσης και συσχέτισης γονιδίων αλλά και μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWASs), σε συνδυασμό με αρκετές, επαρκούς ισχύος, μελέτες υποψηφίων γονιδίων (Candidate gene studies), έχουν προσδιορίσει έναν αρκετά ικανοποιητικό αριθμό «αλληλομόρφων κινδύνου» (risk alleles) που σχετίζονται με την εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας. Αυτός ο αριθμός είναι τόσο ικανοποιητικός ώστε να μπορούν να διεξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη φύση της γενετικής προδιάθεσης, συμπεριλαμβάνοντας το γεγονός ότι τα «αλληλόμορφα κινδύνου», έχουν ποικίλες επιδράσεις στο προφίλ της ασθένειας, οι οποίες εξαρτώνται παραδείγματος χάριν στο φύλο, την εθνικότητα ακόμα και την άρθρωση η οποία προσβάλλεται [133]. Αρκετά από τα αλληλόμορφα που προέκυψαν από τις GWASs, εντοπίζονται μέσα ή κοντά σε γονίδια τα οποία σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τη νόσο. Παρόλα αυτά, τα περισσότερα από τα αλληλόμορφα αυτά δεν σχετίζονται άμεσα με γονίδια τα οποία είχαν αναφερθεί προηγουμένως να παίζουν ρόλο στη βιολογία του μυοσκελετικού συστήματος, υποδεικνύοντας ότι οι GWASs, μας αποκαλύπτουν καινούρια δεδομένα σχετικά με γονίδια που σχετίζονται με μηχανισμούς και διαδικασίες που χαρακτηρίζουν την ΟΑ.

Μεταξύ άλλων γονιδίων, πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν μόρια του αρθρικού χόνδρου, συμπεριλαμβανομένων των μορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, έχουν συσχετιστεί με περιπτώσεις πρώιμης εκδήλωσης της νόσου. Στους



**Πίνακες 2 και 3** που ακολουθούν παρουσιάζονται μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε γονίδια και συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές που σχετίζονται με κίνδυνο εμφάνισης ΟΑ, όπως έχει προκύψει από αναλύσεις γενετικής συσχέτισης συνυπολογίζοντας δεδομένα τόσο από μελέτες υποψηφίων γονιδίων (candidate gene studies) όσο και από μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (σύμφωνα με αποτελέσματα μεγάλων πολυκεντρικών μελετών: μελέτη Rotterdam, arcOGEN) [134].

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ	ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ	ΑΡΘΡΩΣΗ	ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ
<b>GDF5</b>	20q11.22	rs143383	Γόνατο/Ισχίο	Ασιάτες/Ευρωπαίοι
<b>SMAD3</b>	15q22.33	rs12901499	Γόνατο/Ισχίο	Ευρωπαίοι
<b>ASPN</b>	9q22.31	Τρινουκλεοτιδική επανάληψη κωδικονίου ασπαρτικού οξέος	Γόνατο	Ασιάτες
<b>EDG2/LPAR1</b>	9q31.3	rs10980705	Γόνατο	Ασιάτες
<b>CALM1</b>	14q24-q31	rs12885713	Ισχίο	Ασιάτες
<b>DIO2</b>	14q31.1	rs225014/rs12885300	Ισχίο	Ασιάτες/Ευρωπαίοι
<b>DIO3</b>	14q32.31	rs945006	Γόνατο/Ισχίο	Ευρωπαίοι
<b>SREBF2</b>	22q13.2	rs2228314	Γόνατο	Ευρωπαίοι

**Πίνακας 2:** Γονίδια που σχετίζονται με την ΟΑ μέσω μελέτης υποψηφίων γονιδίων.

ΜΕΛΕΤΗ	SNP	ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ	ΓΟΝΙΔΙΟ
<b>Rotterdam</b>	rs3815148	7q22	PRKAR2B/HPB1/COG5/GPR22/DUS4L/BCAP29
<b>ArcOGEN</b>	rs6976	3p21.1	STAB1/NT5DC2/PBRM1/GNL3/GLT8D1/SPCS1/NEK4/ITIH1,3,4/MUSTN1/TMEM110
<b>ArcOGEN</b>	rs12107036	3q28	TP63
<b>ArcOGEN</b>	rs10948172	6p21.1	SUPT3H/RUNX2
<b>ArcOGEN</b>	rs9350591	6q13-q14.1	COL12A1/COX7A2/TMEM30A/FILIP1/SENPA6/MYO6/IMPG1
<b>ArcOGEN</b>	rs4836732	9q33.1	PAPPA/ASTN2/TRIM32
<b>ArcOGEN</b>	rs10492367	12p11.22	KLHDC5/PTHLH
<b>ArcOGEN</b>	rs835487	12q23.3	CHST11
<b>ArcOGEN</b>	rs8044769	16q12.2	FTO

**Πίνακας 3:** SNPs που σχετίζονται με την ΟΑ μέσω GWAS, σύμφωνα με αποτελέσματα των Rotterdam και arcOGEN μελετών.

### A.2.2. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του SPARC

Αρκετοί πολυμορφισμοί του γονιδίου της οστεονεκτίνης, SPARC, οι οποίοι μπορεί να εντοπίζονται σε ιντρόνια, εξώνια, σε αμετάφραστες περιοχές ή ανάμεσα σε άλλα γονίδια έχουν εμπλακεί και συσχετιστεί με διάφορες ασθένειες. Υπάρχουν μελέτες που προσπάθησαν να ανιχνεύσουν μία συσχέτιση ανάμεσα σε πολυμορφισμούς του SPARC και σε διαταραχές του συνδετικού ιστού και του μυοσκελετικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, η ομάδα των Zhou και συνεργατών πρότειναν μία συσχέτιση μεταξύ SNPs στην 3' UTR του SPARC και κλινικών εκδηλώσεων της συστηματικής σκλήρυνσης [135]. Συγκεκριμένα, βρήκανε ότι ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός +998 C→G σχετίζεται με την προδιάθεση για συστηματική σκλήρυνση. Πρόκειται για μία ινώδη νόσο του συνδετικού ιστού κατά την οποία η έκφραση της οστεονεκτίνης αυξάνεται σε πολλαπλά όργανα.. Ωστόσο, μία επακόλουθη μελέτη, στην οποία εξετάστηκαν οχτώ SNPs, συμπεριλαμβανομένου και του προαναφερθέντος πολυμορφισμού (5 SNPs στην 3'UTR, 2 SNPs στην περιοχή του υποκινητή και 1 SNP σε εξώνιο χωρίς όμως να επηρεάζει την αμινοξική αλληλουχία) σε διαφορετική ομάδα ασθενών από την προηγούμενη, απέτυχε να τεκμηριώσει άμεση συσχέτιση μεταξύ μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του SPARC και της συστηματικής σκλήρυνσης [136]. Τέλος, τα αποτελέσματα μίας ακόμα μελέτης έδειξαν ότι απλότυποι στην 3'UTR του SPARC εμφανίζονται με διαφορετική συχνότητα σε καυκάσιες γυναίκες με ιδιοπαθή οστεοπόρωση συγκριτικά με φυσιολογικές [137]. Εξήχθη το συμπέρασμα ότι η οστεονεκτίνη ρυθμίζει την αναδόμηση του σκελετικού συστήματος και τη διατήρηση της οστικής μάζας σε ζώα καθώς επίσης και ότι απλότυποι στην 3'UTR του SPARC σχετίζονται με μείωση της οστικής πυκνότητας στους συγκεκριμένους ασθενείς.

Αρκετοί είναι οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του SPARC που έχουν συσχετιστεί με ευπάθεια σε διάφορους τύπους καρκίνου. Η έκφραση του γονιδίου ποικίλλει σε διαφορετικές μορφές καρκίνου και ο ρόλος στην ογκογένεση είναι πολύπλοκος και παραμένει αμφιλεγόμενος, αν και έχει αναφερθεί ότι αυξημένη έκφραση του παρατηρείται κατά την εξέλιξη του καρκίνου και τις μεταστατικές διαδικασίες [29]. Μία μεγάλη προσπάθεια πραγματοποιήθηκε και μελετήθηκε ένα ευρύ φάσμα SNPs στην 5' και 3'UTR του γονιδίου της οστεονεκτίνης και αρκετοί από αυτούς σχετίστηκαν με κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου [138]. Μία άλλη ομάδα, ανίχνευσε τον συνώνυμο μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό 66A>G (rs2304052) να

συνδέεται με τον κίνδυνο εμφάνισης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, χωρίς ο λειτουργικός του ρόλος στην έκφραση του SPARC να είναι γνωστός [139]. Μία πιο πρόσφατη μελέτη, ανίχνευσε πέντε SNPs που εντοπίζονται στην 3' UTR του SPARC να αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για την πρόγνωση του αδενοκαρκινώματος στομάχου [140]. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου της οστεονεκτίνης δεν έχουν μέχρι στιγμής διερευνηθεί στην εκφυλιστική αρθρίτιδα.

### A.3. ΣΚΟΠΟΣ

Η οστεονεκτίνη, μία πλειοτροπική κυτταροθεμελιακή πρωτεΐνη της ECM του αρθρικού χόνδρου, η έκφραση της οποίας έχει βρεθεί αυξημένη στην οστεοαρθρίτιδα, τόσο σύμφωνα με μία μελέτη του Nakamura και των συνεργατών του όσο σύμφωνα και με αδημοσίευτα δεδομένα του εργαστηρίου μας [18]. Παρόλα αυτά δεν είναι γνωστός ο ρόλος της στη φυσιολογία του ιστού και την παθοφυσιολογία της νόσου. Λαμβάνοντας υπόψη αφενός ότι η οστεονεκτίνη εμπλέκεται στην ΟΑ και αφετέρου ότι οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί χρησιμεύουν στη γενετική διερεύνηση πολυπαραγοντικών ασθενειών, όπως η ΟΑ, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η συσχέτιση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού +12647 G>C (rs1053411) με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν:

- ◆ *Η συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων και των αλληλομόρφων του SNP +12647 G>C στα άτομα της ομάδας ελέγχου και σε αυτά της ομάδας μελέτης.*
- ◆ *Η συσχέτιση μεταξύ γονοτύπων και αλληλομόρφων του SNP +12647 G>C και κλινικών παραμέτρων, όπως το φύλο, η ηλικία, ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) και ο βαθμός αλλοίωσης του χόνδρου (κλίμακα K/L).*

## **Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## B.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### B.1.1. Συλλογή δειγμάτων

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε περιφερικό αίμα, το οποίο ελήφθη από ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Στη διαδικασία συλλογής δειγμάτων συμπεριλήφθησαν ασθενείς που υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική γόνατος λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ και ασθενείς – χωρίς ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων- με σοβαρά κατάγματα ή ακρωτηριασμούς που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

Συγκεκριμένα, στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 691 δείγματα περιφερικού αίματος, εκ των οποίων τα 341 προήλθαν από ασθενείς με ΟΑ και αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης (65 άνδρες / 276 γυναίκες) και τα υπόλοιπα 350 από ασθενείς που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (152 άνδρες / 198 γυναίκες). Ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, χονδροδυσπλασία, ΟΑ μετά από σηπτική αρθρίτιδα και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Το εύρος ηλικίας, το βάρος και ο BMI της ομάδας ελέγχου και της ομάδας μελέτης παρατίθενται λεπτομερώς στους **Πίνακες 4 και 5** αντίστοιχα.

Επιπλέον, για κάθε ασθενή ελήφθησαν κλινικά δεδομένα σχετικά με το βαθμό της φυσικής τους κατάστασης, την παρουσία πόνου, δυσκαμψίας, διόγκωσης της άρθρωσης καθώς και άλλων νοσημάτων. Πριν την υποβολή των ασθενών σε ολική αρθροπλαστική, έγινε ακτινογραφικός έλεγχος και αξιολόγηση των ακτινολογικών ευρημάτων με βάση την κλίμακα Kellgren-Laurence, μία κλίμακα που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της εξέλιξης της ΟΑ [141]. Όλοι οι ασθενείς που αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης βαθμολογήθηκαν με 2 - 4 στην κλίμακα Kellgren-Laurence.

Στοιχεία ομάδας ελέγχου	Ηλικία	Βάρος	BMI
Μέσος όρος	60	73	25,58
Μέγιστος	90	102	34,24
Ελάχιστος	8	30	16,62
Τυπική Απόκλιση	15	10	3,52

**Πίνακας 4:** Αναλυτικά στοιχεία για την ηλικία, το βάρος και το BMI των 350 ασθενών που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

Στοιχεία ομάδας μελέτης	Ηλικία	Βάρος	BMI
Μέσος όρος	68	78	29,95
Μέγιστος	91	120	44,28
Ελάχιστος	24	50	20,06
Τυπική Απόκλιση	9	12	4,30

**Πίνακας 5:** Αναλυτικά στοιχεία για την ηλικία, το βάρος και το BMI των 341 ασθενών που αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης.

### **B.1.2. Επιλογή του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού του SPARC +12647 G>C (rs1053411)**

Όπως προαναφέρθηκε σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η συσχέτιση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του γονιδίου της οστεονεκτίνης SPARC με την ασθένεια της ΟΑ. Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, όπως αναφέρθηκε ήδη στην προηγούμενη ενότητα, αρκετές είναι οι μελέτες που έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στην ανίχνευση SNPs στην 3'UTR του συγκεκριμένου γονιδίου. Αυτό εξαιτίας του κρίσιμου ρόλου που διαδραματίζει αυτή η περιοχή στην σταθερότητα του μεταγράφου. Στις περισσότερες από τις μελέτες, έχουν διατυπωθεί υποθέσεις σχετικά με την πιθανή ύπαρξη ρυθμιστικών στοιχείων σε αυτή την περιοχή που πιθανόν η ενεργότητά τους επηρεάζεται από την ύπαρξη SNPs [137]. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι πιθανόν οι πολυμορφισμοί στην 3'UTR να βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με ρυθμιστικά στοιχεία- κλειδιά που δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί και κατά αυτόν τον τρόπο να επηρεάζεται η γονιδιακή έκφραση [137].

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία το ενδιαφέρον εστιάστηκε στην ανεύρεση SNP στην 3'UTR του SPARC και στη συσχέτισή του με την οστεοαρθρίτιδα. Σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων για SNPs (dbSNP) του Εθνικού Κέντρου για Πληροφορίες Βιοτεχνολογίας (National Center for Biotechnology Information- NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), προκύπτει ότι υπάρχουν συνολικά 2649 SNPs του SPARC σε διάφορους οργανισμούς, ενώ οι 697 εντοπίζονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Από αυτούς, οι 62 βρίσκονται στην 3'UTR. Ωστόσο, η επιλογή του κατάλληλου προς μελέτη μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων μας, έγινε βάσει της συχνότητας του πιο σπάνιου αλληλομόρφου (Minor Allele Frequency- MAF), η

οποία προτιμάται να είναι μεγαλύτερη του 0,05 και να μην είναι πολύ συχνό στον πληθυσμό συνυπολογίζοντας πάντα τον αριθμό των ατόμων που μελετήθηκαν.

Με βάση τα κριτήρια αυτά, καταλήξαμε στον μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό +12647 G>C (rs1053411), ο οποίος εντοπίζεται στην 3'UTR του SPARC και πιο συγκεκριμένα στη θέση +12647 της αλληλουχίας του DNA και στη θέση 1144 του mRNA. Τα πολυμορφικά αλληλόμορφα είναι τα C και G, με το C να εμφανίζεται με τη μικρότερη συχνότητα στους Ευρωπαίους (MAF: C=0.2048/446).

### B.1.3. Απομόνωση DNA από αίμα

#### Προετοιμασία:

- Διατηρούμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου (αφήνουμε τα αίματα να ξεπαγώσουν).
- Ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο στους 70°C.
- Βεβαιωνόμαστε ότι τα διαλύματα (buffers): Binding Buffer, Inhibitor Removal Buffer, Wash Buffer, το Elution Buffer, καθώς επίσης η πρωτεΐνάση K (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, 68298 Mannheim, Germany και η ισοπροπανόλη είναι έτοιμα και διαθέσιμα.

Συγκεκριμένα:

- ◆ Πριν ξεκινήσει η διαδικασία απομόνωσης, θερμαίνουμε το Elution Buffer στο υδατόλουτρο στους 70°C.
- ◆ Τα Binding Buffer, Inhibitor Removal Buffer, Wash Buffer και η ισοπροπανόλη διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου (15°C -25°C).
- ◆ Η πρωτεΐνάση K, διατηρείται σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από -15°C μέχρι -25°C (περιμένουμε να ξεπαγώσει και έπειτα την προσθέτουμε στο δείγμα μας).
- Χρειαζόμαστε 2 πιπέτες (100 και 1000) και τα αντίστοιχα tips καθώς επίσης και ένα στατό στο οποίο τοποθετούμε τα σωληνάρια (eppendorfs).

Σημείωση: Για τα δείγματα, χρειαζόμαστε 2 σωληνάρια (eppendorfs) (χωρίς καπάκι), αρχικά, τελικά για το DNA και με φίλτρο.

#### Διαδικασία:

1. Σε καθένα από τα σωληνάρια (eppendorfs) του 1,5 ml τοποθετούμε 200 μl αίματος.



2. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 200 μl Binding Buffer και 40 μl πρωτεϊνάση K. Αναδεύουμε αμέσως και τοποθετούμε τα δείγματα στο υδατόλουτρο, στους 70°C για 10 λεπτά.
3. Έπειτα, προσθέτουμε 100μl ισοπροπανόλη, αναδεύουμε πολύ καλά και μεταφέρουμε το μείγμα σε High Pure filter tube (2ml collection tube-σωληνάριο συλλογής των 2ml), κλείνουμε το καπάκι και φυγοκεντρούμε στις 8000 rpm για 1 λεπτό.
4. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης πετάμε το σωληνάριο συλλογής και τοποθετούμε το High Pure filter tube σε καθαρό σωληνάριο συλλογής.
5. Προσεκτικά, ανοίγουμε τη στήλη και προσθέτουμε 500 μl Inhibitor Removal Buffer και φυγοκεντρούμε στις 8000 rpm για 1 λεπτό.
6. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης πετάμε το σωληνάριο συλλογής και τοποθετούμε το High Pure filter tube σε καθαρό σωληνάριο.
7. Προσεκτικά, ανοίγουμε τη στήλη και προσθέτουμε 500 μl Wash Buffer και φυγοκεντρούμε στις 8000 rpm για 1 λεπτό.
8. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης πετάμε το σωληνάριο συλλογής και τοποθετούμε το High Pure filter tube σε καθαρό σωληνάριο συλλογής.
9. Προσεκτικά, ανοίγουμε τη στήλη και προσθέτουμε ξανά 500 μl Wash Buffer και φυγοκεντρούμε στις 8000 rpm για 1 λεπτό.
10. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης απομακρύνουμε το περιεχόμενο του σωληναρίου συλλογής αλλά όχι το σωληνάριο συλλογής. Φυγοκεντρούμε στο μέγιστο (13000 rpm) για 10 δευτερόλεπτα και έπειτα πετάμε το collection tube και μεταφέρουμε τη στήλη σε καθαρό σωληνάριο (eppendorf) του 1,5 ml.
11. Προσθέτουμε 50 μl Elution Buffer και φυγοκεντρούμε στις 8000 rpm για 1 λεπτό.
12. Επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρωση για ακόμα μία φορά.
13. Απομακρύνουμε τη στήλη με το φίλτρο και το μεταφέρουμε το σωληνάριο (eppendorf) του 1,5 ml που περιέχει το DNA στους -20°C μέχρι την επόμενη χρήση.

#### **B.1.4. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ (Allelic Discrimination Assays)**

Η δοκιμασία διαχωρισμού των αλληλομόρφων είναι μία πολλαπλή (περισσότερα από ένα ζεύγος εκκινητών/ανιχνευτών (probes) ανά αντίδραση) δοκιμασία τελικού σημείου (τα δεδομένα συλλέγονται και αναλύονται στο τέλος της διαδικασίας της

αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου- RT-PCR), η οποία χρησιμεύει προκειμένου να καθοριστεί ο γονότυπος μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας-στόχου. Η παρουσία δύο ζευγών εκκινητών/ανιχνευτών σε κάθε αντίδραση επιτρέπει τη γονοτύπηση των δύο πιθανών παραλλαγών ενός μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού που εντοπίζονται σε μία συγκεκριμένη θέση στην αλληλουχία-στόχο.

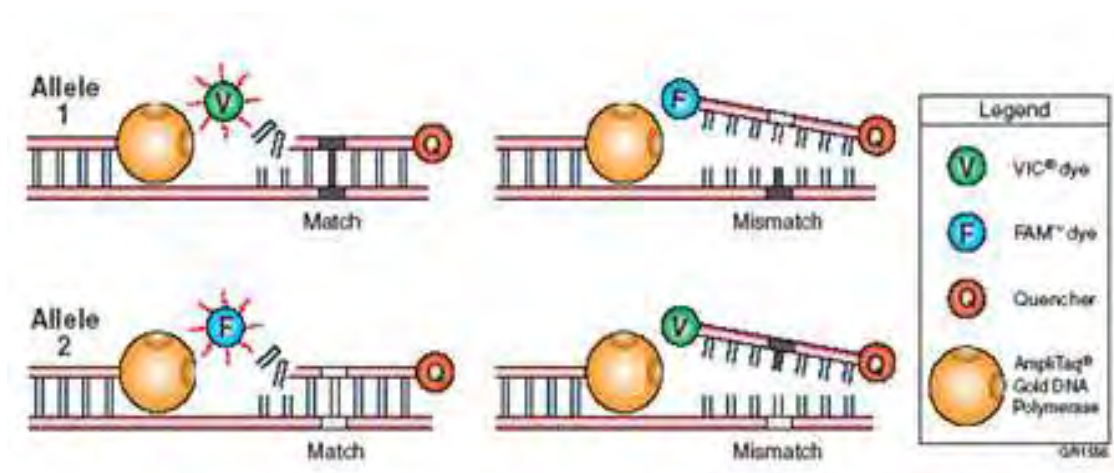
Στη διαδικασία διαχωρισμού των αλληλομόρφων, για κάθε δείγμα χρησιμοποιείται ένα μοναδικό ζεύγος ειδικών ανιχνευτών προς μέτρηση των επιπέδων φθορισμού της υπό μελέτη πολυμορφικής θέσης-στόχο [142,143]. Ο ένας ανιχνευτής ταιριάζει απόλυτα με το αλλήλιο 1 και ο άλλος είναι απόλυτα ειδικός για το αλλήλιο 2.

Η διαδικασία διαχωρισμού αλληλομόρφων βασίζεται στη χημεία της φθορίζουσας 5'νουκλεάσης (αλλιώς γνωστή ως TaqMan® probe-based chemistry) καθώς οι φθορίζουσες χρωστικές είναι συνδεδεμένες στο 5'άκρο του ανιχνευτή (probe) ειδικού για το κάθε αλλήλιο. Οι ανιχνευτές και οι εκκινητές επελέχθησαν σύμφωνα με το TaqMan® SNP Genotyping Assays.

Στη διαδικασία διαχωρισμού των αλληλομόρφων, η PCR περιλαμβάνει έναν ειδικό, φθορίζον και σημασμένο με χρωστική ανιχνευτή. Στην παρούσα διαδικασία, χρησιμοποιήθηκαν δύο TaqMan MGB ανιχνευτές σημασμένοι με διαφορετικές χρωστικές αναφοράς (ο ένας σημασμένος με τη φθορίζουσα χρωστική VIC® και ο άλλος με τη FAM™) προκειμένου να διαφοροποιηθεί η ενίσχυση κάθε αλληλομόρφου και να υπολογιστεί η αλλαγή στο φθορισμό των χρωστικών (VIC® και FAM™) που σχετίζονται με τους ανιχνευτές(probes).Ο κάθε ανιχνευτής (probe) διαθέτει επίσης και μία μη φθορίζουσα χρωστική στο 3'άκρο (Non-fluorescent quencher-NFQ).

Κατά τη διάρκεια της PCR κάθε ανιχνευτής υβριδοποιείται ειδικά (anneal) στις συμπληρωματικές αλληλουχίες ανάμεσα στις θέσεις οι οποίες έχουν οριστεί από τους εκκινητές (forward/reverse). Η **Εικόνα 6** παρακάτω απεικονίζει αποτελέσματα από τη συμπληρωματικότητα ή μη ανάμεσα στην αλληλουχία του ανιχνευτή και της αλληλουχίας-στόχου [144]. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase), αφαιρεί τη φθορίζουσα χρωστική μόνο από αυτούς τους ανιχνευτές (probes) που υβριδοποιήθηκαν με τις αλληλουχίες που περιέχουν τα πολυμορφικά αλληλόμορφα. Αυτή η αφαίρεση έχει σαν αποτέλεσμα να αυξηθεί το σήμα φθορισμού της εκάστοτε χρωστικής. Το αποτέλεσμα είναι το σήμα φθορισμού

που ενισχύεται από την PCR να υποδεικνύει τα αλληλόμορφα που είναι παρόντα σε κάθε δείγμα γενωμικού DNA.



**Εικόνα 6:** Συμπληρωματικότητα ή μη ανάμεσα στην αλληλουχία που περιέχει το σήμα φθορισμού και της αλληλουχίας-στόχου.

Για την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή 7900HT Fast Real-Time PCR System (7900HT Fast System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και η διάκριση των αλληλομόρφων πραγματοποιήθηκε στο 7900HT Fast System σε 384-well reaction plates. Ο παρακάτω **Πίνακας 6**, δείχνει τη συσχέτιση ανάμεσα στα σήματα φθορισμού και το γονότυπο στην παρούσα εργασία.

<i>Μία σημαντική αύξηση στην.....</i>	<i>Υποδεικνύει.....</i>
<b>VIC<sup>®</sup> φθορίζουσα χρωστική</b>	Ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο C
<b>FAM<sup>™</sup> φθορίζουσα χρωστική</b>	Ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο G
<b>και στα δύο σήματα φθορισμού</b>	Ετεροζυγωτία (Αλληλόμορφο C+G)

**Πίνακας 6:** Σχέση ανάμεσα στα σήματα φθορισμού και γονοτύπου.

### Πειραματική διαδικασία:

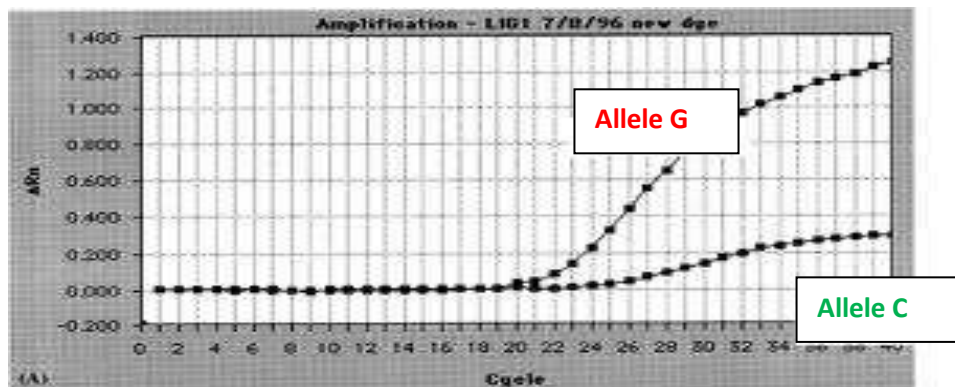
Αφού σχεδιαστεί η πειραματική διαδικασία για τη διάκριση αλληλίων και προετοιμαστούν τα δείγματα DNA, χρειάζεται να πραγματοποιηθεί:

- Μία διαδικασία ενίσχυσης (amplification run), χρησιμοποιώντας το Standard Curve (AQ) plate document, προκειμένου να δημιουργηθούν τα δεδομένα της real-time PCR.

- Μία διαδικασία διάκρισης των αλληλομόρφων (allelic discrimination run), χρησιμοποιώντας το Allelic Discrimination plate document, το οποίο είναι ένα SDS λογισμικό βάσει του οποίου θα αναλυθούν τα δεδομένα της real-time PCR.

Η διαδικασία απεικονίζεται στην παρακάτω αλληλουχία:

Sample DNA → Perform Amplification Run → Perform and Analyse an AD run



**Εικόνα 7:** Η εικόνα που βλέπουμε στο τέλος της διαδικασίας.

### Προετοιμασία δειγμάτων:

Αφού απομονώθηκε το DNA από το περιφερικό αίμα σύμφωνα με το προηγούμενο πρωτόκολλο, υπολογίζουμε τον αριθμό των αντιδράσεων που θα πραγματοποιηθούν και τον όγκο των συστατικών που χρειάζονται για όλα τα πηγαδάκια του reaction plate και ετοιμάζουμε το διάλυμα της αντίδρασης (mix), το οποίο για κάθε δείγμα περιέχει:

- Master Mix : TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (2X) No AmpErase UNG<sup>®</sup>: 2,50 μl
- SNP Genotyping Assay Mix (20X): 0,25 μl

- 
- Συνολικά: 2,75 μl

Ο τελικός όγκος κάθε δείγματος είναι τα 5μl, οπότε στα 2,75 μl του διαλύματος αντίδρασης που έχουμε προσθέσει σε κάθε πηγαδάκι, προσθέτουμε 2,25μl δείγματος DNA.

#### To SNP Genotyping Assay Mix (20X) περιέχει :

- τους ειδικούς εκκινητές (forward/reverse) για την ενίσχυση της πολυμορφικής θέσης.
- 2 TaqMan® MGB probes: έναν σημασμένο με VIC® και έναν ακόμα σημασμένο με FAM™.

#### To TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) No AmpErase UNG®:

- την AmpliTaq Gold® DNA Polymerase καθώς επίσης και όλα τα αντιδραστήρια που είναι απαραίτητα για τη διεξαγωγή μίας αντίδρασης PCR, όπως το ρυθμιστικό διάλυμα, τα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) , και το MgCl<sub>2</sub>.

#### Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- Ενεργοποίηση της AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, για 10 λεπτά στους 95°C.
- 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου ως εξής:
  - Υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών/ανιχνευτών στη θερμοκρασία του σημείου τήξεως (melting temperature- Tm), για 15 δευτερόλεπτα στους 92°C.
  - Υβριδοποίηση/Επιμήκυνση για 1 λεπτό στους 60°C.

### **B.1.5. Στατιστική ανάλυση**

Για την κατανομή των γονοτύπων, τη συχνότητα των αλληλομόρφων και τη συσχέτισή τους με μεταβλητές, όπως το φύλο, ο BMI και η κλίμακα Kellgren-Laurence, χρησιμοποιήσαμε το  $\chi^2$  test και η ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες (Two-way Anova) χωρίς αλληλεπίδραση, όπου ήταν απαραίτητο. Ο λόγος αναλογιών (Odds Ratio-OR) και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης (Confidence Interval- CI), υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το Fischer's exact test όπου ήταν απαραίτητο. Η στάθμη σημαντικότητας (p-value) που αναφέρεται για κάθε δοκιμασία, βασίστηκε σε two-sided tests και σε κάθε περίπτωση στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές με  $p < 0,05$ . Για τη στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα στατιστικής SPSS Statistics 20.

## B.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### B.2.1. Μελέτη συσχέτισης: Συσχέτιση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) +12647 G>C (rs1053411) του γονιδίου SPARC με την προδιάθεση για ανάπτυξη ΟΑ.

Δεδομένου ότι το γονίδιο της οστεονεκτίνης, SPARC ή ON παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στην οστεοαρθρίτιδα, αλληλεπιδρά με παράγοντες που εμπλέκονται άμεσα στην παθοφυσιολογία της οστεοαρθρίτιδας και συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία κατέχουν κεντρικό ρόλο κατά την ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου, μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του συγκεκριμένου γονιδίου πιθανόν να σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Προς αυτή την κατεύθυνση, στην παρούσα εργασία, μελετήσαμε τη συσχέτιση ανάμεσα στον μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό +12647 G>C (rs1053411) με MAF: C = 0,2048/446 και τον κίνδυνο για ανάπτυξη οστεοαρθρίτιδας. Βρήκαμε στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα εμφάνισης του ομόζυγου παθολογικού γονοτύπου CC ( $p = 0,05$ , OR = 4,180) στα 350 άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου και στα 341 άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης. Παρατηρείται ως εκ τούτου συσχέτιση του γονοτύπου CC με την προδιάθεση για ΟΑ. Καμία σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης του ομόζυγου φυσιολογικού (GG) και του ετερόζυγου γονοτύπου (CG) ( $p > 0,05$ , OR = 0,873) στις ομάδες ελέγχου και μελέτης, όπως ισχύει και για τη συχνότητα των αλληλόμορφων G και C ( $p > 0,05$ , OR = 1.139). Αναλυτικά τα αποτελέσματα σχετικά με την κατανομή της συχνότητας εμφάνισης των γονοτύπων και των αλληλομόρφων παρουσιάζονται στους Πίνακες 7 και 8 αντίστοιχα.

Πραγματοποιήθηκε επίσης, στατιστική ανάλυση σχετικά με τον τρόπο που το φύλο σχετίζεται με τη συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων αλλά και των αλληλομόρφων στις δύο ομάδες που μελετήσαμε. Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο σχετικά με τη συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων ( $p = 0,548$ ) όσο και με τη συχνότητα των αλληλομόρφων ( $p = 0,545$ ) (Πίνακας 9).

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η συσχέτιση ανάμεσα στην ηλικία, τον πιο σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση ΟΑ, και τη συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων /

αλληλομόρφων και δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0,439 / p=0,388$  αντίστοιχα) (Πίνακας 10).

Μελετήθηκε επίσης, ο τρόπος με τον οποίο ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη ΟΑ, ο δείκτης μάζας σώματος (BMI), επηρεάζει με τη σειρά του τη συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων και αλληλομόρφων στις υπό μελέτη ομάδες και καταδείχθηκε ότι ο BMI δεν επηρεάζει ούτε την εμφάνιση των γονοτύπων ( $p=0,321$ ) ούτε αλληλομόρφων ( $p=0,331$ ) (Πίνακας 11).

Τέλος, η συχνότητα με την οποία εμφανίζονται γονότυποι ( $p=0,157$ ) και αλληλόμορφα ( $p=0,483$ ) στον υπό μελέτη πληθυσμό δεν σχετίζεται με το βαθμό αλλοίωσης του χόνδρου (κλίμακα Kellgren-Laurence) (Πίνακας 12).

SNP ID	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (%)		p value	OR (95% CI)
		Ομ. μελέτης (n=341)	Ομ. ελέγχου (n=350)		
rs1053411	GG	267 (78,3%)	277 (79,1%)		
	GC	66 (19,4%)	71 (20,3%)	p=0,483	0,873 (0,598-1,276)
	CC	8 (2,3%)	2 (0,6%)	p=0,051	4,180 (0,881-19,828)

Πίνακας 7: Γονότυποι του πολυμορφισμού rs1053411 του γονιδίου SPARC σε σχέση με την ασθένεια της οστεοαρθρίτιδας.

SNP ID	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (%)		p value	OR (95% CI)
		Ομ. μελέτης (n=682)	Ομ. ελέγχου (n=700)		
rs1053411	G	600 (88%)	625 (89,3%)		
	C	82 (12%)	75 (10,7%)	p=0,443	1,139 (0,817-1,588)

Πίνακας 8: Αλληλόμορφα του πολυμορφισμού rs1053411 του γονιδίου SPARC σε σχέση με την ασθένεια της οστεοαρθρίτιδας.

ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (%) - ΓΥΝΑΙΚΕΣ		ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (%) - ΑΝΔΡΕΣ	
	Ομ. μελέτης (n=276)	Ομ. ελέγχου (n=198)	Ομ. μελέτης (n=65)	Ομ. ελέγχου (n=152)
GG	218 (79%)	154 (78%)	49 (75%)	123 (81%)
GC	50 (18%)	42 (21%)	16 (25%)	29 (19%)
CC	8 (3%)	2 (1%)	0 (0%)	0 (0%)
ΑΛΛΗΛΙΑ				
	Ομ. μελέτης	Ομ. ελέγχου	Ομ. μελέτης	Ομ. ελέγχου

	(n=552)	(n=396)	(n=130)	(n=304)
G	486 (88%)	350 (88%)	114 (88%)	275 (90%)
C	66 (12%)	46 (12%)	16 (12%)	29 (10%)

**Πίνακας 9:** Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων και αλληλομόρφων στους άνδρες και γυναίκες των ομάδων μελέτης και ελέγχου .

ΗΛΙΚΙΑ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (%)	
		Ομ. μελέτης (n=326)	Ομ. ελέγχου (n=327)
ΟΜΑΔΑ Ι (20-40)	GG	4 (1,23%)	25 (7,65%)
	GC	1 (0,31%)	5 (1,53%)
	CC	0 (0%)	0 (0%)
ΟΜΑΔΑ ΙΙ (41-60)	GG	43 (13,19%)	110 (33,64%)
	GC	6 (1,84%)	24 (7,34%)
	CC	2 (0,61%)	1 (0,31%)
ΟΜΑΔΑ ΙΙΙ (>61)	GG	206 (63,19%)	124 (37,92%)
	GC	60 (18,4%)	37 (11,3%)
	CC	4 (1,23%)	1 (0,31%)
ΑΛΛΗΛΙΑ			
		Ομ. μελέτης (n=652)	Ομ. ελέγχου (n=654)
ΟΜΑΔΑ Ι (20-40)	G	9 (1,4%)	55 (8,41%)
	C	1 (0,2%)	5 (0,76%)
ΟΜΑΔΑ ΙΙ (21-60)	G	92 (14,1%)	244 (37,31%)
	C	10 (1,5%)	26 (3,98%)
ΟΜΑΔΑ ΙΙΙ (>61)	G	472 (72,4%)	285 (43,58%)
	C	68 (10,4%)	39 (5,96%)

**Πίνακας 10:** Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων και αλληλομόρφων σε σχέση με την ηλικία.

BMI (kg/m <sup>2</sup> )	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (%)	
		Ομ. μελέτης (n=306)	Ομ. ελέγχου (n=276)
ΟΜΑΔΑ Ι (<18,50))	GG	23 (7,5%)	94 (34,1%)
	GC	10 (3,3%)	18 (6,5%)
	CC	2 (0,7%)	1 (0,4%)
ΟΜΑΔΑ ΙΙ (18,50-24,99)	GG	104 (34%)	104 (37,7%)
	GC	17 (5,6%)	28 (10,1%)
	CC	2 (0,7%)	0 (0%)
ΟΜΑΔΑ ΙΙΙ (25-24,99)	GG	110 (36%)	19 (6,9%)
	GC	37 (12,1%)	9 (3,3%)
	CC	1 (0,3%)	0 (0%)
ΟΜΑΔΑ ΙV (>30)	GG	0 (0%)	3 (1%)
	GC	0 (0%)	0 (0%)
	CC	0 (0%)	0 (0%)
ΑΛΛΗΛΙΑ			
		Ομ. μελέτης (n=612)	Ομ. ελέγχου (n=552)
ΟΜΑΔΑ Ι (<18,50)	G	55 (9,15%)	206 (37,32%)
	C	14 (2,29%)	20 (3,62%)
ΟΜΑΔΑ ΙΙ (18,50-24,99)	G	225 (36,76%)	236 (42,75%)
	C	21 (3,43%)	28 (5,07%)



ΟΜΑΔΑ ΙΙΙ (25-29,99)	G	257 (42%)	47 (8,51%)
	C	39 (6,37%)	9 (1,63%)
ΟΜΑΔΑ ΙV (>30)	G	0 (0%)	6 (1,1%)
	C	0 (0%)	0 (0%)

**Πίνακας 11:** Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων και αλληλομόρφων σε σχέση με τον BMI. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ), καθορίζεται ότι άτομα με BMI <18,50 kg/m<sup>2</sup> είναι υπόβαρα, με BMI από 18,50 kg/m<sup>2</sup> μέχρι 24,99 kg/m<sup>2</sup> είναι φυσιολογικά, με BMI από 25 kg/m<sup>2</sup> μέχρι 29,99 kg/m<sup>2</sup> είναι υπέρβαρα και άτομα με BMI >30 kg/m<sup>2</sup> είναι παχύσαρκα.

ΚΛΙΜΑΚΑ K/L	ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (%)	ΑΛΛΗΛΙΑ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (%)
		n=312		n=624
ΟΜΑΔΑ Ι (K/L=2)	GG	3 (1%)	G	6 (1%)
	GC	0 (0%)	C	2 (0,3%)
	CC	1 (0,3%)		
ΟΜΑΔΑ ΙΙ (K/L=3)	GG	21 (6,7%)	G	48 (7,7%)
	GC	6 (1,9%)	C	8 (1,3%)
	CC	1 (0,3%)		
ΟΜΑΔΑ ΙΙΙ (K/L=4)	GG	219 (70,2%)	G	493 (79%)
	GC	55 (17,6%)	C	67 (10,7%)
	CC	6 (1,9%)		

**Πίνακας 12:** Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων και αλληλομόρφων σε σχέση με το βαθμό αλλοίωσης του αρθρικού χόνδρου (Κλίμακα K/L).

### B.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (OA) αποτελεί μία από τις πιο κοινές μορφές χρόνιας μυοσκελετικής νόσου με σημαντικές κοινωνικο-οικονομικές επιπτώσεις παγκοσμίως. Ωστόσο, η παθογένεια της νόσου δεν είναι πλήρως κατανοητή. Το κυριότερο χαρακτηριστικό της οστεοαρθρίτιδας είναι ο προοδευτικός εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου, μία διαδικασία στην οποία συμβάλλει μία πληθώρα μορίων μία πληθώρα μορίων που συναντώνται στην εξωκυττάρια ουσία (ECM) του ιστού. Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε τη συσχέτιση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού +12647 G>C (rs1053411) με τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου.

Η οστεονεκτίνη, αρχικά ταυτοποιήθηκε ως μία πρωτεΐνη που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στην ECM των οστών. Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται και σε άλλους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του αρθρικού χόνδρου. Ο Chandrasekhar και οι συνεργάτες του, έδειξαν για πρώτη φορά το 1994 ότι η οστεονεκτίνη εκφράζεται στον αρθρικό χόνδρο κουνελιών [20]. Επίσης, χαμηλά επίπεδα έκφρασης της οστεονεκτίνης ανιχνεύθηκαν και στην εν τω βάθει στιβάδα του αρθρικού χόνδρου ανθρώπου από τον Nakamura και τους συνεργάτες του δύο χρόνια αργότερα [18]. Η ίδια ομάδα, ανίχνευσε αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης στο αρθρικό υγρό και στην επιφανειακή και την ενδιάμεση στιβάδα αρθρικού χόνδρου προερχόμενων από ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA) και OA. Τα παραπάνω αποτελέσματα σχετικά με τη διαφοροποιημένη έκφραση της οστεονεκτίνης στην οστεοαρθρίτιδα επιβεβαιώθηκαν από μελέτες του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Λάρισας. Σύμφωνα με αδημοσίευτα προς το παρόν δεδομένα, η αξιολόγηση των επιπέδων της πρωτεΐνης σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα έδειξε, επίσης, χαμηλά επίπεδα έκφρασής της. Ωστόσο, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα χονδροκύτταρα καλλιέργειας προερχόμενα από τον αρθρικό ιστό ασθενών που εμφάνιζαν OA, παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης της οστεονεκτίνης, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση της πρωτεΐνης αυξάνεται κατά την ανάπτυξη της νόσου.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συσχέτισης, έδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση του ομόζυγου παθολογικού γονοτύπου C/C ( $p=0,05$ ) του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού +12647 G>C (rs1053411), με τον κίνδυνο ανάπτυξης οστεοαρθρίτιδας. Παρόλα αυτά, κλινικοί παράμετροι, οι οποίοι αποτελούν

προδιαθεσικούς παράγοντες για την εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας, όπως η ηλικία [9], το φύλο [12], ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) [13], φάνηκε ότι δεν σχετίζονται με τη συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων (G/G, G/C, C/C) και των αλληλομόρφων (G, C). Επιπρόσθετα, η συχνότητα με την οποία εμφανίζονται οι γονότυποι και τα αλληλόμορφα στον υπό μελέτη πληθυσμό δεν σχετίζεται με το βαθμό αλλοίωσης του χόνδρου (κλίμακα Kellgren-Laurence) [141].

Ο SNP +12647 G>C, εντοπίζεται στην 3'UTR του γονιδίου της οστεονεκτίνης, μία περιοχή που θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση με το να ρυθμίζει την ενεργότητα ρυθμιστικών στοιχείων και τη σταθερότητα του mRNA [32,126,127]. Αναφέρεται στη βιβλιογραφία, ότι μία συστάδα τριών SNPs στην 3'UTR της γλυκοπρωτεΐνης 1 της κυτταρικής μεμβράνης του ανθρώπινου πλάσματος (human plasma cell membrane glycoprotein 1, PC-1) σχετίζεται με τη σταθεροποίηση του mRNA της PC-1 και με αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης [145]. Επίσης, σύμφωνα με τον Zhou και τους συνεργάτες του, ο SNP +998 C→G στην 3'UTR του SPARC (αντίστοιχος του +12647 G>C που μελετάται στην παρούσα εργασία), σχετίστηκε με την προδιάθεση για συστηματική σκλήρυνση [135]. Πιθανόν ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός να επηρεάζει τη σταθερότητα του mRNA του SPARC, καθώς το mRNA του SPARC τόσο σε ινοβλάστες δέρματος φυσιολογικών ατόμων όσο και σε ινοβλάστες δέρματος ασθενών, οι οποίοι είναι ομόζυγοι για το C αλληλόμορφο, έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής σε σχέση με ετεροζυγώτες. Αυτό εν μέρει πιθανόν να οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του SPARC στη σκλήρυνση [135].

Συμπερασματικά, παρατηρείται ότι άτομα ομόζυγα για το C αλληλόμορφο του SNP +12647 G>C (rs1053411), παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη οστεοαρθρίτιδας. Αν ισχύουν τα συμπεράσματα των Zhou και των συνεργατών του, πιθανόν ο υπό μελέτη πολυμορφισμός να επιδρά το ίδιο στη σταθερότητα του mRNA του SPARC και να ευθύνεται εν μέρει για την αύξηση του γονιδίου της οστεονεκτίνης στην εκφυλιστική αρθρίτιδα. Παρόλα αυτά, πρέπει να τονισθεί η αναγκαιότητα ανάλυσης και μελέτης μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων για την εξαγωγή περισσότερο ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την εμπλοκή ή μη του SPARC στην οστεοαρθρίτιδα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Burr D.B. **Anatomy and physiology of the mineralized tissues: Role in the pathogenesis of osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 12, 20–30, **2004.**
2. Goldring M.B. & Goldring S.R. Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213, 626–34, **2007**
3. Wieland H.A., Michaelis M., Kirschbaum B.J. & Rudolphi K.A. **Osteoarthritis- an untreatable disease?** 4, 331–44 , **2005.**
4. Zhang Y., Jordan J.M. **Epidemiology of osteoarthritis.** *Clin Geriatr Med* 26, 355–369, **2010.**
5. Lawrence R.C., Felson D.T., Helmick C.G., Arnold L.M., Choi H., Deyo R.A., Gabriel S., Hirsch R., Hochberg M.C., Hunder G.G., Jordan J.M., Katz J.N., Kremers H.M. & Wolfe F. National Arthritis Data Workgroup.: **Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II.** *Arthritis Rheum.*58, 26–35, **2008.**
6. Andrianakos A.A., Kontelis L.K., Karamitsos D.G, Aslanidis S.I., Georgountzos A.I., Kaziolas G.O., Pantelidou K.V., Vafiadou E.V. & Dantis P.C. for the ESORDIG Study Group, **Prevalence of Symptomatic Knee, Hand, and Hip Osteoarthritis in Greece. The ESORDIG Study.** *J Rheumatol*, 33, 2507–2514, **2006.**
7. Bonnet C.S & Walsh D.A. **Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation.** *Rheumatology* 44, 7–16, **2005.**
8. Buckwalter J.A., Saltzman C., Brown T. & Schurman D.J. **The impact of osteoarthritis: implications for research.** *Clin Orthop* 427, 6–15, **2004.**
9. Λαμπίρης Ε. Ηλίας. **Ορθοπαιδική και Τραυματολογία**, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη, **2003.**
10. Busija L., Bridgett L., Williams S. et al., **Osteoarthritis, Best Practise & Research Clinical Rheumatology** 24, 757–768, **2010.**
11. Katz J.D., Agrawal S. & Velasquez M. **Getting to the heart of the matter: osteoarthritis takes its place as part of the metabolic syndrome.** *Curr Opin Rheumatol* 22, 512–519, **2010.**
12. Lawrence R.C. et al. **Estimates of the prevalence of selected arthritic and musculoskeletal diseases in the United States.** *J Rheumatol* 16, 427–41, **1989.**
13. Sowers M.R. & Karvonen-Gutierrez C.A. **The evolving role of obesity in knee osteoarthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 22, 533–7, **2010.**
14. Ciccutini F.M. & Spector T.D. **What is the evidence that osteoarthritis is genetically determined?** *Baillieres Clin Rheumatol* 11, 657–669, **1997.**
15. Valdes A.M. & Spector T.D. **The clinical relevance of genetic susceptibility to osteoarthritis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24, 3–14, **2010.**
16. Martel-Pelletier J., Boileau C., Pelletier J.P. & Roughley P.J. **Cartilage in normal and osteoarthritis conditions.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22, 351–84, **2008.**
17. Wieland H.A., Michaelis M., Kirschbaum B.J. & Rudolphi K.A. **Osteoarthritis-an untreatable disease?** *Nat Rev Drug Discov* 4, 331–44, **2005.**
18. Nakamura S. et al. **Enhancement of SPARC (osteonectin) synthesis in arthritic cartilage. Increased levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and regulation by growth factors and cytokines in chondrocyte cultures.** *Arthritis Rheum* 39, 539–51, **1996.**
19. Lane T.F. & Sage E.H. **The biology of SPARC, a protein thatmodulates cell-matrix interactions.** *FASEB J.* 8, 163–173, **1994.**

20. Chandrasekhar S., Harvey A.K., Johnson M.G. & Becker G.W. **Osteonectin/SPARC is a product of articular chondrocytes/cartilage and is regulated by cytokines and growth factors.** *Biochim. Biophys. Acta* 1221, 7-14, 1994.
21. Bornstein P. **Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1.** *J. Cell Biol* 130, 503-506, 1995.
22. Yan Q. & Sage E.H. **SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions.** *J Histochem Cytochem* 47, 1495-1506, 1999.
23. Bornstein P. **Matricellular proteins: an overview.** *J Cell Commun Signal* 3, 163-5, 2009.
24. Damjanovski S., Huynh M.H., Motamed K., Sage E.H. & Ringuette M. **Regulation of SPARC expression during early *Xenopus* development: evolutionary divergence and conservation of DNA regulatory elements between amphibians and mammals.** *Dev Genes Evol* 207, 453-461, 1998.
25. Holland P.W., Harper S.J., McVey J.H., Hogan B.L. **In vivo expression of mRNA for the Ca<sup>++</sup>-binding protein SPARC osteonectin. revealed by in situ hybridization.** *J Cell Biol* 105, 473-482, 1987.
26. Nomura S., Hashmi S., McVey J.H., Ham J., Parker M. & Hogan B.L. **Evidence for positive and negative regulatory elements in the 59-flanking sequence of the mouse *sparc* \_osteonectin. gene.** *J Biol Chem* 264, 12201-12207, 1989.
27. Sage H., Vernon R.B., Decker J., Funk S. & Iruela-Arispe M.L. **Distribution of the calcium-binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice.** *J Histochem Cytochem* 37, 819-829, 1989.
28. Schwarzbauer J.E., Musset-Bilal F. & Ryan C.S. **Extracellular calcium-binding protein SPARC/osteonectin in *Caenorhabditis elegans*.** *Methods Enzymol* 245, 257-270, 1994.
29. Reed M.J. & Sage E.H. **SPARC and the extracellular matrix: implications for cancer and wound repair.** *Curr Top Microbiol Immunol* 213, 81-94, 1996.
30. Swaroop A., Hogan B.L. & Francke U. **Molecular analysis of the cDNA for human SPARC/osteonectin/BM-40: sequence, expression, and localization of the gene to chromosome 5q31-q33.** *Genomics* 2, 37-47, 1988.
31. Mason I.J. Murphy D., Munke M., Francke U., Elliott R.W. & Hogan B.L. **Developmental and transformation-sensitive expression of the SPARC gene on mouse chromosome 11.** *EMBO J* 5, 1831-1837, 1986.
32. Villareal X.C., Mann K.G., & Long G.L. **Structure of human osteonectin based upon analysis of cDNA and genomic sequences.** *Biochemistry* 28, 6483-91, 1989.
33. McVey J.H., Nomura S., Kelly P., Mason I.J. & Hogan B.L. **Characterization of the mouse SPARC/osteonectin gene. Intron/exon organization and an unusual promoter region.** *J Biol Chem* 263, 11111-6, 1988.
34. Hafner M., Zimmermann K., Pottgiesser J., Krieg T. & Nischt R. **A purine-rich sequence in the human BM-40 gene promoter region is a prerequisite for maximum transcription.** *Matrix Biol* 14, 733-41, 1995.
35. Mason I.J., Taylor A., Williams J.G., Sage H. & Hogan B.L. **Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell 'culture shock' glycoprotein of Mr 43,000.** *EMBO J* 5, 1465-72, 1986.
36. Ng K.W., Manji S.S., Young M.F. & Findlay D.M. **Opposing influences of glucocorticoid and retinoic acid on transcriptional control in proteoblasts.** *Mol Endocrinol* 3, 2079-85, 1989.
37. Brekken R.A & Sage E.H. **SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix.** *Matrix Biol* 19, 569-80, 2000.

38. Sato N. et al. **SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions.** *Oncogene* 22, 5021-30, 2003.
39. Socha M.J. et al. **Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer.** *Neoplasia* 11, 126-35, 2009.
40. Tai I.T. & Tang M.J. **SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy.** *Drug Resist Updat* 11, 231-46, 2008.
41. Delany A.M. & Canalis E. **Basic fibroblast growth factor destabilizes osteonectin mRNA in osteoblasts.** *Am J Physiol* 274, C734-740, 1998.
42. Kapinas K., Kessler C.B. & Delany A.M. **miR-29 suppression osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling.** *J Cell Biochem* 108, 216-24, 2009.
43. Kaufmann B. et al. **Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectin glycosylation: implications for collagen affinity.** *Glycobiology* 14, 609-19, 2004.
44. Bradshaw A.D. **The role of SPARC in extracellular matrix assembly.** *J Cell Commun Signal* 3, 239-46, 2009.
45. Aigner T. & Stove J. **Collagens-major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair.** *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1569-93, 2003.
46. Eyre D. **Collagen of articular cartilage.** *Arthritis Res* 4, 30-5, 2002.
47. Sasaki T., Hohenester E., Gohring W. & Timpl, R. **Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM- 40/SPARC/osteonectin.** *EMBO J* 17, 1625-1634, 1998.
48. Sasaki T., Gohring W., Mann K. et al. **Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens.** *J Biol Chem* 272, 9237-9243, 1997.
49. Bradshaw A.D. et al. **Pressure overload-induced alterations in fibrillar collagen content and myocardial diastolic function: role of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in post-synthetic procollagen processing.** *Circulation* 119, 269-80, 2009.
50. Bradshaw A.D., Graves D.C., Motamed K. & Sage E.H. **SPARC-null mice exhibit increased adiposity without significant differences in overall body weight.** *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 6045-50, 2003.
51. Bradshaw A.D. et al. **SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength.** *J Invest Dermatol* 120, 949-55, 2003.
52. Rentz T.J., Poobalarahi F., Bornstein P., Sage E.H. & Bradshaw A.D. **SPARC regulates processing of procollagen I and collagen fibrillogenesis in dermal fibroblasts.** *J Biol Chem* 282, 22062-71, 2007.
53. Giudici C. et al. **Mapping of SPARC/BM-40/osteonectin- binding sites on fibrillar collagens.** *J Biol Chem* 283, 19551-60, 2008.
54. Clezardin P. et al. **Complex formation of humanthrombospondin with osteonectin.** *Eur J Biochem* 175, 275-84, 1988.
55. Sangalleti S. et al. **Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis.** *Cancer Res* 68, 9050-9, 2008.
56. Yan Q, Perdue N., Blake D. & Sage E.H. **Absence of SPARC in murine lens epithelium leads to increased deposition of laminin-1 in lens capsule.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 4652-60, 2005.

57. Lorenzo P., Bayliss M.T. & Heinegard D. **Altered patterns and synthesis of extracellular matrix macromolecules in early osteoarthritis.** *Matrix Biol* 23, 381-91, 2004.
58. Sofat N. **Analysing the role of endogenous matrix molecules in the development of osteoarthritis.** *Int J Exp Pathol* 90, 463-79, 2009.
59. Wei H.Y., Liu J.L., Lv B.J., Xing L. & Fu S.Y. **SPARC modulates expression of extracellular matrix genes in human trabecular meshwork cells.** *Acta Ophthamol*, 2011.
60. Takaishi H., Kimura T., Dalal S., Okada Y & D'Armiento J. **Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13.** *Curr Pharm Biotechnol* 9, 47-54, 2008.
61. Shankavaram U.T., DeWitt D.L., Funk S.E., Sage E.H. & Wahl L.M. **Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC.** *J Cell Physiol* 173, 327-34, 1997.
62. Tremble P.M., Lane T.F., Sage E.H. & Werb Z. **SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway.** *J Cell Biol* 121, 1433-44, 1993.
63. Gilles C. et al. **SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines.** *Cancer Res* 58, 5529-36, 1998.
64. McClung H.M. et al. **SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells.** *Neurosci Lett* 419, 172-7, 2007.
65. Nischt R. et al. **BM-40 and MMP-2 expression are not coregulated in human melanoma cell lines.** *Cancer Lett* 162, 223-30, 2001.
66. Blaney Davidson E.N., van der Kraan P.M. & van der Berg W.B. **TGF-beta and osteoarthritis.** *Osteoarthritis cartilage* 15, 597-604, 2007.
67. Finnson K.W., CChi Y., Bou-Gharios G., Leask A. & Philip A. **TGF-beta signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis.** *Front Biosci (Schol Ed)* 4, 251-68, 2012.
68. Mueller M.B. & Tuan R.S. **Anabolic/catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets.** *PM R* 3, S3-11, 2011.
69. Francki A. et al. **SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor- beta1 in mesangial cells.** *J Biolo Chem* 274, 32145-52, 1999.
70. Francki A. et al. **SPARC regulates TGF-beta1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells.** *J Cell Biochem* 91, 915-25, 2004.
71. Schiemann B.J., Neil J.R. & Schiemann W..P **SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor-beta-signalinh system.** *Mol Biol Cell* 14, 3977-88, 2003.
72. Chlenski A. et al. **SPARC enhances tumor stroma formation and prevents fibroblast activation.** *Oncogene* 26, 4513-22, 2007.
73. Rivera L.B. & Brekken R.A. **SPARC promotes pericyte recruitment via inhibition of endoglin-dependent TGF-beta1 activity.** *J Cell Biol* 193, 1305-19, 2011.
74. Robinson C.J. & Gaines-Das R. **The international standard for basic fibroblast growth factor (FGF-2); comparison of candidate preparations by in vitro bioassays and immunoassays.** *Growth Factors* 11, 9-16, 1994.
75. Motamed K. et al. **Fibroblast growth factor receptor-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation and the promotion of skeletal myoblast differentiation by SPARC: a role for protein kinase A.** *J Cell Biochem* 90, 408-23, 2003.

76. Hasselaar P. & Sage E.H. **SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells.** *J Cell Biochem* 49, 272-83, **1992**.
77. Rivera L.B., Bradshaw A.D. & Brekken R.A. **The regulatory function of SPARC in vascular biology.** *Cell Mol Life Sci* 68, 3165-73, **2011**.
78. Lingaraj K., Poh C.K. & Wang W. **Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during articular cartilage growth and re-expressed in osteoarthritis.** *Ann Acad Med Singapore* 39, 399-403, **2010**.
79. Sullivan L.A. et al. **r84, a novel therapeutic antibody against mouse and human VEGF with potent anti-tumor activity and limited toxicity induction.** *PLoS One* 5, e12031, **2010**.
80. Chandrasekaran V., Ambati J., Ambati B.K. & Taylor E.W. **Molecular docking and analysis of interactions between vascular endothelial growth factor (VEGF) and SPARC protein.** *J Mol Graph Model* 26, 775-82, **2007**.
81. Kupprion C., Motamed K. & Sage E.H. **SPARC (BM-40, osteonectin ) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells.** *J Biol Chem* 273, 29635-40, **1998**.
82. Nozaki M. et al. **Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A.** *J Clin Invest* 116, 422-9, **2006**.
83. Francki A. et al. **SPARC regulates cell cycle progression in mesangial cells via its inhibition of IGF-dependent signaling.** *J Cell Biochem* 88, 802-11, **2003**.
84. Kieswetter K., Schwartz Z., Alderete M., Dean D.D. & Boyan B.D. **Platelet derived growth factor stimulates chondrocyte proliferation but prevents endochondral maturation.** *Endocrine* 6, 257-64, **1997**.
85. Schafer S.J., Luyten F.P., Yanagishita M. & Reddi A.H. **Proteoglycan metabolism is age related and modulated by isoforms of platelet-derived growth factor in bovine articular cartilage explants cultures.** *Arch Biochem Biophys* 302, 431-8, **1993**.
86. Chlenski A. & Cohn S.L. **Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression.** *Semin Cell Dev Biol* 21, 55-65, **2010**.
87. Weaver M.S., Workman G. & Sage E.H. **The copper bonding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin beta1 and activation of integrin-linked kinase.** *J Biol Chem* 283, 22826-37, **2008**.
88. Hannigan G., Troussard A.A. & Dedhar S. **Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK.** *Nat Rev Cancer* 5, 51-63, **2005**.
89. Nie J. et al. **IFATS collection: Combinatorial peptides identify alpha5beta1 integrin as a receptor for the matricellular protein SPARC on adipose stromal cells.** *Stem Cells* 26, 2735-45, **2008**.
90. De S. et al. **Molecular pathway for cancer metastasis to bone.** *J Biol Chem* 278, 39044-50, **2003**.
91. Pavasant P. & Yongchaitrakul T. **Secreted protein acidic, rich in cysteine induces pulp cell migration via alpha5beta3 integrin and extracellular signal-regulated kinase.** *Oral Dis* 14, 335-40, **2008**.
92. Cybulsky M.L. et al. **Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7859-63, **1991**.
93. Kriegsmann J. et al. **Expression of vascular cell adhesion molecule-1 mRNA and protein in rheumatoid synovium demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry.** *Lab Invest* 72, 209-14, **1995**.
94. Kienzle G. & von Kempis J. **Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) on primary human articular chondrocytes: functional regulation of expression by cytokines**



- and comparison with intracellular adhesion molecule 1 (CD54) and very late activation antigen 2. *Arthritis Rheum* 41, 1296-305, 1998.
95. Oertli B., Beck-Schimmer B., Fan X. & Wuthrich R.P. Mechanisms of hyaluronan-induced up-regulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression by murine kidney tubular epithelial cells: hyaluronan triggers cell adhesion molecule expression through a mechanism involving activation of nuclear factor-kappa B and activating protein-1. *J Immunol* 161, 3431-7, 1998.
  96. Kelly K.A. et al. SPARC is a VCAM-1 counter-ligand that mediates leucocytes transmigration. *J Leukoc Biol* 81, 748-56, 2007.
  97. Day T.F., Guo X., Garrett-Beal L. & Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8, 739-50, 2005.
  98. Wu Q. et al. Beta-catenin, cartilage, and osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1192, 344-50, 2010.
  99. Nie J. & Sage E.H. SPARC functions as an inhibitor of adipogenesis. *J Cell Commun Signal* 3, 247-54, 2009.
  100. Nagaraju G.P. & Sharma D. Anti-cancer role of SPARC, an inhibitor of adipogenesis. *Cancer Treat Rev* 37, 559-66, 2011.
  101. Shi Q. et al. Secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC), mediates cellular survival of gliomas through AKT activation. *J Biol Chem* 279, 52200-9, 2004.
  102. Bradshaw A.D. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 480-8, 2012.
  103. Termine J.D., Belcourt A.B., Conn K.M. & Kleinman H.K. Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone. *J Biol Chem* 256, 10403-8, 1981.
  104. Alford A.I. & Hankenson K.D. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone* 38, 749-57, 2006.
  105. Delany A.M. & Hankenson K.D. Thrombospondin-2 and SPARC/osteonectin are critical regulators of bone remodeling. *J Cell Commun Signal* 3, 227-38, 2009.
  106. Delany A.M. et al. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest* 105, 1325, 2000.
  107. Kos K. et al. Regulation of the fibrosis and angiogenesis promoter SPARC/osteonectin in human adipose tissue by weight change, leptin, insulin, and glucose. *Diabetes* 58, 1780-8, 2009.
  108. Takahashi M. et al. The expression of SPARC in adipose tissue and its increased plasma concentration in patients with coronary artery disease. *Obes Res* 9, 388-93, 2001.
  109. Nie J. & Sage E.H. SPARC inhibits adipogenesis by its enhancement of beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 284, 1279-90, 2009.
  110. Simopoulou T. et al. Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 872-83, 2007.
  111. Collins F.S., Brooks L.D. & Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 8, 1229-1231, 1998.
  112. Kruglyak, L. & Nickerson, D. A. Variation is the spice of life. *Nature Genet.* 27, 234-236, 2001.
  113. Reich D.E., Gabriel S.B. & Altshuler D. Quality and completeness of SNP databases. *Nature Genet.* 33, 457-458, 2003.
  114. Kruglyak L. & Nickerson D.A. Variation is the spice of life. *Nat Genet* 27, 234-6, 2001.

115. Sachidanandam R. et al., **A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms.** *Nature* 409, 928-33, **2001.**
116. Venter J.C. et al., **The sequence of the human genome.** *Science* 291, 1304-51, **2001.**
117. Brookes A.J. **The essence of SNPs.** *Gene* 234, 177-186, **1999.**
118. Gray I.C., Campbell D.A. & Spurr N.K. **Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics.** *Hum Mol Genet* 9, 2403-2408, **2000.**
119. Schork N.J., Fallin D. & Lanchbury J.S. **Single nucleotide polymorphism and the future of genetic epidemiology.** *Clin Genet* 58, 250-264, **2000.**
120. King R.A., Rotter J.I. & Motulsky A.G. **The Genetic Basis of Common Diseases** Vol. 20 (eds Motulsky, A. G., Harper, P. S., Sriver, C. & Bobrow, M.), *Oxford Univ. Press, Oxford*, **1992.**
121. Aouacheria A., Navratil V., Wen W., Jiang M., Mouchiroud D., Gautier C., Gouy M. & Zhang M. **In silico whole-genome scanning of cancer- associated nonsynonymous SNPs and molecular characterization of a dynein light chain tumour variant.** *Oncogene* 24, 6133-6142, **2005.**
122. Chakravarti A. **It's raining SNPs, hallelujah?** *Nat Genet* 19, 216-217, **1998.**
123. Collins F.S., Guyer M.S. & Charkravarti A. **Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation.** *Science* 278, 1580-1581, **1997.**
124. Syvanen A.C., Landegren U., Isaksson A., Gyllensten U. & Brookes A. **First International SNP Meeting at Skokloster, Sweden, August 1998. Enthusiasm mixed with scepticism about single- nucleotide polymorphism markers for dissecting complex disorders.** *Eur J Hum Genet* 7, 98-101, **1999.**
125. Duan J., Sanders A.R., Molen J.E., Martinolich L., Mowry B.J., Levinson D.F., Crowe R.R., Silverman J.M. & Gejman P.V. **Polymorphisms in the 5'- untranslated region of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene affect gene expression.** *Mol Psychiatry* 8, 901-910, **2003.**
126. Miller G.M. & Madras B.K. **Polymorphisms in the 3'-untranslated region of human and monkey dopamine transporter genes affect reporter gene expression.** *Mol Psychiatry* 7, 44-55, **2002.**
127. Goto Y., Yue L., Yokoi A., Nishimura R., Uehara T., Koizumi S. & Saikawa Y. **A novel single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the human dihydrofolate reductase gene with enhanced expression.** *Clin Cancer Res* 7, 1952-1956, **2001.**
128. van der Velden A.W. & Thomas A.A. **The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development.** *Int J Biochem Cell Biol* 31, 87-106, **1999.**
129. Gray N.K. **Translational control by repressor proteins binding to the 5'UTR of mRNAs.** *Methods Mol Biol* 77, 379-397, **1998.**
130. Bartel D.P. & Chen C.Z. **Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs.** *Nat Rev Genet* 5, 396-400, **2004.**
131. Audic Y. & Hartley R.S. **Post-transcriptional regulation in cancer.** *Biol Cell* 96, 479-498, **2004.**
132. Loughlin, J. **Genome studies and linkage in primary osteoarthritis.** *Rheumatic Disease Clinics of North America* 28, 95-109, **2002.**
133. Pereira D. et al. **The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review.** *Osteoarthritis and Cartilage* 19, 1270-1285, **2011.**
134. Reynard L.N. & Loughlin J. **The genetics and functional analysis of primary osteoarthritis susceptibility.** *Expert Rev Mol Med* 15, **2013.**
135. Zhou X., Tan F.K., Reveille J.D., Wallis D., Milewicz D.M., Ahn C., Wang A. & Arnett F.C. **Association of novel polymorphisms with expression of SPARC in**

- normal fibroblasts and with susceptibility to scleroderma.** *Arthritis Rheum* 46, 2900–2999, **2002**.
- 136.** Lagan A.L., Pantelidis P., Renzoni E.A., Fonseca C., Beirne P., Taegtmeyer A.B., Denton C.P., Black C.M., Wells A.U., duBios R.M. & Welsh K.I. **Single-nucleotide polymorphisms in the SPARC gene are not associated with susceptibility to scleroderma.** *Rheumatology* 44, 197–201, **2005**.
  - 137.** Delany A.M., McMahon D.J., Powell J.S., Greenberg D.A. & Kurland E.S. **Osteonectin/SPARC polymorphisms in Caucasian men with idiopathic osteoporosis.** *Osteoporos Int.* 19, 969–78, **2008**.
  - 138.** Aouacheria A., Navratil V., López-Pérez R., Gutiérrez N.C., Churkin A., Barash D., Mouchiroud D. & Gautier C. **In silico whole-genome screening for cancer-related single-nucleotide polymorphisms located in human mRNA untranslated regions.** *BMC Genomics* 3, 8-2, **2007**.
  - 139.** Lau C.P., Poon R.T., Cheung S.T., Yu W.C. & Fan S.T. **SPARC and Hevin expression correlate with tumour angiogenesis in hepatocellular carcinoma.** *J Pathol* 210, 459–68, **2006**.
  - 140.** Winder T., Wilson P.M., Yang D., Zhang W., Ning Y., Power D.G., Bohanes P., Gerger A., Tang L.H., Shah M. & Lenz H.J. **An individual coding polymorphism and the haplotype of the SPARC gene predict gastric cancer recurrence.** *Pharmacogenomics J* 13, 342-8, **2013**.
  - 141.** Kellgren J.H., Lawrence J.S. & Bier F. **Genetic Factors in Generalized Osteo-Arthrosis.** *Ann Rheum Dis* 22, 237-55, **1963**.
  - 142.** Afonina I., Zivarts M., Kutyavin I. et al. **Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder.** *Nucleic Acids Res* 25, 2657-2660, **1997**.
  - 143.** Kutyavin I.V., Lukhtanov E.A., Gamper H.B. & Meyer R.B. **Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization.** *Nucleic Acids Res* 25, 3718-3723, **1997**.
  - 144.** Livak K.J., Marmaro J. & Todd J.A. **Towards fully automated genome-wide polymorphism screening [letter].** *Nat Genet* 9, 341-342, **1995**.
  - 145.** Frittitta L., Ercolino T., Bozzali M., Argiolas A., Graci S., Santagati M.G. et al. **A cluster of three single nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of human glycoprotein PC-1 gene stabilizes PC-1 mRNA and is associated with increased PC-1 protein content and insulin resistance-related abnormalities.** *Diabetes* 50, 1952–5, **2001**.