



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Ασπασία ΤΣΕΖΟΥ

ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Κωνσταντίνος Ν. ΜΑΛΙΖΟΣ

*Διδακτορική Διατριβή*

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΝΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΚΟ**

**ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΚΩΝ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ»**

υπό

**ΙΩΑΝΝΑΣ ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ**

ΒΙΟΛΟΓΟΥ, M.Sc

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους

των απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2014

© 2014 Ιωάννα Παπαθανασίου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής ( 7<sup>η</sup> / 02-07-2014**

**ΓΣΕΣ):**

**1<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Ασπασία Τσέζου

**(Επιβλέπουσα)** Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

**2<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Μαρία Ιωάννου

Επ. Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**3<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Κωνσταντίνος Ν. Μαλίζος

Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

**4<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Μιχαήλ Χαντές

Επ. Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

**5<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Λάζαρος Σακκάς

Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**6<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Ιωάννης Στεφανίδης

Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**7<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Μαρία Τζέτη

Επ. Καθηγήτρια Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και  
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής & Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας σε συνεργασία με την Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας καθώς και το Ινστιτούτο Έρευνας και Τεχνολογίας Θεσσαλίας (ΙΕΤΕΘ) .

Για την περάτωση της διδακτορικής μου διατριβής οφείλω να ευχαριστήσω ολόψυχα την επιστημονική υπεύθυνη της διατριβής μου, την Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κυρία Ασπασία Τσέζου, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με την έρευνα, για την άρτια επιστημονική καθοδήγηση, αλλά και για την κατανόηση και υποστήριξη καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλο αυτό το διάστημα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Ορθοπαιδικής κύριο Κωνσταντίνο Μαλίζο για την άψογη συνεργασία μας, τη συμβολή του στην εργασία και την επίβλεψη της διατριβής. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κυρία Μαρία Ιωάννου για την επίβλεψη της διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: τον Επίκουρο Καθηγητή Ορθοπαιδικής Μιχαήλ Χαντέ, τον Καθηγητή Παθολογίας-Ρευματολογίας Λάζαρο Σακκά, τον Καθηγητή Παθολογίας-Νεφρολογίας Ιωάννη Στεφανίδη και την Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής Μαρία Τζέτη.

Οφείλω να ευχαριστήσω θερμά όλους τους συναδέλφους Βιολόγους του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας καθώς και του Ινστιτούτου Έρευνας και Τεχνολογίας Θεσσαλίας (ΙΕΤΕΘ) με τους οποίους συνεργάστηκα αρμονικά όλα αυτά τα χρόνια και ιδιαίτερα

τους Βασίλη Παπανικολάου, Τιμόκλεια Ορφανίδου, Φωτεινή Κωστοπούλου, Ευανθία Μουρμούρα, Μαρία Παλιανοπούλου, Θεοδώρα Σιμοπούλου, Νίκο Στεφάνου, Stephanie Dubos και Βασιλική Γκρέτση. Επίσης, ευχαριστώ όλους τους συνεργάτες της Ορθοπαιδικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για την άψογη συνεργασία μας στη συλλογή των δειγμάτων.

Τέλος ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου και όλους τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση, τη συνεχή υποστήριξη και ενθάρρυνση καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

*Ιωάννα Παπαθανασίου*

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

### ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

**Φεβρουάριος 2009 έως σήμερα:** Υποψήφια διδάκτορας στο τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με Ινστιτούτο Έρευνας και Τεχνολογίας Θεσσαλίας του ΕΚΕΤΑ, με θέμα διατριβής: *«Διερεύνηση Γονιδίων που ενέχονται στον Υπερτροφικό Φαινότυπο Οστεοαρθρικών Χονδροκυττάρων»*.

**2006-2008:** ΠΜΣ «Κλινικές Εφαρμογές στη Μοριακή Ιατρική» του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής των Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας με βαθμό «άριστα» 9,04

### **2001-2006**

Πτυχίο **ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Βαθμός πτυχίου 7,61 (Λίαν Καλώς).

### ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

**01/01/2013- έως τώρα & 1/11/2010-30/04/2011:** *«Διερεύνηση γονιδίων και μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στη διαδικασία της υπερτροφίας των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων: ανάδειξη νέων θεραπευτικών μορίων-στόχων στην οστεοαρθρίτιδα»*.

Επιστημονικός Υπεύθυνος του έργου: Κ.Ν. Μαλίζος, Καθ. Ορθοπαιδικής Ιατρ. Σχ. ΠΘ

**01/05/2011-31/12/12:** *«Μελέτη Βιομεμβρανών»*

Επιστημονικός Υπεύθυνος του έργου: Κ.Ν. Μαλίζος, Καθ. Ορθοπαιδικής Ιατρ. Σχ. ΠΘ

**01/11/2009-31/10/2010:** *«Novel Technologies for Surveillance of Emerging and Reemerging Infections of Wildlife (WilgTech)»*.

Επιστημονικός Υπεύθυνος του έργου: Χ. Μπιλλίνης, Καθ. Μικροβιολογίας και

Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΠΘ

**01/01/2009-31/10/2009:** *«Μοριακή Διερεύνηση της Οστεοαρθρίτιδας»*

Επιστημονικός Υπεύθυνος του έργου: Κ.Ν. Μαλίζος, Καθ. Ορθοπαιδικής Ιατρ. Σχ. ΠΘ

### **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ**

- Αναρτώμενη ανακοίνωση: «*Βιοχημικές προσαρμογές του είδους *Rana ridibunda* κατά τη διάρκεια της χειμερίας νάρκης*». 28<sup>ο</sup> Ετήσιο Συνέδριο, Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, 2006, Ιωάννινα.
- Προφορική ανακοίνωση: «*TLR2 downregulation as a potential therapeutic target in Gram(+) septic arthritis*» European Bone and Joint Infection Society, 2009, Vienna.
- Προφορική ανακοίνωση: «*Γονιδιακή έκφραση του LRP5 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5) σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα*» 65<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο Ε. Ε. Χ. Ο.Τ. 2009, Θεσσαλονίκη.
- Προφορική ανακοίνωση: «*Η BMP-2 επάγει την καταβολική δράση των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης*». 67<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο Ε. Ε. Χ. Ο.Τ. 2011, Αθήνα
- Προφορική ανακοίνωση: «*BMP-2-induced Wnt/β-catenin activation through LRP-5 enhances the expression of catabolic and hypertrophic markers in osteoarthritic cartilage*» EFFORT, 2012, Βερολίνο.
- Αναρτώμενη ανακοίνωση: «*DNA Methylation status of sclerostin (SOST) promoter controls SOST expression in primary osteoarthritic chondrocytes, by changing Smad 1/5/8 binding affinity*» ESHG, 2013, Παρίσι.
- Προφορική ανακοίνωση: «*Επίπτωση πολυμορφισμών των Toll-like Receptors (TLRs) σε ασθενείς ΜΕΘ και η διερεύνηση του ρόλου τους στην πνευμονία σχετιζόμενη με τον αναπνευστήρα (VAP)*» ΕΕΕΘ, 2012, Αθήνα
- Αναρτώμενη ανακοίνωση: «*The association between genetic polymorphisms of Toll-like receptors (TLRs) in critical care patients and ventilator-associated pneumonia (VAP)*» ECCMID, 2013, Βερολίνο

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Michaelidis B, Kyriakopoulou-Sklavounou P, Staikou A, Papathanasiou I and Konstantinou K: Glycolytic adjustments in tissues of frog *Rana ridibunda* and land snail *Helix Lucorum* during seasonal hibernation. *Comp. Bioch. Physiol.* 2008; 151:582-9
- Papathanasiou I, Malizos KN and Tsezou A: Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Journal of Orthopaedics Research* 2010; 28:348-53.
- Papathanasiou I, Malizos KN, Poultides L, Karachalios T, Oikonomou P, Tsezou A. The catabolic role of toll-like receptor 2 (TLR-2) mediated by the NF-κB pathway in septic arthritis. *Journal of Orthopaedics Research* 2011; 29:247-51
- Papanikolaou V, Athanassiou E, Dubos S, Dimou I, Papathanasiou I, Kitsiou-Tzeli S, Kappas C, Tsezou A. hTERT regulation by NF-κB and c-myc in irradiated HER2-positive breast cancer cells. *Int J Radiat Biol.* 2011; 87:609-21.
- Papathanasiou I, Malizos KN, Tsezou A. Bone morphogenetic protein-2-induced Wnt/β-catenin signaling pathway activation through enhanced low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 catabolic activity contributes to hypertrophy in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2012 Apr 18;14(2):R82.
  - **Editorial:** The interaction of canonical bone morphogenetic protein- and Wnt-signaling pathways may play an important role in regulating cartilage degradation in osteoarthritis. Benjamin Y Chan and Christopher B Little. **Arthritis Research & Therapy** 2012, 14:119
- Gkretsi V, Papanikolaou V, Dubos S, Papathanasiou I, Giotopoulou N, Valiakou V, Wu C, Malizos KN, Tsezou A. Migfilin's elimination from osteoarthritic chondrocytes further pro-



motes the osteoarthritic phenotype via  $\beta$ -catenin upregulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Jan 11;430(2):494-9.

### **ΒΡΑΒΕΙΑ**

Καλύτερης επιστημονικής παρουσίας με τίτλο:

«Γονιδιακή έκφραση του LRP5 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5) σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα», 65<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 2009

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΝΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΚΟ  
ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΚΩΝ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ»**

**ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2014

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Δρ. Ασπασία Τοέζου**, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας-(*Επιβλέπουσα*)
2. **Δρ. Μαρία Ιωάννου**, Επ. Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3. Δρ. Κωνσταντίνος Ν. Μαλίζος, Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί την πιο κοινή νόσο του μυοσκελετικού συστήματος και θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα υγείας παγκοσμίως καθώς αποτελεί μια από τις βασικές αιτίες χρόνιας αναπηρίας του ενήλικου πληθυσμού. Η ΟΑ προσβάλλει όλες τις δομές της άρθρωσης και χαρακτηρίζεται από τη σταδιακό εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, το σχηματισμό νέων οστικών δομών στα όρια της άρθρωσης (οστεόφυτα) και από αλλαγές στη δομή του υποχόνδριο οστού (σκλήρυνση), προκαλώντας περιορισμό της κινητικότητας της άρθρωσης και χρόνια πόνο. Παρόλο που αρκετοί επιβαρυντικοί παράγοντες έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση της ΟΑ, συμπεριλαμβανομένων της γενετικής προδιάθεσης, της ηλικίας, της παχυσαρκίας και των κακώσεων των αρθρώσεων, η παθοφυσιολογία της νόσου δεν είναι πλήρως κατανοητή.

Μέχρι σήμερα, η διάγνωση της νόσου γίνεται στα τελευταία στάδια της εξέλιξης της και οι θεραπευτικές μέθοδοι που είναι διαθέσιμες, εκτός της χειρουργικής επέμβασης, είναι βραχυπρόθεσμες ή αναποτελεσματικές με αποτέλεσμα να μην μπορούν να αντιμετωπίσουν επαρκώς τους μηχανισμούς που οδηγούν στην αποδόμηση του χόνδρου και στην επαγωγή του πόνου. Βάσει των ανωτέρω καθίσταται επιτακτική ανάγκη η ανεύρεση δεικτών κατάλληλων για την πρόγνωση της ΟΑ αλλά και νέων θεραπευτικών βιολογικών προσεγγίσεων που θα στοχεύουν στην αναστροφή του

οστεοαρθρικού φαινοτύπου και κατ'επέκταση στην αναστολή της εξέλιξης της νόσου στα πρώιμα στάδια εκδήλωσης της.

Τα χονδροκύτταρα που απαντώνται στον ώριμο αρθρικό χόνδρο παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου μέσω των αλλαγών που παρατηρούνται στο φαινότυπο τους κατά την ΟΑ. Κατά τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων της αυξητικής πλάκας, τα χονδροκύτταρα γίνονται υπερτροφικά, αποπίπτουν και δίνουν τη θέση τους στο οστό. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ο ενήλικας μόνιμος αρθρικός χόνδρος αποτελείται από χονδροκύτταρα τα οποία δεν υφίστανται ωρίμανση σε υπερτροφικά αλλά παρουσιάζουν χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα διατηρώντας μια ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης και της αποδόμησης των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Αντίθετα, σε παθολογικές συνθήκες όπως η οστεοαρθρίτιδα, τα χονδροκύτταρα του προσβεβλημένου χόνδρου χάνουν το σταθερό τους φαινότυπο και υφίστανται αλλαγές που προσομοιάζουν αυτές της διαφοροποίησης τους κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση, με αποτέλεσμα τη διαταραχή του ισοζυγίου μεταξύ αναβολικών και καταβολικών διεργασιών του αρθρικού χόνδρου.

Η τελική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση ρυθμίζεται από ποικίλους μεταγραφικούς και αυξητικούς παράγοντες, ένζυμα, ορμόνες, κυττοκίνες όπως επίσης και από επιγενετικούς μηχανισμούς, με σημαντικότερη τη δράση των *microRNAs*. Πολλά από αυτά τα μόρια παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στον οστεοαρθρικό χόνδρο, προτείνοντας τη συμμετοχή τους στην παθογένεια της νόσου. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται οι μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (BMPs) και η β-κατενίνη, που παίζουν καταλυτικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη των μακρών οστών όπως και το *miR-140* που αποτελεί το πιο καλά χαρακτηρισμένο *microRNA* του αρθρικού χόνδρου.

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτελεί η διερεύνηση της μοριακής βάσης της υπερτροφίας των οστεοαρθριτικών χονδροκυττάρων μέσω της μελέτης της έκφρασης γονιδίων που επάγουν την υπερτροφία, όπως η BMP-2 και η β-κατενίνη, των εμπλεκόμενων μηχανισμών που ελέγχουν τη δράση τους, καθώς και η αναστολή της έκφρασής τους με τη χρήση microRNAs.

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ασθενών με πρωτοπαθή οστεοαρθρίτιδα που είχαν υποβληθεί σε ολική αρθροπλαστική γόνατος και δεν είχαν ρευματοειδή αρθρίτιδα ή αρθρίτιδα στα πλαίσια άλλου αυτοάνοσου νοσήματος, καθώς και χονδροδυσπλασία, σπηκτική ΟΑ και μετα-τραυματική ΟΑ. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν άτομα χωρίς ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων, τα οποία είχαν υποστεί χειρουργική επέμβαση επανόρθωσης κατάγματος ή ακρωτηριασμό. Αναλυτικότερα, στο πειραματικό μέρος της διατριβής διερευνήθηκαν τα ακόλουθα:

- Η έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι των BMPs και της β-κατενίνης σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα
- Ο ρόλος της BMP-2 στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα
- Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης μεταξύ της BMP-2 και της β-κατενίνης στην επαγωγή της έκφρασης καταβολικών ενζυμών και δεικτών υπερτροφίας στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα
- Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης στην καταβολική δράση των οστεοαρθριτικών χονδροκυττάρων και στη διαφοροποίησή τους σε υπερτροφικά κατά την οστεοαρθρίτιδα
- Ο ρόλος του miR-140 στη ρύθμιση της έκφρασης της BMP-2 και στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου κατά την οστεοαρθρίτιδα

Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη έκφραση της BMP-2 και του υποδοχέα BMPR-1A της στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά, ενισχύοντας τις ενδείξεις για ενεργή συμμετοχή του σηματοδοτικού μονοπατιού των BMPs στην εξέλιξη της νόσου. Επίσης, παρατηρήθηκε υπέρεκφραση του υποδοχέα LRP-5 και του μεταγραφικού παράγοντα LEF-1 στα OA χονδροκύτταρα, προτείνοντας την εκτεταμένη ενεργοποίηση του κανονικού Wnt/ $\beta$ -κατενίνης μονοπατιού στην OA. Αντίθετα, τα επίπεδα της φωσφο- $\beta$ -κατενίνης ήταν μειωμένα στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά, επιβεβαιώνοντας τη συμμετοχή της  $\beta$ -κατενίνης στην παθογένεια της νόσου.

Η επαγωγή με BMP-2 στα χονδροκύτταρα επέφερε αύξηση της έκφρασης του LRP-5 και είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της ενεργότητας του σηματοδοτικού μονοπατιού της  $\beta$ -κατενίνης μέσω σταθεροποίησης και αύξησης της ενεργούς μορφής της  $\beta$ -κατενίνης στο κυτταρόπλασμα. Ανάλυση του υποκινητή του LRP-5, έδειξε για πρώτη φορά, ότι διαθέτει περιοχές δέσμευσης των μεταγραφικών παραγόντων Smad1/5/8, γεγονός που υποδηλώνει ότι η επαγωγή της έκφρασής του LRP-5 από την BMP-2 πραγματοποιείται άμεσα με την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή του. Η αναστολή του LRP-5 επέφερε επαναφορά της έκφρασης της ενεργής μορφής της  $\beta$ -κατενίνης στα επίπεδα που είχαν προσδιοριστεί πριν τη χορήγηση της BMP-2, επιβεβαιώνοντας την αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών της BMP-2 και της  $\beta$ -κατενίνης μέσω του LRP-5.

Επίσης, διαπιστώθηκε πως η BMP-2 επάγει την έκφραση των καταβολικών ενζύμων MMP-9, 13, 14, ADAMTS-5 και του δείκτη υπερτροφίας COL10A1, ενισχύοντας την καταβολική δράση των χονδροκυττάρων και τη διαφοροποίησή τους σε υπερτροφικά. Ωστόσο, αποδείχθηκε πως η αύξηση της έκφρασης των παραπάνω

μορίων από την BMP-2 επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της β-κατενίνης καθώς αναστολή της έκφρασης του LRP-5 επέφερε μείωση των επιπέδων έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως τα ανωτέρω γονίδια αποτελούν άμεσους στόχους του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης καθώς βρέθηκε υπερέκφραση τους μετά από *in vitro* επαγωγή του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης με LiCl στα χονδροκύτταρα. Επιπλέον αναδείχτηκε ο μοριακός μηχανισμός ρύθμισης των ανωτέρω γονιδίων από τη β-κατενίνη καθώς βρέθηκαν θέσεις σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα LEF-1, μέσω του οποίου ασκεί τη δράση της η β-κατενίνη, στους υποκινητές των γονιδίων. Τέλος, η χορήγηση του miR-140 στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα επέφερε μείωση της έκφρασης της BMP-2 με αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης και όλων των μορίων που επάγονται από αυτή και οδηγούν στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της μελέτης ανέδειξαν την εκτεταμένη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών της BMP-2 και της β-κατενίνης στα OA χονδροκύτταρα, δύο βασικών μορίων που εμπλέκονται στην τελική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά, όπως επίσης και την αλληλεπίδραση μεταξύ τους μέσω του υποδόχρα της β-κατενίνης, LRP-5. Εξαιτίας της ενεργοποίησης της β-κατενίνης από την BMP-2, της οποίας η έκφραση βρέθηκε αυξημένη στην OA, τα OA χονδροκύτταρα δεν μπορούν να διατηρήσουν τα χαρακτηριστικά του μόνιμου χόνδρου αλλά αντιθέτως αυξάνουν τη μεταβολική δραστηριότητα τους ενισχύοντας την καταβολική τους δράση μέσω της επαγωγής της έκφρασης των καταβολικών ενζύμων, MMP-9, 13, 14 και ADAMTS-5 ενώ ταυτόχρονα επανακινούν τη διαφοροποίησή τους σε υπερτροφικά μέσω της παραγωγής του κολλαγόνου Χ. Τέλος, το miR-140 μέσω της

αναστολής της έκφρασης της BMP-2 και όλων των διαδικασιών που επάγονται από τη δράση της και οδηγούν στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, προτείνεται ως πιθανός θεραπευτικός στόχος για την αναστολή της εξέλιξης της OA σε πρώιμα στάδια, αναδεικνύοντας την κλινική σπουδαιότητα των αποτελεσμάτων μας.

## **ABSTRACT**

Osteoarthritis (OA) is one of the most common disorders of the musculoskeletal system in adults and is considered a major health problem worldwide causing chronic disability in elderly people. OA affects all joint tissues and is characterized by progressive degradation of articular cartilage, new bone formation at joint margins (osteophytes) and changes in subchondral bone structure (sclerosis), leading to loss of joint mobility and function accompanied by chronic pain. While several risk factors have been associated with OA, including genetic predisposition, aging, obesity and joint malalignment, the pathogenesis of OA remains largely unknown.

To date, osteoarthritis is a disease being diagnosed at late stages of progression and the current non-arthroplasty treatment options for OA are short-term or ineffective and fail to adequately address the underlying pathophysiological and biochemical mechanisms involved with cartilage degeneration and the induction of pain in arthritic joints. Thus, as there is no way to diagnose the disease at an early stage and given the fact that there are no drugs that can cure, reverse or halt osteoarthritis development and progression, the development of novel diagnostic and therapeutic interventions is imperative.



Chondrocytes, the only cell type residing in the adult cartilage matrix, play a key role in the pathogenesis of the disease via changes in their phenotype. In growth plate chondrogenesis, chondrocytes become hypertrophic, die by apoptosis and are replaced by bone. Under normal conditions, chondrocytes of permanent cartilage reside at the end of the long bones do not mature into the hypertrophic state preventing terminal differentiation and they have a low metabolic activity maintaining a dynamic equilibrium between synthesis and degradation of extracellular matrix (ECM) components. However, during osteoarthritis, chondrocytes lose the stable phenotype and undergo changes resembling those that take place in the growth plate during endochondral ossification resulting in disruption of matrix equilibrium and progressive loss of cartilage tissue.

The process of chondrocyte differentiation to hypertrophy is controlled by cytokines, hormones, transcription factors and growth factors. In addition, recent studies have revealed the importance of epigenetic and especially microRNA-mediated control in cartilage development. Several of these factors exhibit differential expression in osteoarthritic cartilage, such as BMPs,  $\beta$ -catenin and miR-140, suggesting their involvement in the pathogenesis of the disease.

The purpose of the present thesis is the investigation of the molecular basis of hypertrophy of osteoarthritic chondrocytes through evaluation of the expression of genes that induce hypertrophy, such as BMP-2 and  $\beta$ -catenin, the implicated mechanisms controlling their action, and inhibition of their expression using microRNAs.

Articular cartilage was obtained from patients with primary osteoarthritis undergoing total knee replacement surgery. Patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune disease as well as chondrodysplasias, infection-induced OA and posttraumatic OA were excluded from the study. Normal cartilage was obtained from individuals undergo-

ing fracture repair surgery and/or amputation, with no history of joint disease. The experimental part of the thesis includes the following:

- Evaluation of mRNA and protein expression of genes involved in BMP and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways in osteoarthritic and normal chondrocytes
- Investigation of the role of BMP-2 on Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway activation in osteoarthritic chondrocytes
- Role of the interaction between BMP-2 and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway on the expression of catabolic enzymes and hypertrophic markers in osteoarthritic chondrocytes
- Role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway on catabolic activity and hypertrophy of osteoarthritic chondrocytes
- Role of miR-140 on BMP-2 expression and articular cartilage degeneration in osteoarthritis

We observed that BMP-2, BMPR-1A, LRP-5 and LEF-1 expression levels were significantly upregulated in osteoarthritic chondrocytes compared to normal, whereas phospho- $\beta$ -catenin protein levels were significantly decreased in osteoarthritic chondrocytes, suggesting the excessive activation of BMP-2 and canonical Wnt signaling pathway in osteoarthritis and their involvement in its progression.

BMP-2 treatment in chondrocytes increased LRP-5 and the nuclear active form  $\beta$ -catenin levels and subsequent blocking of LRP-5 using siRNA in BMP-2 treated chondrocytes resulted in downregulation of the active form of  $\beta$ -catenin protein levels, showing that BMP-2 activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling through upregulation of LRP-5 expression. Analysis of LRP-5 promoter showed the presence of Smads response elements that per-

mit the binding of Smad1/5/8 complex and the direct regulation of LRP-5 transcription by BMP-2.

We also observed that BMP-2 increased MMP-13, MMP-9, ADAMTS-5 and collagen X expression in chondrocytes and when BMP-2-treated chondrocytes were transfected with siRNA against LRP-5, the expression of the above mentioned genes was decreased, suggesting that the interaction between BMP-2 and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling contributes to catabolic activity and hypertrophy in osteoarthritic chondrocytes. Moreover, we found that the above genes are targets of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, as the experimental activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by LiCl induced significant upregulation of MMP-9, 13, 14, ADAMTS-5 and COL10A1 in chondrocytes. The upregulation of the above genes take places in a direct manner, as we demonstrated conserved LEF-binding sites in *MMP-9*, *13*, *14*, *ADAMTS-5* and *COL10A1* promoters, responsible for their promoter activity and associated directly with  $\beta$ -catenin/LEF-1 complex. Finally, miR-140 treatment in osteoarthritic chondrocytes resulted in a decrease of BMP-2 expression and subsequent inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling as well as all molecules induced by it that leading to articular cartilage degeneration.

Our novel findings suggest the implication of BMP-2 and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways in chondrocytes' hypertrophy and cartilage degradation in osteoarthritis. Due to BMP-2-induced Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway activation through LRP-5 the articular chondrocytes cannot maintain the characteristics of the permanent cartilage, but instead enhance extracellular matrix degradation evidenced by increased MMPs and ADAMTS-5 expression and mature to hypertrophic through stimulation of collagen X expression. Moreover, miR-140 through blocking BMP-2 expression and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling resulted in downregulation of catabolic and hypertrophy markers and could

be therefore recommended as a new therapeutic target for OA treatment, highlighting the clinical importance of our results.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

	<b>Σελ</b>
<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>A.1 Οστεοαρθρίτιδα</b>	<b>25</b>
A.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά	25
A.1.2 Ταξινόμηση	27
A.1.3 Επιδημιολογία	28
A.1.4 Προδιαθεσικοί παράγοντες	29
A.1.4.1 Γενετική προδιάθεση	31
A.1.5 Δομή και μεταβολισμός του αρθρικού χόνδρου	36
A.1.6 Εκφυλισμός αρθρικού χόνδρου	40
<b>A.2 Χονδρογένεση και Ενδοχόνδρια Οστεοποίηση (ΕΟ)</b>	<b>44</b>
<b>A.3 Οστεοαρθρίτιδα και Ενδοχόνδρια Οστεοποίηση</b>	<b>48</b>
<b>A.4 Μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (BMPs)</b>	<b>50</b>
A.4.1 BMPs – Χονδρογένεση και Ενδοχόνδρια Οστεοποίηση	52
A.4.2 BMPs και Οστεοαρθρίτιδα	55

<b>A.5 Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη</b>	<b>58</b>
A.5.1 Wnt/β-κατενίνη και Ενδοχόνδρια Οστεοποίηση	61
A.5.2 Wnt/β-κατενίνη και Οστεοαρθρίτιδα	63
<b>A.6 microRNAs</b>	<b>67</b>
A.6.1 miR-140 και χονδρογένεση	69
A.6.2 miR-140 και Οστεοαρθρίτιδα	71
<b>A.7 Σκοπός της διατριβής</b>	<b>74</b>
<b>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>B.1 Υλικά και μέθοδοι</b>	<b>77</b>
B.1.1 Συλλογή δειγμάτων	77
B.1.2 Απομόνωση και καλλιέργεια χονδροκυττάρων	78
B.1.3 Απομόνωση RNA από χονδροκύτταρα κυτταροκαλλιέργειας	82
B.1.4 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	64
B.1.5 Ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων COL2A1, COL10A1, AGGREGAN, BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMP-1A, BMP-1B, LRP-5, LRP-6, LEF-1, TCF-4, MMP-7, 9, 13, 14, ADAMTS-4 και 5 με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR)	86
B.1.6 Απομόνωση πρωτεϊνών από χονδροκύτταρα κυτταροκαλλιέργειας	91
B.1.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS	93
B.1.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)	96
B.1.9 Ανοσοϊστοχημεία	100
B.1.10 Επιδράσεις με BMP-2 και LiCl σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων	103
B.1.11 Ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης	104

B.1.12 Αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων με τη χρήση των μικρών παρεμβατικών μορίων RNA (siRNAs και microRNAs)	111
B.1.13 Ανάλυση των υποκινητών των γονιδίων και της 3' αμετάφραστης περιοχής των mRNAs με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής	115
B.1.13 Στατιστική ανάλυση	115
<b>B.2 Αποτελέσματα</b>	<b>117</b>
B.2.1 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων COL2A1, COL10A1, αγκρεκάνη και MMP-13 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων	117
B.2.2 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMPR-IA και BMPR-IB σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων	117
B.2.3 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων LRP-5, LRP-6, φωσφο-β-κατενίνη, LEF-1, και TCF-4 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων	119
B.2.4 Προσδιορισμός της έκφρασης της β-κατενίνης και της φώσφο-β-κατενίνης σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με BMP-2	121
B.2.5 Προσδιορισμός της έκφρασης του LRP-5 και 6 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με BMP-2	122
B.2.6 Ανάλυση του υποκινητή του γονιδίου <i>LRP-5</i> για την ύπαρξη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων Smad 1/5/8	123
B.2.7 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης της β-κατενίνης και της φώσφο-β-κατενίνης σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων μετά από	

επίδραση με BMP-2 και ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου LRP-5 με τη χρήση siRNA έναντι του LRP-5

124

B.2.8 Προσδιορισμός της έκφρασης καταβολικών ενζύμων και υπερτροφικών παραγόντων σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με BMP-2 και ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου LRP-5 με τη χρήση siRNA έναντι του LRP-5

126

B.2.9 Προσδιορισμός της έκφρασης καταβολικών ενζύμων και υπερτροφικών παραγόντων σε χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με LiCl και ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου LEF-1 με τη χρήση siRNA έναντι του LEF-1

128

B.2.10 Ανάλυση του υποκινητή των γονιδίων MMP-7, 9, 13, 14, ADAMTS-5, 4 και COL10A1 για την ύπαρξη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του LEF-1

131

B.2.11 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του miR-140 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων

132

B.2.12 Γονιδιακής ρύθμιση της BMP-2 μέσω της δράσης του miR-140

133

B.2.13 Έκφρασης της β-κατενίνης μετά από επίδραση με miR-140

135

B.2.14 Προσδιορισμός της έκφρασης καταβολικών ενζύμων και υπερτροφικών παραγόντων σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με miR-

140 136

**B.3 Συζήτηση 138**

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 155**





## A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

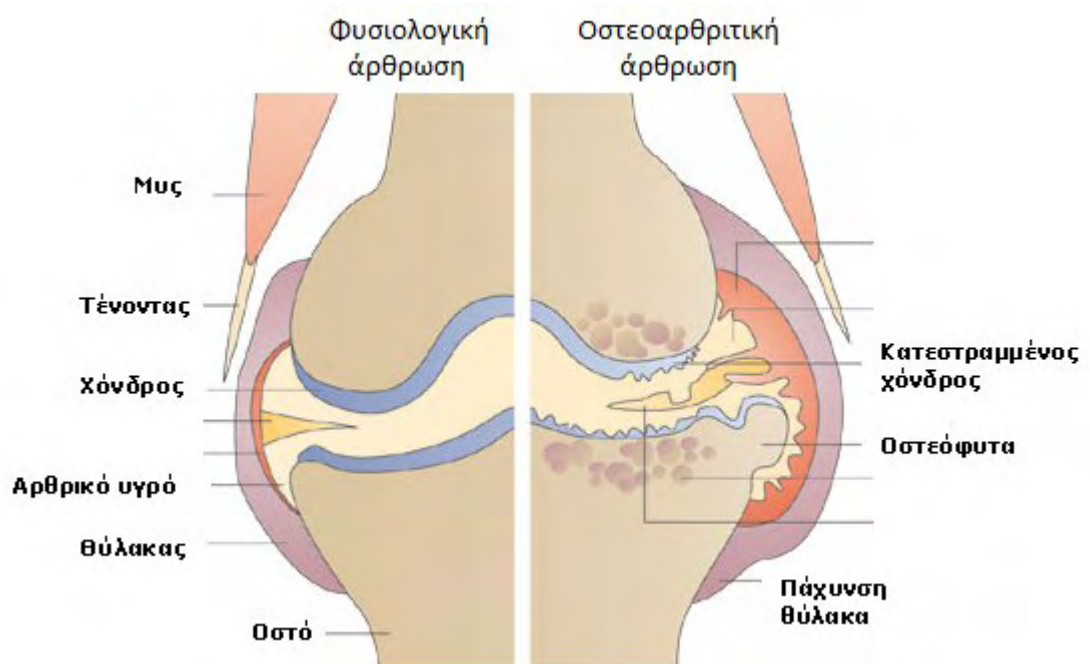
### A.1 Οστεοαρθρίτιδα

#### A.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι μια χρόνια και προοδευτικά εξελισσόμενη πάθηση των αρθρώσεων και της σπονδυλικής στήλης. Η ΟΑ είναι η πιο κοινή μορφή αρθρίτιδας στις ανεπτυγμένες χώρες και ανήκει στις τέσσερις ασθένειες του Μυοσκελετικού με την μεγαλύτερη επιβάρυνση (15.000.000 νέοι ασθενείς κάθε χρόνο στην Ευρωπαϊκή Ένωση) στον πληθυσμό [1, 2]. Μπορεί να προσβάλλει οποιαδήποτε άρθρωση του σώματος αλλά εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε αυτές των χεριών, του γόνατος, της σπονδυλικής στήλης και του ισχίου [3].

Η προσβεβλημένη άρθρωση χαρακτηρίζεται από τον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, που καλύπτει την επιφάνεια των οστών μέσα στην άρθρωση, στένωση του αρθρικού διαστήματος, σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού και παρουσία νέων οστικών

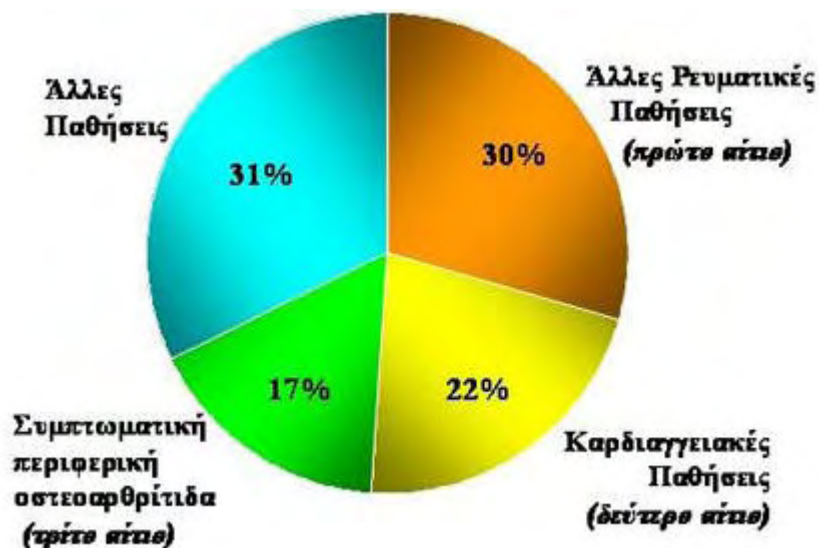
σχηματισμών στα όρια των αρθρικών επιφανειών, των οστεοφύτων (Εικόνα 1). Οι ασθενείς που προσβάλλονται από τη νόσο υποφέρουν από έντονο πόνο και δυσκαμψία, η οποία προοδευτικά γίνεται έντονη, μόνιμη και τελικά η άρθρωση χάνει την πλήρη κινητικότητα της. Σε προχωρημένα στάδια της νόσου ο περιορισμός της κινητικότητας της άρθρωσης επιφέρει μείωση των δραστηριοτήτων των ασθενών και ραγδαία υποβάθμιση της ποιότητας ζωής τους [4].



Εικόνα 1: Αλλαγές που παρατηρούνται σε μια οστεοαρθρική άρθρωση

Η αιτιολογία της οστεοαρθρίτιδας είναι πρακτικά άγνωστη και πιστεύεται πως είναι πολύ-παραγοντική. Μεταξύ των επιβαρυντικών παραγόντων είναι το μηχανικό φορτίο, η παχυσαρκία, οι τραυματισμοί των αρθρώσεων καθώς και η γενετική προδιάθεση [5]. Η συχνότητα της νόσου αυξάνει με την ηλικία με αποτέλεσμα ο αριθμός των ατόμων που πάσχει από οστεοαρθρίτιδα να αυξάνει συνεχώς τα τελευταία

χρόνια, λόγω της αύξησης του αριθμού των ηλικιωμένων ατόμων, ιδίως στις ανεπτυγμένες χώρες. Η διαθέσιμη φαρμακευτική θεραπευτική αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας δεν έχει επιφέρει τα βέλτιστα αποτελέσματα με επακόλουθο σε πολλές περιπτώσεις η χειρουργική επέμβαση να αποτελεί μονόδρομο σε μια προσπάθεια βελτίωσης της κλινικής εικόνας του ασθενούς. Βάσει των ανωτέρω η οστεοαρθρίτιδα ανάγεται σε μείζον ιατρικό, κοινωνικό και οικονομικό πρόβλημα με δυσμενείς επιπτώσεις στο κοινωνικό σύνολο και στην εθνική οικονομία, καθώς αποτελεί το τρίτο κατά σειρά συχνότητας αίτιο μακροχρόνιας λειτουργικής ανικανότητας μετά τις ρευματικές παθήσεις και τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Εικόνα 2). Κρίνεται, λοιπόν, απαραίτητη η διερεύνηση νέων καινοτόμων θεραπευτικών κυτταρικών προσεγγίσεων που θα στοχεύουν στην αναστολή της εξέλιξης της νόσου.



Εικόνα 2: Αίτια μακροχρόνιας λειτουργικής ανικανότητας στο γενικό πληθυσμό ενηλίκων της Ελλάδος. Η συμπτωματική ΟΑ των αρθρώσεων των άνω και κάτω άκρων είναι το τρίτο κατά σειρά συχνότητας αίτιο μακροχρόνιας λειτουργικής ανικανότητας.

### **A.1.2 Ταξινόμηση**

Η ΟΑ με βάση την αιτιολογία ανάπτυξης της διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Η πρωτοπαθής ΟΑ εκδηλώνεται σε προχωρημένη ηλικία και θεωρείτο στο παρελθόν μία πάθηση της τρίτης ηλικίας, αποτέλεσμα της γήρανσης των αρθρώσεων. Ωστόσο, έχει αποδεχτεί ότι η πρωτοπαθής ΟΑ παρόλο που σχετίζεται με την ηλικία δεν προκαλείται από αυτή, καθώς υπάρχουν υπερήλικες που δεν παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα της νόσου και άτομα που εμφανίζουν τις πρώτες ακτινολογικές αλλοιώσεις σε πολλή μικρή ηλικία. Η αιτία της πρωτοπαθούς ΟΑ θεωρείται η διαταραχή του ισοζυγίου της αναδόμησης και αποδόμησης του αρθρικού χόνδρου, χωρίς ωστόσο να είναι πλήρως γνωστοί οι κυτταρικοί, μοριακοί και μεταβολικοί μηχανισμοί που συμβάλλουν σε αυτή τη διαταραχή [6].

Η δευτεροπαθής ΟΑ αντιθέτως εμφανίζεται σε νεαρή ηλικία, έχει σαφή αίτια αλλά δεν διαφέρει παθολογικά από την πρωτοπαθή. Οι αιτίες ανάπτυξης της μπορεί να είναι ανατομικές ανωμαλίες, τραυματισμοί, συστηματικά νοσήματα (αιμοχρωμάτωση, νόσος Wilson, ακρομεγαλία, υπερπαραθυρεοειδισμός) ή είναι επακόλουθο λοιμώξεων (σηπτική αρθρίτιδα) [4].

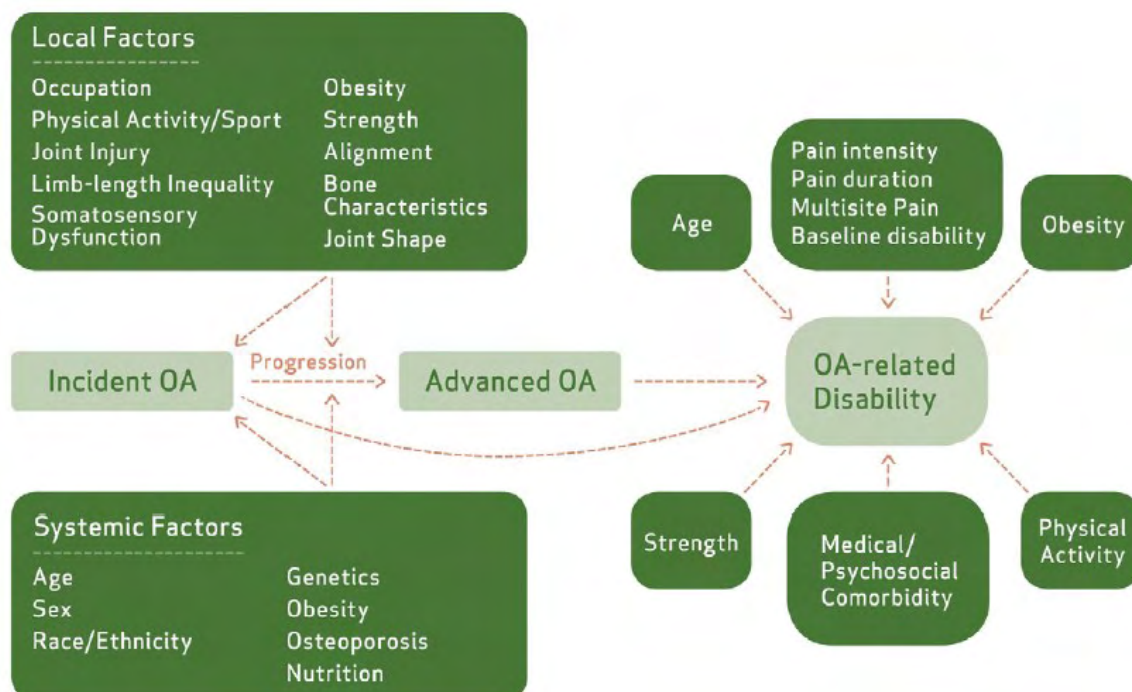
### **A.1.3 Επιδημιολογία**

Η ΟΑ είναι η πιο κοινή μορφή αρθρίτιδας στις ανεπτυγμένες χώρες και μια από τις βασικές αιτίες αναπηρίας του ενήλικου πληθυσμού στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και στην Ευρώπη. Η ΟΑ διαγιγνώσκεται περίπου στο 50% των ατόμων άνω των 65 ετών και σε περισσότερο από το 30% των ατόμων ηλικίας 45-65 ετών [7]. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων ηλικίας άνω των 75 ετών έχουν ακτινογραφικά

ευρήματα οστεοαρθρίτιδας σε κάποια από τις αρθρώσεις του σώματος [8]. Σύμφωνα με πανελλήνια επιδημιολογική έρευνα για την οστεοαρθρίτιδα που πραγματοποιήθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Ρευματολογικών Παθήσεων, στον ελληνικό πληθυσμό βρέθηκε ότι ο συνολικός επιπολασμός, δηλ. η συνολική συχνότητα, της συμπτωματικής οστεοαρθρίτιδας, που αφορά τις αρθρώσεις τόσο των άνω και κάτω άκρων όσο και της σπονδυλικής στήλης, ανέρχεται στο 13,1% των ενηλίκων. Από όλες τις εντοπίσεις της συμπτωματικής οστεοαρθρίτιδας συχνότερη είναι η εκφυλιστική σπονδυλαρθροπάθεια (6,9%) και ακολουθούν η οστεοαρθρίτιδα του γόνατος (6%), των χεριών (2%) και του ισχίου (0,9%). Περίπου το 20% των ασθενών με συμπτωματική οστεοαρθρίτιδα παρουσιάζουν δύο ή περισσότερες από τις παραπάνω εντοπίσεις [9]. Στην Ελλάδα η επίπτωση της ΟΑ γόνατος σε ηλικίες μέχρι 60 ετών ανέρχεται σε ποσοστό 14%, ενώ σε ηλικίες μεγαλύτερες των 80 ετών φθάνει το 30% [9]. Στη νότια Αμερική η επίπτωση της νόσου ανέρχεται στο 4,14% στην Βραζιλία [10] και 11,7% στην Κούβα [11]. Στην Ασιατική ήπειρο η επίπτωση της ΟΑ γόνατος κυμαίνεται μεταξύ 3,1-4,6% στο Πακιστάν [12], 7,5-10,6% στο Μπαγκλαντές [13] και 5,1-12,2% στην Ινδία [14]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της μελέτης Framingham, ένα στα τέσσερα άτομα στην ηλικία των 60 ετών παρουσίαζε ακτινολογικές αλλοιώσεις οστεοαρθρίτιδας, ενώ το ποσοστό αυτό ξεπερνούσε το 50% στον πληθυσμό άνω των 80 ετών [15]. Οι επιδημιολογικές διαφορές που παρατηρούνται στους διάφορους πληθυσμούς μπορεί να οφείλονται σε γενετικές διαφορές, διαφορές στις συνθήκες διαβίωσης, την ηλικία και την επαγγελματική δραστηριότητα.

#### **A.1.4 Προδιαθεσικοί παράγοντες**

Η μελέτη της παθογένειας της ΟΑ έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πολλών επιδημιολογικών ερευνών. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αποδεκτό ένα πιθανό μοντέλο που εξηγεί την παθογένεια της νόσου και περιλαμβάνει τα εξής βασικά σημεία: α) όλες οι δομές της άρθρωσης και οι λειτουργίες τους αποτελούν ένα βιομηχανικό οργανικό σύστημα, υπεύθυνο για την σωστή κίνηση της άρθρωσης και την αποφυγή της υπερφόρτωσης της, β) συστηματικοί και βιομηχανικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κίνδυνο ανάπτυξης της ΟΑ και γ) συστηματικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με μηχανικούς παράγοντες στο μικροπεριβάλλον της άρθρωσης καθορίζοντας την εξέλιξη της νόσου στην εκάστοτε προσβεβλημένη άρθρωση (Εικόνα 3) [2, 3, 5].



Εικόνα 3: Παράγοντες που συμμετέχουν στην παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας

Πολλοί συστηματικοί παράγοντες έχουν ταυτοποιηθεί ως παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση ΟΑ γόνατος, ισχίου και χεριών. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται η ηλικία, το φύλο, η εθνικότητα, η φυλή και η γενετική προδιάθεση [16]. Οι παραπάνω παράγοντες ενισχύουν την προδιάθεση για εκδήλωση ΟΑ καθώς αυξάνουν την ευπάθεια των αρθρώσεων για τραυματισμό και αναστέλλουν την διαδικασία αναδόμησης των κατεστραμμένων αρθρώσεων. Εκτός όμως από τους συστηματικούς παράγοντες, η εκδήλωση της νόσου ενισχύεται με τη δράση των τοπικών βιομηχανικών παραγόντων (παχυσαρκία, τραύμα, αδυναμία μυών και δυσμορφία άρθρωσης), οι οποίοι συμβάλλουν στην εξέλιξη της μέσω παρατεταμένης φόρτισης της άρθρωσης [16].

#### A.1.4.1 Γενετική προδιάθεση

Η ΟΑ θεωρείται πολυπαραγοντικό νόσημα με ισχυρή γενετική συνιστώσα. Η γενετική διερεύνηση της νόσου μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις: α) μελέτες ανάλυσης σύνδεσης, β) μελέτες συσχέτισης και γ) μελέτες γονιδιακής έκφρασης. Μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευτεί τέσσερις μεγάλες μελέτες ανάλυσης σύνδεσης για την ΟΑ, βασισμένες σε οικογένειες που είχαν περισσότερα του ενός πάσχοντα άτομα. Οι μελέτες αυτές προερχόμενες από το Ηνωμένο Βασίλειο (Oxford study) [17-20] την Ισλανδία (Ice-

Country	Locus	Gene	Strata
UK	2q24.3-q31.1	FRZB	Female hip
	4q13.1-q13.2	-	Female hip
	6p12.3-q13	-	Female hip
	11q13.4-q14.3	-	Female hip
	16p12.3-p12.1	IL4R	Female hip
Finland	16q22.1-q23.1	-	Females
	2q12-q21	IL1 cluster	Hand (DIP <sup>+</sup> ), knee and hip
	4q26-q27	-	Hand (DIP <sup>+</sup> )
	7p15-p21	-	Hand (DIP <sup>+</sup> )
Iceland	Xcen	-	Hand (DIP <sup>+</sup> )
	2p24.1	MATN3	Hand (CMC <sup>+</sup> and DIP <sup>+</sup> )
USA	3p13-p12.3	-	Hand (DIP <sup>+</sup> )
	4q32.1-q32.2	-	Hand (DIP <sup>+</sup> )
	1p32.1-p22.1	-	Hand <sup>+</sup>
	2p24.2-p21	-	Hand <sup>+</sup>
	7p14.1-p12.3	-	Hand <sup>+</sup>
	7q35-q36.1	-	Hand (DIP <sup>+</sup> )
	9q21.13-q21.33	-	Hand <sup>+</sup>
	11q13.2-q14.2	-	Hand <sup>+</sup>
12q24.33	-	Hand <sup>+</sup>	
13q14.11-q14.3	-	Hand <sup>+</sup>	
15q22.31-q26.1	-	Hand (CMC <sup>+</sup> )	
19q13-q13.33	-	Hand <sup>+</sup>	

Πίνακας 1: Γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την ΟΑ. Αποτελέσματα 4 μεγάλων πολυκεντρικών μελετών

land study) [21], τη Φιλανδία (Finnish study) [22] και τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (USA study) [23, 24] ανέδειξαν έναν αριθμό χρωμοσωμικών περιοχών που φαίνεται να σχετίζονται με τη νόσο όπως η 2p, 2q, 4q, 6p, 7p, 11q, 16p, 16q και η κεντρομεριδιακή περιοχή του Χ χρωμοσώματος (Πίνακας 1). Το χρωμόσωμα 2 εμφανίζεται σε όλες τις παραπάνω μελέτες, αλλά το γεγονός ότι δεν υπάρχει αλληλοκάλυψη των προτεινόμενων περιοχών σύνδεσης δείχνει ότι πιθανότατα το συγκεκριμένο χρωμόσωμα περιέχει αρκετά γονίδια που μπορεί να ενέχονται στην ανάπτυξη ΟΑ.

Οι μελέτες σύνδεσης αποτελούν τη βάση για τη γενετική ανάλυση κοινών ασθενειών όπως η οστεοαρθρίτιδα. Αρκετές από τις προτεινόμενες χρωμοσωμικές περιοχές σύνδεσης με την ΟΑ έχουν γίνει αντικείμενο αναλύσεων συσχέτισης και έχουν αποκαλύψει έναν αριθμό γονιδίων που φαίνεται να ενέχονται στην παθογένεια της νόσου, όπως γονίδια που κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου και του οστού ή γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της οστικής και μαζικής πυκνότητας [5, 25, 26]. Στο χρωμόσωμα 2 βρίσκεται η ομάδα γονιδίων της ιντερλευκίνη 1 (IL-1) (2q11.2-q13) [22], το γονίδιο *MATN3* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη matrilin 3, μια πρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου (2p24.1) [21], και το γονίδιο *FRZB* (2q32.1) το προϊόν του οποίου δρα ως ανταγωνιστής του εξωκυττάριας συνδέτη Wnt και φαίνεται να ελέγχει την ωρίμανση των χονδροκυττάρων [20]. Η χρωμοσωμική περιοχή 6p12.3-q13 που φαίνεται να συνδέεται με ΟΑ ισχίου σε θήλεα άτομα (μελέτη Ηνωμένου Βασιλείου) περιέχει δύο γονίδια που πιθανόν ενέχονται στην ανάπτυξη της ΟΑ: την *BMP-5* και το *COL9A* [19]. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το πρώτο γονίδιο ρυθμίζει την ανάπτυξη των χονδροκυττάρων, ενώ το κολλαγόνο τύπου IX, που παράγεται από το δεύτερο γονίδιο, αποτελεί ένα μικρό ποσοστό του συνολικού κολλαγόνου του χόνδρου και είναι απαραίτητο για την



διατήρηση της ακεραιότητας του χόνδρου [27, 28]. Επίσης, στους γενετικούς τόπους 11q13.2 και 16p12.1 βρίσκονται τα γονίδια του *LRP-5* και του *IL-4R*, αντίστοιχα [17, 29], τα οποία παίζουν ρόλο στην απάντηση των χονδροκυττάρων σε μηχανικά σήματα αλλά και στη δομική ακεραιότητα του χόνδρου [30, 31].

Μελέτες συσχέτισης έχουν αναδείξει έναν αριθμό γονιδίων που φαίνεται να ενέχονται στην εκδήλωση και εξέλιξη της νόσου, τα οποία όμως δεν εδράζουν σε γενετικούς τόπους που συνδέονται με την ΟΑ. Τα γονίδια αυτά παράγουν ουσίες της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου ή είναι σηματοδοτικά μόρια που ελέγχουν τη λειτουργικότητα των χονδροκυττάρων. Η ασπορίνη (asporin) είναι ένα μακρομόριο της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου και έχει την ικανότητα να συνδέονται με διάφορα συστατικά της, όπως το κολλαγόνο αλλά και αυξητικούς παράγοντες (TGF-β). Το γονίδιο *ASPN* εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 9q22.31, μια περιοχή που δεν έχει αναφερθεί μέχρι τώρα από τις αναλύσεις σύνδεσης να ενέχεται στην ανάπτυξη της νόσου [32]. Στο γονίδιο της ασπορίνης εντοπίζεται ένας πολυμορφισμός επαναλαμβανόμενης τριπλέτας νουκλεοτιδίων, ο οποίος είναι λειτουργικός καθώς ενισχύει την κατασταλτική δράση της ασπορίνης στην έκφραση των αγγρεκανών και του κολλαγόνου τύπου II, βασικά συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου [33]. Η καλμοδουλίνη 1 (CALM1) είναι μια ενδοκυττάρια πρωτεΐνη που συνδέεται με το ασβέστιο και αλληλεπιδρά με έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών. Η καλμοδουλίνη 1 αυξάνει την έκφραση του γονιδίου *AGC1* και του *COL2A1* και πολυμορφισμός του γονιδίου φαίνεται να σχετίζεται με την εκδήλωση ΟΑ [34]. Τα προαναφερθέντα γονίδια έχουν μελετηθεί και στον Ελληνικό πληθυσμό και έχει δειχθεί η συσχέτιση τους με ΟΑ γόνατος [35-37]. Ισχυρή συσχέτιση με την ΟΑ παρουσιάζει επίσης ένας πολυμορφισμός του γονιδίου του αυξητικού παράγοντα διαφοροποίησης 5 (GDF-5), μέλος της

οικογένειας των μορφογενετικών πρωτεϊνών, ο οποίος εντοπίζεται στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου και έχει συσχετιστεί με OA γόνατος και ισχίου [38-44]. Ο παραπάνω πολυμορφισμός φαίνεται να επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή του *GDF-5* γονιδίου με αποτέλεσμα τη μειωμένη μεταγραφική παραγωγή του γονιδίου στον OA χόνδρο [41]. Επίσης, γενετικές μελέτες αποκάλυψαν τη συσχέτιση του γονιδίου *SMAD3* με την OA [45]. Η πρωτεΐνη *SMAD3* συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF- $\beta$  και μειωμένη δραστηριότητα της οδηγεί σε οστεοαρθρικό φαινότυπο των χονδροκυττάρων [46]. Τέλος, δύο μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού της θυρεοειδούς ορμόνης, *DOI2* και *DOI3*, αυξάνουν τον κίνδυνο για την εκδήλωση OA, σύμφωνα με μελέτες συσχέτισης που πραγματοποιήθηκαν στον Ασιατικό και Ευρωπαϊκό πληθυσμό [47, 48]. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό πως τα περισσότερα μόρια που προδιαθέτουν για την εκδήλωση OA συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια, απαραίτητα για τη διαφοροποίηση και ωρίμανση των χονδροκυττάρων κατά την αναπτυξιακή διαδικασία. Μη φυσιολογική λειτουργία των παραπάνω μορίων λόγω των λειτουργικών πολυμορφισμών που φέρουν, μπορεί να συμβάλει στην αλλαγή της λειτουργικότητας των χονδροκυττάρων μέσω της τροποποιημένης έκφρασης γονιδίων που οδηγούν στον οστεοαρθρικό φαινότυπο των ενήλικων χονδροκυττάρων.

Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες συσχέτισης που μελετούν συγκεκριμένα υποψήφια γονίδια και περιορισμένο αριθμό πολυμορφισμών αντικαθίστανται από μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-wide association scan GWAS). Οι GWAS πραγματοποιούνται σε μεγάλο αριθμό ατόμων και με τη δυνατότητα επανάληψης της διαδικασίας για τη διεξαγωγή ασφαλών αποτελεσμάτων [49]. Μέχρι σήμερα, οι μεγάλες μελέτες GWAS που πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να

διερευνηθεί η συμμετοχή υποψηφίων γονιδίων στην ΟΑ έχουν συσχετίσει 15 κοινούς πολυμορφισμούς με ΟΑ γόνατος ή ισχίου σε Ευρωπαϊκούς και Ασιατικούς πληθυσμούς [50, 51]. Μεταξύ αυτών, η μελέτη του Rotterdam αποκάλυψε συσχέτιση της χρωμοσωμικής περιοχής 7q22 με την ΟΑ, περιοχή όπου εδράζουν 6 γονίδια, κανένα όμως από τα οποία δεν φαίνεται με ενέχεται στην εκδήλωση της νόσου [52]. Η μελέτη του Tokyo έδειξε συσχέτιση δύο μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) που εντοπίζονται στο σύμπλεγμα HLA του χρωμοσώματος 6 με ΟΑ γόνατος [53], ενώ η μελέτη arcOGEN συσχέτισε 8 γενετικούς τόπους με την ΟΑ στους οποίους εδράζουν γονίδια που συμμετέχουν στην δομή και λειτουργία του αρθρικού χόνδρου [54, 55]. Μετα-ανάλυση των μεγαλύτερων GWAS αποκάλυψε τη συσχέτιση ενός πολυμορφισμού που βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 20q13 με ΟΑ ισχίου. Στην περιοχή αυτή εντοπίζεται το γονίδιο *NCOA3*, το οποίο υποεκφράζεται στον ΟΑ χόνδρο και φαίνεται να συμβάλλει στην παθογένεια της νόσου [50]. Τέλος, σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση 9 μελετών GWAS αποδείχτηκε η συσχέτιση δύο γονιδίων, *COL11A1* και *VEGF*, με την ΟΑ [56].

Η τελευταία προσέγγιση της μελέτης της γενετικής συνιστώσας της ΟΑ μπορεί να γίνει με τις μελέτες έκφρασης των γονιδίων στον υπό εξέταση ιστό (functional approach). Το 2001 μελετήθηκε το μοντέλο της γονιδιακής έκφρασης σε ΟΑ και σε φυσιολογικούς ιστούς όσον αφορά γονίδια που δομούν την εξωκυττάρια ουσία του χόνδρου αλλά και αυτά που την αποδομούν. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το κολλαγόνο τύπου II και IV εκφράζονται σε προχωρημένα στάδια ΟΑ, αποκαλύπτοντας την ικανότητα αναδιαμόρφωσης της δομής της εξωκυττάριας ουσίας σε προχωρημένα στάδια της ασθένειας, ενώ η αύξηση της έκφρασης της φμπρονεκτίνης στα αρχικά στάδια του εκφυλισμού του χόνδρου φανερώνει ότι αποτελεί βασικό ρυθμιστή της

αναδιαμόρφωσης της εξωκυττάριας ουσίας από τα χονδροκύτταρα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της ασθένειας. Όσον αφορά τις MMPs, αυξημένη έκφραση εμφανίζουν σε αρχικά στάδια της νόσου η MMP-3 και η MMP-11, ενώ σε προχωρημένα στάδια η MMP-3 μειώνει την έκφραση της, η MMP-11 παραμένει σε υψηλά επίπεδα και αρχίζει να αυξάνει η έκφραση των MMP-2 και MMP-13. Η παρουσία της MMP-2 και MMP-13 σε προχωρημένα στάδια, αποκαλύπτει ότι στην έναρξη της ασθένειας δεν αποικοδομείται το κολλαγόνο αλλά άλλα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας όπως οι πρωτεογλυκάνες και άλλα μη κολλαγονούχα μόρια [57]. Επίσης, με τη τεχνική των μικροσυστοιχιών και της πρωτεωμικής ανάλυσης επιβεβαιώθηκε η διαφοροποιημένη έκφραση πολλών γονιδίων μεταξύ OA και φυσιολογικών ιστών της άρθρωσης, τα οποία συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες των κυττάρων. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια σχετίζονται με την φλεγμονή, την αγγειογένεση, την αποδόμηση του χόνδρου, τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων αλλά και με την ανάπτυξη των οστών [58-63].

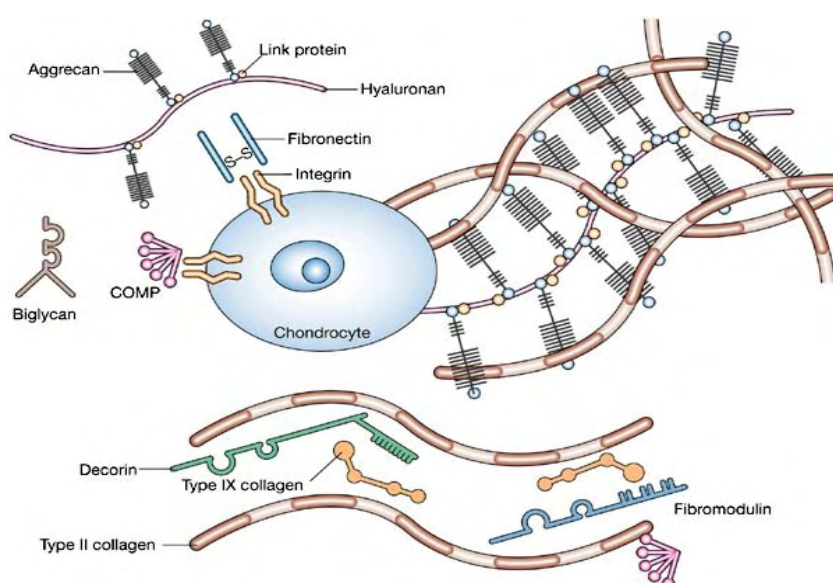
#### **A.1.5 Δομή και μεταβολισμός του αρθρικού χόνδρου**

Στις διάφορες αρθρώσεις, ο αρθρικός θύλακας περιβάλλει την επιφάνεια των οστών και καλύπτεται από την αρθρική μεμβράνη, η οποία συμβάλλει στη λίπανση των αρθρικών επιφανειών λόγω της έκκρισης του αρθρικού υγρού. Η κίνηση των αρθρώσεων ενισχύεται από τον λείο αρθρικό χόνδρο που είναι ένας υποκυτταρικός, χωρίς αγγεία ιστός και συνίσταται από την εξωκυττάρια ουσία, βασικά συστατικά της οποίας είναι το κολλαγόνο και οι πρωτεογλυκάνες, και από τα χονδροκύτταρα [64] (Εικόνα 4). Τα χονδροκύτταρα αποτελούν τον μοναδικό κυτταρικό τύπο του ιστού και είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της σύνθεσης και της αποδόμησης των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, διαδικασίες που επηρεάζονται

από ποικίλους παράγοντες όπως, μηχανική πίεση, κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες και τραυματισμοί [65].

Ποικίλοι τύποι κολλαγόνου συμμετέχουν στην οργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας με βασικότερο το κολλαγόνο τύπου II που αποτελεί το 90-95% του συνολικού κολλαγόνου και το 10% του βάρους του ιστού. Άλλοι τύποι κολλαγόνου που απαντώνται στον ιστό είναι το κολλαγόνο τύπου IX, XI, III, V (εντοπίζεται κυρίως σε γηραιότερους ιστούς) , VI (βρίσκεται γύρω από τα χονδροκύτταρα και συμμετέχει στην προσκόλληση των κυττάρων), X (χαρακτηριστικός για τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα), XII XIV [66].

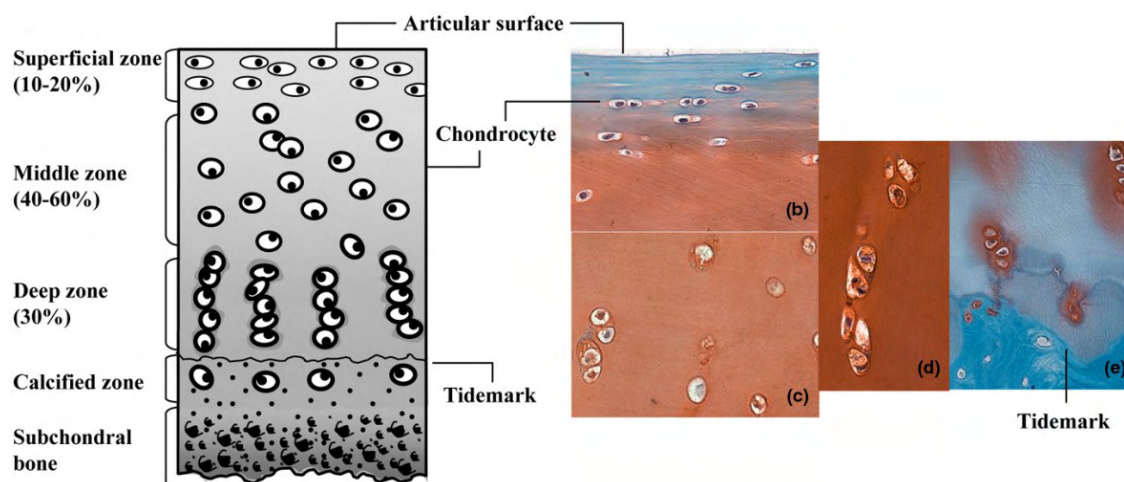
Έκτος από τους διάφορους τύπους κολλαγόνου στη βασική οργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας συμμετέχουν οι πρωτεογλυκάνες με πιο χαρακτηριστικές τις αγγρεκάνες, οι οποίες δημιουργούν συσσωματώματα και συνδέονται με δύο μόρια: το υαλουρονικό οξύ και με μια πρωτεΐνη σύνδεσης (link protein). Επιπλέον, υπάρχουν και μικρού μεγέθους πρωτεογλυκάνες όπως η decorin, η fibromodulin και η biglycan που συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της δομής της εξωκυττάριας ουσίας [65].



Εικόνα 4: Δομικά συστατικά του αρθρικού χόνδρου

Ο ενήλικος αρθρικός χόνδρος έχει πάχος λίγα χιλιοστά και χωρίζεται σε τέσσερις στιβάδες: την επιφανειακή ή ζώνη ολίσθησης, την ενδιάμεση ή μεταβατική, την εν τω βάθει ή κυκλοτερή και την ασβεστοποιημένη ζώνη. Κάθε μια από τις παραπάνω στιβάδες επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες και διαφέρουν ως προς τη σύσταση της ECM, τη συγκέντρωση του νερού, τον προσανατολισμό των ινών του κολλαγόνου, τη μορφολογία και τη διάταξη των χονδροκυττάρων [67-72] (Εικόνα 5). Η επιφανειακή στιβάδα του αρθρικού χόνδρου αποτελείται από ίνες κολλαγόνου με οριζόντια διάταξη, αποπλατυσμένα κύτταρα, έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεογλυκάνες και υψηλά επίπεδα νερού [67, 68, 70]. Η ενδιάμεση ή μεταβατική στιβάδα, αντιπροσωπεύει το 40-60% του ολικού πάχους του χόνδρου και χαρακτηρίζεται από ίνες κολλαγόνου με τη μεγαλύτερη διάμετρο και την οργάνωση τους σε ακτινωτές δεσμίδες ή στιβάδες. Τα χονδροκύτταρα σε αυτή τη στιβάδα είναι υποστρόγγυλα και μεταβολικά ενεργά [67, 68, 70].

Η εν τω βάθει στιβάδα βρίσκεται κάτω από την ενδιάμεση στιβάδα και περιέχει ίνες κολλαγόνου με μεγάλη διάμετρο και διάταξη κάθετη προς την αρθρική επιφάνεια. Τα χονδροκύτταρα είναι σφαιρικά και οργανωμένα σε στήλες. Η συγκέντρωση των πρωτεογλυκανών είναι η υψηλότερη σε αυτή τη στιβάδα και το ποσοστό του νερού το μικρότερο [67, 68]. Η τέταρτη και τελευταία στιβάδα του ενήλικου χόνδρου είναι η ασβεστοποιημένη στιβάδα και διαχωρίζεται από την προηγούμενη της μέσω μιας πλάκας που ονομάζεται tidemark. Ο ρόλος της πλάκας αυτής είναι να διαχωρίζει τον χόνδρο από το υποχόνδριο οστό. Σε αυτή τη στιβάδα τα χονδροκύτταρα είναι μικρά, λιγιστά και υπερτροφικά και κατανέμονται τυχαία σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε κρυστάλλους υδροξυαπατίτη [67, 70, 71].



Εικόνα 5: Οι τέσσερις στιβάδες του αρθρικού χόνδρου

Ο ενήλικος αρθρικός χόνδρος στερείται αγγείωσης με αποτέλεσμα τα χονδροκύτταρα να προσλαμβάνουν το απαραίτητο οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά από το αρθρικό υγρό με απλή διάχυση. Στα πλαίσια του μεταβολισμού του φυσιολογικού αρθρικού χόνδρου, τα χονδροκύτταρα παίζουν καταλυτικό ρόλο καθώς φέρουν στην επιφάνεια τους μηχανοϋποδοχείς για να αντιδρούν σε μηχανικές φορτίσεις αλλά και υποδοχείς για ποικίλους αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες που ρυθμίζουν τις αναβολικές και καταβολικές διεργασίες των χονδροκυττάρων [65].

Ο μεταβολισμός του χόνδρου περιλαμβάνει δύο φάσεις: μια βιοσυνθετική ή αναβολική και μια καταβολική ή εκφυλιστική φάση. Κατά την πρώτη φάση τα χονδροκύτταρα προσπαθούν να διατηρήσουν τη φυσιολογική δομή του χόνδρου μέσω σύνθεσης των δομικών συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, δηλαδή του κολλαγόνου και των πρωτεογλυκανών. Κατά την καταβολική φάση τα χονδροκύτταρα παράγουν ένζυμα που αποδομούν τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας ενώ παράλληλα αναστέλλουν τη σύνθεσή τους. Σε φυσιολογικές συνθήκες τα χονδροκύτταρα διατηρούν

μα ισορροπία μεταξύ αναβολικών και καταβολικών διεργασιών προκειμένου να εξασφαλίζεται η σωστή δομή και λειτουργία του ιστού [65] (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Μεταβολισμός αρθρικού χόνδρου. Τα χονδροκύτταρα διατηρούν την ισορροπία μεταξύ αναβολισμού και καταβολισμού στον αρθρικό χόνδρο

#### A.1.6 Εκφυλισμός αρθρικού χόνδρου

Τα χονδροκύτταρα αποτελούν τον μοναδικό κυτταρικό τύπο που απαντώνται στον ώριμο αρθρικό χόνδρο και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας, καθώς ενεργοποιούν τις διαδικασίες αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου, μέσω της παραγωγής καταβολικών μορίων, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν τις διαδικασίες ανασυγκρότησης της. Σε αρχικά στάδια της νόσου, τα χονδροκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη συνθετική δραστηριότητα σε μια προσπάθεια ανακατασκευής του χόνδρου, συνθέτοντας μόρια κολλαγόνου τύπου II, IX, XI και αγγρεκανών, ενώ σε προχωρημένα στάδια της νόσου ενισχύεται η παραγωγή καταβολικών μορίων, η αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας και κατ'επέκταση ο εκφυλισμός του χόνδρου [73].



Η μη φυσιολογική λειτουργία των χονδροκυττάρων χαρακτηρίζεται από την παρουσία ινιδίων στο χόνδρο, μείωση της εξωκυττάριας ουσίας, δημιουργία συμπλεγμάτων κυττάρων και από αλλαγές στην ποιότητα, την κατανομή και τη σύνθεση των εξωκυττάρων πρωτεϊνών [74]. Η παρουσία διαφόρων τύπων κολλαγόνου που φυσιολογικά δεν απαντώνται σε ενήλικο χόνδρο παρά μόνο σε υπερτροφικά χονδροκύτταρα όπως το κολλαγόνο τύπου Χ, επιβεβαιώνουν την φαινοτυπική τροποποίηση των χονδροκυττάρων κατά την ΟΑ [75, 76].

Η φλεγμονή αποτελεί μια από τις αιτίες που ίσως να συμμετέχει στην δυσλειτουργία των χονδροκυττάρων και στη διαταραχή μεταξύ των αναβολικών και καταβολικών δραστηριοτήτων που πραγματοποιούνται με σκοπό την αναδιοργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου [77-79]. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα χονδροκύτταρα μπορούν να παράγουν ή να αντιδρούν σε κυτταροκίνες και χημοκίνες που βρίσκονται στους ιστούς και στα υγρά των αρθρώσεων που έχουν προσβληθεί από ΟΑ [78, 80]. Στα υγρά των προσβεβλημένων αρθρώσεων έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία υψηλών επιπέδων καταβολικών ενζύμων και φλεγμονωδών μεσαζόντων όπως, IL-1β, TNF-α, προσταγλανδίνες και οξείδια του αζώτου [77-79]. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην έναρξη της παραγωγής των παραπάνω μορίων δεν είναι ακόμη ξεκάθαροι αν και το οξειδωτικό στρες φαίνεται να τα επάγει. Οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα εκφράζουν IL-1β και τον υποδοχέα της, σε τέτοιες συγκεντρώσεις που την καθιστά ικανή να επάγει την έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), αγγρεκενασών και άλλων καταβολικών ενζύμων [81, 82].

Εκτός από την επαγωγή της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών και των άλλων πρωτεϊνών, η IL-1β και ο TNF-α αυξάνουν τη σύνθεση της προσταγλανδίνης E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) και την παραγωγή των οξειδίων του αζώτου επάγοντας τη δράση του ενζύμου που είναι

υπεύθυνο για την παραγωγή τους (i NOS ή NOS2). Η IL-1β επιπλέον, προωθεί την παραγωγή και άλλων προφλεγμονώδων κυτταροκινών όπως της IL-6, του ανασταλτικού παράγοντα λευχαιμίας (LIF), της IL-17 και της IL-18, καθώς επίσης και χημοκινών (IL-8), καταστέλλοντας μ' αυτόν τον τρόπο την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον διαφοροποιημένο φαινότυπο των χονδροκυττάρων, όπως του κολλαγόνου τύπου II [83, 84].

Ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά της παθοφυσιολογίας του ΟΑ χόνδρου είναι η αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας. Ο καταβολισμός του χόνδρου ρυθμίζεται από τις MMPs και τους αναστολείς τους (TIMPs). Η παραγωγή και λειτουργία των παραπάνω μορίων βρίσκεται κάτω από δράση κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων, προσταγλανδινών αλλά και προϊόντων αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας [80, 85-88]. Οι MMPs είναι ενδοπεπτιδάσες που εξαρτώνται από ψευδάργυρο και ασβέστιο και ο ρόλος τους είναι να διασπούν πρωτεϊνικά συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, όπως κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες αλλά και να μετατρέπουν πρόδρομες ανενεργές μορφές MMPs σε δραστικά μόρια. Σε φυσιολογικές καταστάσεις, οι MMPs και οι αναστολείς τους παράγονται από τα χονδροκύτταρα, με τη δράση των TIMPs είναι πιο ενισχυμένη από αυτή των MMPs, συμμετέχοντας στην ομοιοστασία του χόνδρου. Αντίθετα, στον ΟΑ χόνδρο, η ισορροπία μεταξύ MMPs-TIMPs διαταράσσεται, η δράση των MMPs ενισχύεται και επέρχεται ο εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου [57, 89, 90]. Οι κολλαγενάσες MMP-1, MMP-8, MMP-13 και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της πλασματικής μεμβράνης (MT-MMPs) αποδομούν ενδιάμεσα μόρια κολλαγόνου τύπου I, II και III. Οι στρομελυσίνες MMP-3, MMP-11 μπορούν να διασπάσουν μόρια κολλαγόνου της βασικής μεμβράνης, πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες, ενώ οι ζελατινάσες, MMP-2 και MMP-9 αποδομούν μόρια κολλαγόνου τύπου IV, V, VII και XI

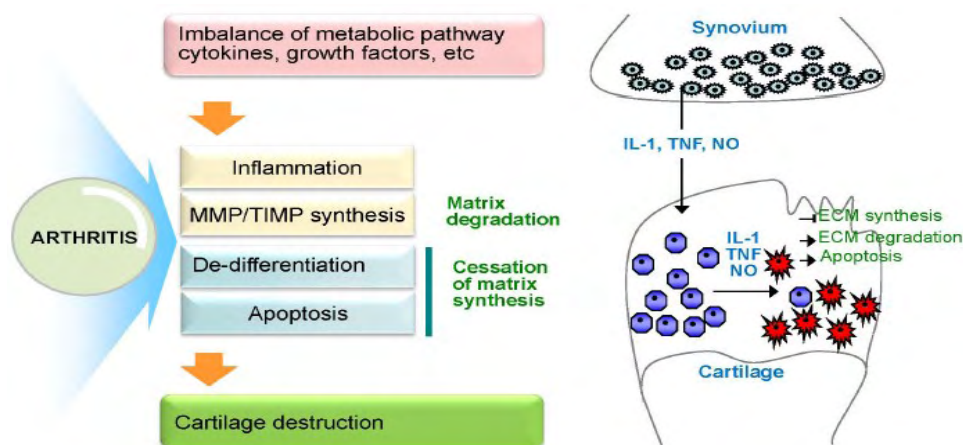
και δρουν πάντα σε συνεργασία με τις κολλαγενάσες [57, 89] . Η MMP-13 θεωρείται το βασικότερο καταβολικό ένζυμο που συμβάλλει στην εξέλιξη της ΟΑ γιατί αποδομεί το κολλαγόνου τύπου II δέκα φορές περισσότερο από τις άλλες κολλαγενάσες, ενώ επιπλέον διασπά την αγγρεκάνη, εμφανίζοντας διπλό ρόλο στην καταστροφή της εξωκυττάριας ουσίας του ΟΑ χόνδρου [58, 91, 92].

Εκτός από τις MMPs μια άλλη κατηγορία καταβολικών ενζύμων οι αγγρεκινάσες (ADAMTSs) παίζουν καταλυτικό ρόλο στον εκφυλισμό του χόνδρου κυρίως κατά τα πρώτα στάδια της ΟΑ. Οι ADAMTSs είναι οι βασικές πωτεϊνάσες του αρθρικού χόνδρου που διασπούν την κύρια πρωτεογλυκάνη της εξωκυττάριας ουσίας, την αγγρεκάνη [93, 94]. Στον αρθρικό χόνδρο έχουν απομονωθεί δύο αγγρεκινάσες, η ADAMTS-4 και 5 που συμμετέχουν στην αποδόμηση του χόνδρου στα αρχικά στάδια της ΟΑ και η δράση τους σχετίζεται άμεσα με την εξέλιξη της νόσου [94-98]. Η αυξημένη δράση των παραπάνω μορίων σχετίζεται άμεσα με το φλεγμονώδες περιβάλλον που επικρατεί στην ΟΑ άρθρωση, καθώς μελέτες έχουν αποδείξει ότι βασικοί φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως IL-1α, IL-1β, TNF-α αλλά και αυξητικοί παράγοντες όπως ο TGF-β επάγουν την έκφραση των ADAMTS-4 και 5 στον ΟΑ χόνδρο [91, 99-102].

Ένας άλλος παράγοντας που συμβάλλει στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου είναι η αποδιαφοροποίηση των χονδροκυττάρων και η απόκτηση ιδιοτήτων που χαρακτηρίζουν τους ινοβλάστες [77]. Τα αποδιαφοροποιημένα χονδροκύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα σύνθεσης των μορίων της εξωκυττάριας ουσίας και συγκεκριμένα του κολλαγόνου τύπου II και της αγγρεκάνης, ενώ αυξάνουν τη σύνθεση του κολλαγόνου τύπου I, III και V [77, 103]. Η διαδικασία της αποδιαφοροποίησης των χονδροκυττάρων κατά την ΟΑ φαίνεται να ρυθμίζεται από προφλεγμονώδεις ( IL-1 και NO) και αυξητικούς παράγοντες (EGF, Wnts, Notch) [104-109].

Τέλος, η εκδήλωση της οστεοαρθρίτιδας σχετίζεται με τη γήρανση και την απόπτωση των χονδροκυττάρων, χαρακτηριστικά που οφείλονται στη δράση οξειδίων του αζώτου και στο οξειδωτικό στρες [110-113]. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα χαρακτηρίζονται από οξειδωτικό στρες που ίσως να ευθύνεται για τη μείωση του μήκους των τελομερών αλλά και για τη μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα την πρόωρη γήρανση των κυττάρων [114, 115]. Επίσης τα οξείδια του αζώτου αποτελούν σημαντικοί μεσάζοντες της απόπτωσης των χονδροκυττάρων. Σε οστεοαρθρικούς χόνδρους παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα οξειδίων του αζώτου, λόγω αύξησης της συνθάσης των οξειδίων του αζώτου, τα οποία καταστέλλουν τη σύνθεση του κολλαγόνου και των πρωτεογλυκανών, ενεργοποιούν τις MMPs, καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και προωθούν τον αποπτωτικό θάνατο [112, 113, 116].

Συνοψίζοντας τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι στην εκδήλωση της οστεοαρθρίτιδας συμμετέχει ένας μεγάλος αριθμός μορίων και μηχανισμών που τροποποιούν τον φυσιολογικό φαινότυπο σε παθολογικό (Εικόνα 7). Η ανακάλυψη και η κατανόηση όλων των μηχανισμών θα βοηθήσει στην ανάπτυξη μεθόδων πρόωρης διάγνωσης αλλά και αποτελεσματικότερων θεραπειών έναντι της ασθένειας.



Εικόνα 7: Μόρια και μοριακοί μηχανισμοί που τροποποιούν τον φυσιολογικό φαινότυπο των χονδροκυττάρων σε οστεοαρθρικό

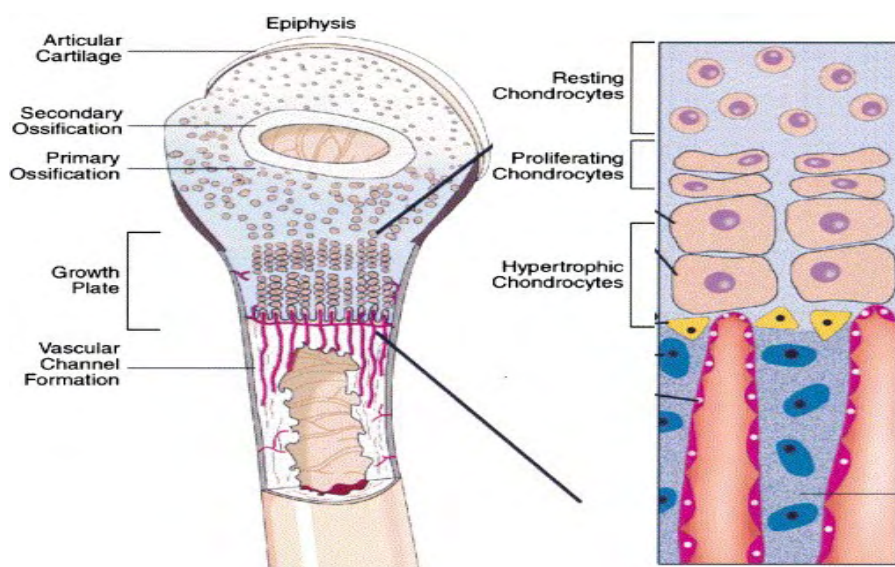
## **A.2 Χονδρογένεση και Ενδοχόνδρια Οστεοποίηση (ΕΟ)**

Η δημιουργία του αρθρικού χόνδρου είναι αποτέλεσμα σταδιακής διαφοροποίησης αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων σε χονδροκύτταρα, μέσω μιας διαδικασίας που συμβαίνει κατά την εμβρυική ανάπτυξη και ονομάζεται χονδρογένεση [117, 118]. Το πρώτο στάδιο της χονδρογένεσης περιλαμβάνει τη στρατολόγηση μεσεγχυματικών κυττάρων σε περιοχές που μελλοντικά θα αποτελέσουν θέσεις της σκελετικής ανάπτυξης. Στη συνέχεια τα μεσεγχυματικά κύτταρα συσσωματώνονται και ξεκινά η σταδιακή διαφοροποίηση τους σε χονδροκύτταρα. Τα διαφοροποιημένα χονδροκύτταρα με τη σειρά τους, ξεκινούν την παραγωγή των ειδικών πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας όπως κολλαγόνο τύπου IIB και αγγρεκάνης, προκειμένου να σχηματιστεί ο χόνδρινος ιστός. Η διαδικασία της χονδρογένεσης εξαρτάται από την μεταγωγή σημάτων που δημιουργούνται εξαιτίας της αλληλεπίδρασης των χονδροκυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία αλλά και των χονδροκυττάρων μεταξύ τους [119].

Τα διαφοροποιημένα χονδροκύτταρα στη συνέχεια μπορούν να ακολουθήσουν δύο διαφορετικές πορείες: α) να παραμείνουν τα χονδροκύτταρα του μόνιμου χόνδρου που καλύπτει τα άκρα των ενήλικων μακρών οστών ή β) να συνεχίσουν την διαδικασία της ωρίμανσής τους μέχρι το στάδιο της υπερτροφίας που τελικά οδηγεί στην ανάπτυξη

και επιμήκυνση των μακρών οστών, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται ΕΟ [120, 121].

Η ΕΟ είναι μια απαραίτητη διαδικασία της εμβρυϊκής ανάπτυξης του σκελετικού συστήματος διότι εκτός από τη δημιουργία των μακρών οστών συμβάλει και στη φυσική επανόρθωση των καταγμάτων. Μέσω της σταδιακής διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας, οι οστεοβλάστες παίρνουν τη θέση των χονδροκυττάρων και το αναπτυσσόμενο οστό τη θέση του χόνδρου [122, 123]. Η αναπτυξιακή πλάκα δομικά οργανώνεται και διαιρείται σε τρεις βασικές ζώνες κυττάρων: τη ζώνη ηρεμίας, τη ζώνη πολλαπλασιασμού και την υπερτροφική ζώνη (Εικόνα 8). Σε κάθε ζώνη τα χονδροκυττάρια παρουσιάζουν διαφορετικό σχήμα, διάταξη, μεταβολική δραστηριότητα και διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας [124].

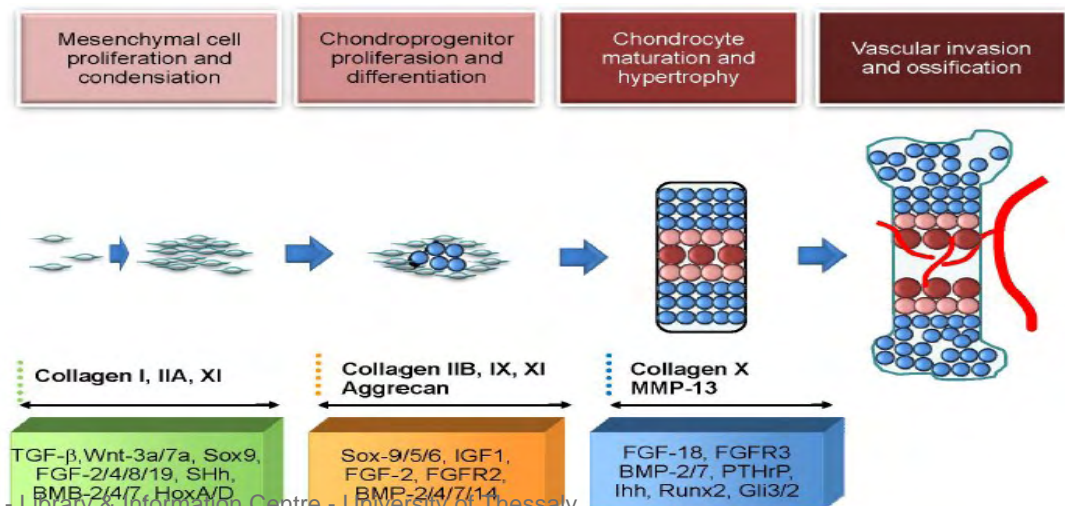


Εικόνα 8: Οι τρεις βασικές ζώνες χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας

Στη ζώνη ηρεμίας τα χονδροκύτταρα (resting chondrocytes) είναι στρογγυλά, μεμονωμένα και χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού. Σε αυτό το στάδιο διαφοροποίησης τα "ήρεμα" χονδροκύτταρα εκφράζουν τα χαρακτηριστικά μόρια της εξωκυττάριας ουσίας, συμπεριλαμβανομένων του κολλαγόνου τύπου II, IX και XI και της βασικής πρωτεογλυκάνης, αγγρεκάνη [119, 125]. Στη δεύτερη ζώνη, τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα διαιρούνται πολλές φορές, αποκτούν επίπεδο σχήμα και οργανώνονται σε στήλες. Τα κύτταρα αυτά, εκτός των μορίων του κολλαγόνου τύπου II, IX και XI και της αγγρεκάνης, εκφράζουν επιπλέον το κολλαγόνου τύπου VI και την matrilin [119, 126]. Τέλος, τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα της αναπτυξιακής πλάκας χαρακτηρίζονται από την έκφραση του κολλαγόνου τύπου X και τη μειωμένη παραγωγή του κολλαγόνου II, IX και XI. Επίσης, τα κύτταρα της υπερτροφικής ζώνης παράγουν το βασικό καταβολικό ένζυμο MMP-13, την αλκαλική φωσφατάση, τον VEGF, την οστεοποντίνη και τον μεταγραφικό παράγοντα Runx2. Το κολλαγόνο τύπου X, η MMP-13 και η αλκαλική φωσφατάση αποτελούν τους βασικούς δείκτες της τελικής φάσης διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά [118]. Στην υπερτροφική ζώνη της αναπτυξιακής πλάκας εισβάλλουν αγγεία αίματος από το υποχόνδριο οστό, με επακόλουθο την απόπτωση της πλειονότητας των υπερτροφικών χονδροκυττάρων και την αντικατάστασή τους από οστό [121]. Γίνεται φανερό πως τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα παίζουν καθοριστικό ρόλο στη συνεργασία χονδρογένεσης-οστεογένεσης, καθώς τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα λειτουργούν ως ικρίωμα για την ανάπτυξη του υποκείμενου οστού.

Η σταδιακή διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων κατά την ΕΟ ελέγχεται από αυτοκρινή σήματα που παράγονται από τα ίδια τα χονδροκύτταρα αλλά και από παρακρινή σήματα που προέρχονται από κύτταρα των άλλων δομών της άρθρωσης

όπως το περιχόνδριο ή τα αιμοφόρα αγγεία του υποχόνδριου οστού [127, 128]. Επίσης, οι αλληλεπιδράσεις των χονδροκυττάρων με τα συστατικά της εξωκυτταρικής ουσίας μέσω των μεμβρανικών τους υποδοχέων πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού και της ωρίμανσης των χονδροκυττάρων. Αυξητικοί παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών (BMPs), των αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών (FGFs), των Wnts, των πεπτιδίων που σχετίζονται με την παραθυρεοειδή ορμόνη (PTHrP) και των πρωτεϊνών Ihh, καταστέλλουν ή προωθούν την διαδικασία της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων ανάλογα με το στάδιο της ΕΟ [122] (Εικόνα 9). Επιπλέον, ορμόνες όπως η αυξητική ορμόνη (GH), οι αυξητικοί παράγοντες της ινσουλίνης (IGFs), η θυρεοειδής ορμόνη, τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των χονδροκυττάρων και κατ' επέκταση την επιμήκυνση των μακρών οστών [118]. Τέλος, η έκφραση των χαρακτηριστικών γονιδίων κάθε σταδίου διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας αλλά και των χονδροκυττάρων του μόνιμου χόνδρου βρίσκεται κάτω από δράση μεταγραφικών παραγόντων. Οι δύο βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες της χονδρογένεσης και κυρίως της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά είναι ο Sox9 και ο Runx2 [129, 130].





*Εικόνα 9:* Μόρια που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση

### **A.3 Οστεοαρθρίτιδα και Ενδοχόνδρια Οστεοποίηση**

Σε φυσιολογικές συνθήκες τα χονδροκύτταρα του μόνιμου αρθρικού χόνδρου παρουσιάζουν χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα [131] και δεν υφίστανται την διαδικασία της ωρίμανσης (υπερτροφικά χονδροκύτταρα) και απόπτωσης, διαδικασίες που συμβαίνουν κατά την σκελετική διαφοροποίηση και ανάπτυξη του εμβρυϊκού χόνδρου. Ωστόσο, σε παθολογικές συνθήκες όπως η οστεοαρθρίτιδα, ο προσβεβλημένος αρθρικός χόνδρος δεν μπορεί να διατηρήσει τα χαρακτηριστικά του μόνιμου χόνδρου καθώς τα χονδροκύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και εισέρχονται στο τελικό στάδιο της διαφοροποίησής τους, δηλαδή γίνονται υπερτροφικά [132-134]. Οι αλλαγές του φαινοτύπου των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων προσομοιάζουν τις αλλαγές που παρατηρούνται κατά την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων της ΕΟ και χαρακτηρίζονται από την αυξημένη έκφραση του κολλαγόνου τύπου Χ [75], χαρακτηριστικού της υπερτροφίας των χονδροκυττάρων, καθώς και άλλων δεικτών διαφοροποίησης όπως της αννεξίνης [135], της αλκαλικής φωσφατάσης [136] και της οστεοκαλσίνης [137]. Επίσης, στα οστεοαρθρικά υπερτροφικά χονδροκύτταρα παρατηρείται αυξημένη έκφραση του VEGF με αποτέλεσμα την εισβολή των αγγείων από υποχόνδριο οστό στον αρθρικό χόνδρο, την

απόπτωση των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων και τη δημιουργία νέων οστικών δομών στον αρθρικό χόνδρο, των οστεοφύτων [138]. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι ο εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου των ενήλικων ατόμων σχετίζεται με διαδικασίες που έχουν κοινή εμβρυολογική προέλευση με αυτές που πραγματοποιούνται κατά τη σκελετική ανάπτυξη.

Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει αποδείξει ότι παράγοντες που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων κατά την ΕΟ παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στον οστεοαρθρικό χόνδρο, συμμετέχοντας στην παθογένεια της νόσου [132-134]. Αυξητικοί (BMPs, FGFs, Wnts και PTHrP) και μεταγραφικοί παράγοντες (Sox9 και ο Runx2) που ρυθμίζουν τον τελικό στάδιο διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητικών μονάδων, αποκαλύπτοντας την συμμετοχή τους στην αλλαγή του φαινοτύπου των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά [133]. Το αποτέλεσμα της αλλαγής του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων του μόνιμου χόνδρου είναι η αυξημένη αποδόμηση των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, διαδικασία που πραγματοποιείται και από τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα της αναπτυξιακής πλάκας προκειμένου να αντικατασταθεί ο ασβεστοποιημένος χόνδρος από το οστό. Οι παραπάνω παρατηρήσεις δείχνουν ότι οι υπερτροφικές αλλαγές των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας είναι αντιστρεπτές, προτείνοντας νέους θεραπευτικούς στόχους για την ΟΑ σε πρώιμα στάδια της νόσου μέσω αναστολής της υπερτροφίας των χονδροκυττάρων και επαναφορά του οστεοαρθρικού φαινοτύπου σε φυσιολογικό [132].

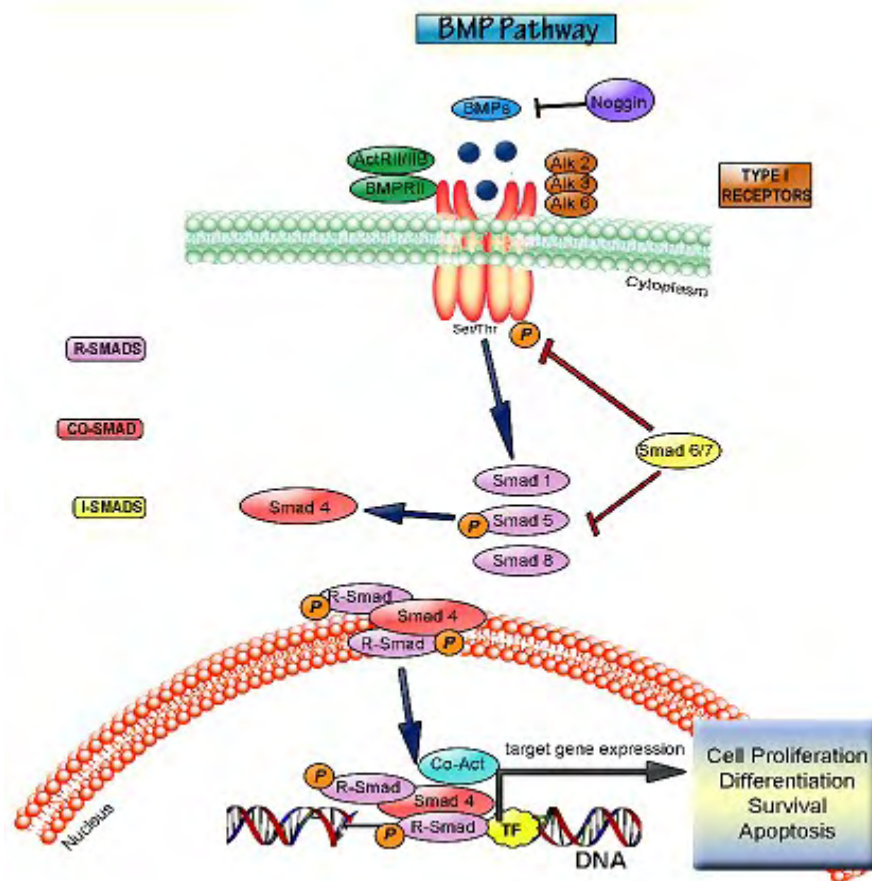
#### **A.4 Μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (BMPs)**

Οι BMPs ανήκουν στην υπερικογένεια των αυξητικών παραγόντων μετασχηματισμού (TGFs) και μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 20 διαφορετικές πρωτεΐνες BMPs που συμμετέχουν στη διαδικασία σχηματισμού του χόνδρου και των οστών. Οι BMPs είναι συντηρητικές πρωτεΐνες, αρχικά παράγονται ως πρόδρομες πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να απαιτείται μετα-μεταφραστική τροποποίηση (πρωτεολυτική αποκοπή αμινοξέων) προκειμένου να αποκτήσουν ενεργή μορφή [139]. Οι BMPs οφείλουν την ονομασία τους στο ρόλο που παίζουν στο σχηματισμό των οστών και θεωρούνται απαραίτητες για τη μεταβίβαση από το χόνδρο στο οστό μέσω της ενδοχόνδριας οστεοποίησης. Επειδή ο χόνδρος αποτελεί τον βασικό ιστό που προσβάλλεται κατά την ΟΑ και τα χονδροκύτταρα παίζουν καταλυτικό ρόλο στην εκδήλωση της νόσου, είναι πιθανόν οι BMPs να συμβάλουν στη διαταραχή του μεταβολισμού του αρθρικού χόνδρου και κατ' επέκταση στην εκδήλωση της νόσου.

Οι BMPs διακρίνονται σε 6 υποκατηγορίες βάσει της ομοιότητας της αμινικής τους αλληλουχίας [140]. Όλες οι BMPs ρυθμίζουν τη λειτουργία των κυττάρων αφού συνδεθούν σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς. Το κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι των BMPs περιλαμβάνει τους υποδοχείς των οστικών μορφογενικών πρωτεϊνών τύπου I και II (BMPRI και II) με δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης καθώς και ενδοκυτταρικά μόρια (Smads πρωτεΐνες) που ενεργοποιούνται μετά τη σύνδεση των BMPs με τους υποδοχείς τους. Αρχικά, οι BMPs συνδέονται με τους υποδοχείς BMPRII οι οποίοι αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν ετεροδιμερή με τους υποδοχείς BMPRI. Στη συνέχεια ο υποδοχέας BMPRI φωσφορυλιώνει τις R-Smad πρωτεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν σύμπλοκο με την Smad-4 πρωτεΐνη, μεταναστεύουν στον πυρήνα και τροποποιούν την έκφραση των γονιδίων-στόχων καθώς δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες [141]. Τρεις υποδοχείς τύπου II έχει αποδεχτεί να συνδέονται με τις BMPs (BMPRII, ActR-II and ActR-IIB) [142]

και τέσσερις υποδοχείς τύπου I (BMPR-IA, BMPR-IB, ALK1 και 2) [143]. Οι υποδοχείς δεν συνδέονται με την ίδια ικανότητα με όλες τις BMPs, ενώ διαφορετικές BMPs χρησιμοποιούν διαφορετικό συνδυασμό υποδοχέων προκειμένου να μεταβιβάσουν το σήμα τους. Οι Smads πρωτεΐνες που αποτελούν το βασικό στόχο φωσφορυλίωσης των BMPRs διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: τις R-Smads (Smad 1/2/3/5/8), τις co-Smad (Smad 4) και τις I-Smad (Smad 6/7). Οι Smad 1//5/8 είναι υπεύθυνες για τη μεταγωγή του σήματος των BMPs, ενώ οι Smad 2 και 3 για τη μεταγωγή του σήματος του TGF-β [144] (Εικόνα 10).

Η ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού των BMPs επιτυγχάνεται με διάφορους ανασταλτικούς μηχανισμούς που δρουν είτε εξωκυττάρια είτε ενδοκυττάρια. Εξωκύτταρια, ειδικοί αναστολείς αλληλεπιδρούν με τις BMPs πρωτεΐνες και αποτρέπουν τη σύνδεση τους με τους υποδοχείς BMPRs [145, 146]. Οι βασικοί εξωκυττάριοι ανταγωνιστές των BMPs είναι η πρωτεΐνη noggin, chordin, chordinlike, follistatin, FSRP, η οικογένεια των πρωτεϊνών DAN/Cerberus και η sclerostin [147]. Ενδοκυτταρικά, η αναστολή του μονοπατιού των BMPs επιτυγχάνεται με τη δράση των Smads αναστολέων, Smad 6 και 7, οι οποίοι ανταγωνίζονται τη σύνδεση των R-Smads με τους υποδοχείς BMPRs, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η φωσφορυλίωση των R-Smads και κατ' επέκταση η ενεργοποίησή τους [144, 148]. Τέλος, η αποδόμηση των ουβικουιτινωμένων πρωτεϊνών μέσω τους πρωτεασώματος αποτελεί έναν επιπλέον τρόπο ρύθμισης της λειτουργίας των Smads. Ο ρυθμιστικός παράγοντας της ουβικουιτίνης Smurf 1 επάγει την ουβικουιτίνωση των Smad 1 και 5 όπως επίσης των υποδοχέων τύπου I των BMPs [149, 150].



Εικόνα 10: Το σηματοδοτικό μονοπάτι των BMPs

#### A.4.1 BMPs – Χονδρογένεση και Ενδοχόνδρια Οστεοποίηση

Οι BMPs έχει αποδεχτεί πως συμμετέχουν σε όλες τις φάσεις της χονδρογένεσης: στη δημιουργία συσσωματώματος των μεσεγχυματικών κυττάρων, στον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων, στην εναπόθεση της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου και στην τελική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας [151, 152]. *In vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν επιβεβαιώσει το ρόλο των BMPs στα αρχικά στάδια της ενδοχόνδριας οστεοποίησης και συγκεκριμένα στο σχηματισμό των συσσωματωμάτων των προγονικών μεσεγχυματικών κυττάρων [153-156]. Οι BMPs επάγουν τη διαφοροποίηση μεσεγχυματικών κυτταρικών σειρών σε χονδροκύτταρα

μέσω ενίσχυσης των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των κυττάρων [154, 155]. Επίσης, σε *in vivo* μελέτες έχει αποδειχθεί πως η καταστολή της δράσης των BMPs μέσω υπερέκφρασης των αναστολέων τους, καταστέλλει ταυτόχρονα το σχηματισμό μεσεγχυματικών συσσωματωμάτων με επακόλουθο την παντελή έλλειψη σχηματισμού του χόνδρου. Αντιθέτως, υπερέκφραση των υποδοχέων των BMPs επιφέρει μη φυσιολογική ανάπτυξη του χόνδρου και επέκταση του σε μύες και μαλακούς ιστούς [153, 156].

Η δράση των BMPs δεν περιορίζεται μόνο στο σχηματισμό των μεσεγχυματικών συσσωματωμάτων αλλά συμμετέχει και στα αρχικά στάδια διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων. Χορήγηση BMPs σε ATDCs κύτταρα (χόνδροσαρκωμα) είχε ως αποτέλεσμα την αλλαγή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των χονδροκυττάρων και αύξηση της σύνθεσης κολλαγόνου τύπου II [157, 158], ενώ υπερέκφραση του ανταγωνιστή noggin μείωσε την ικανότητα σχηματισμού του χόνδρου καθώς περιορίστηκε η παραγωγή του κολλαγόνου τύπου II [159]. Οι ισχυρότερες ενδείξεις για συμμετοχή των BMPs στα αρχικά στάδια διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων παρέχονται από *in vivo* μελέτες οι οποίες έδειξαν πως απαλοιφή των γονιδίων των BMPs σε μοντέλα ζώων οδηγεί στη μη φυσιολογική ανάπτυξη του χόνδρου καθώς αναστέλλεται η διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων σε χονδροκύτταρα [156].

Επιπλέον του ρόλου των BMPs στα αρχικά στάδια της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, σημαντικός είναι και ο ρόλος τους στην τελική φάση διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας [160, 161]. Η οικογένεια των BMPs και των υποδοχέων τους παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων [160]. Η BMP-2, 4 και 5 εκφράζονται στο

περιχόνδριο ενώ ταυτόχρονα προωθούν τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και την παραγωγή μορίων της εξωκυττάριας ουσίας [160, 162]. Η BMP-7 εκφράζεται τόσο στο περιχόνδριο όσο και στα πολλαπλασιαζόμενα χονδροκύτταρα, ενώ *in vivo* μελέτες έχουν δείξει πως η BMP-2 και 7 ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και την έκφραση του κολλαγόνου τύπου II [163, 164]. Όσον αφορά τους υποδοχείς των BMPs, ο BMPR-IA εκφράζεται στα προ-υπερτροφικά και υπερτροφικά χονδροκύτταρα ενώ ο BMPR-IB εκφράζεται σε όλα τα στάδια διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας [165]. Ο BMPR-IA ρυθμίζει την είσοδο των χονδροκυττάρων στο στάδιο της υπερτροφίας σε συνεργασία με τους υποδοχείς BMPR-II. Οι BMPs εκτός του κολλαγόνου τύπου II ρυθμίζουν και την έκφραση του κολλαγόνου τύπου X, προωθώντας την τελική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας [158, 159]. Σε *in vivo* πειράματα, αύξηση της δράσης του ανταγωνιστή των BMPs, noggin, οδηγεί σε μείωση της παραγωγής του κολλαγόνου τύπου X που εκφράζεται αποκλειστικά από τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα, ενώ παράλληλα τα ζώα παρουσίαζαν μικρότερη αναπτυξιακή πλάκα και μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων [166, 167].

Οι BMPs δεν συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων μόνο μέσω της ρύθμισης της έκφρασης χαρακτηριστικών συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, αλλά προωθούν την ΕΟ ρυθμίζοντας της έκφραση μεταγραφικών παραγόντων της χονδρογένεσης όπως του SOX-9 [168, 169]. Η BMP-2 επάγει την έκφραση του SOX-9 σε ζώα με οστικά κατάγματα παρέχοντας ενδείξεις πως η BMP-2 προωθεί την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων μέσω ενός μηχανισμού που συμμετέχει ο SOX-9 [170]. Επίσης, οι BMPs δεν αυξάνουν μόνο την έκφραση του SOX-9 αλλά και την ικανότητα σύνδεση του στα γονίδια στόχους, ενισχύοντας την έκφραση τους [168, 171].

Οι μεταγραφικοί παράγοντες Smads μέσω των οποίων ασκούν τη δράση τους η BMPs έχει αποδεχτεί επίσης πως παίζουν καταλυτικό ρόλο στην ανάπτυξη των οστών μέσω της ενδοχόνδριας οστεοποίησης. Απαλοιφή των γονιδίων Smad 1, 5 και 8 ξεχωριστά, είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία βιώσιμων ποντικών, ενώ ζώα τα οποία είχαν υποστεί απαλοιφή και των τριών γονιδίων παρουσίαζαν χονδροδυσπλασίες [172]. Επίσης, οι Smads πρωτεΐνες συμμετέχουν στην τελική διαφοροποίηση των υπερτροφικών χονδροκυττάρων, καθώς αλληλεπιδρούν με τον Runx-2, βασικό μεταγραφικό παράγοντα των υπερτροφικών χονδροκυττάρων [172-174].

#### **A.4.2 BMPs και Οστεοαρθρίτιδα**

Οι αλλαγές του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων του μόνιμου χόνδρου και της αναδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της ΟΑ. Στις παραπάνω διαδικασίες συμμετέχουν οι BMPs και παρόλο που θεωρούνται αναβολικοί παράγοντες προστατεύοντας τον αρθρικό χόνδρο, παράλληλα προωθούν τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων στο τελικό στάδιο διαφοροποίησης σε υπερτροφικά και την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας, συμβάλλοντας στην παθογένεια της νόσου [151].

Μια σειρά μελετών έχει δείξει την παρουσία των BMP- 2, 4-6, 11 και του GDF-α τόσο στον φυσιολογικό όσο και στον ΟΑ χόνδρο [175-177]. Ωστόσο, άλλες μελέτες αναφέρουν αυξημένη έκφραση της BMP-2 στον φυσιολογικό χόνδρο, ενώ στον ΟΑ χόνδρο φαίνεται να ανιχνεύεται σε συσσωματώματα χονδροκυττάρων αλλά και σε μεμονωμένα χονδροκύτταρα [178, 179]. Σε χονδροκύτταρα αρθρικού χόνδρου παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της BMP-2 μετά από χορήγηση φλεγμονωδών παραγόντων, όπως TNF-α και IL-1b καθώς και σε δείγματα χόνδρου που ελήφθησαν



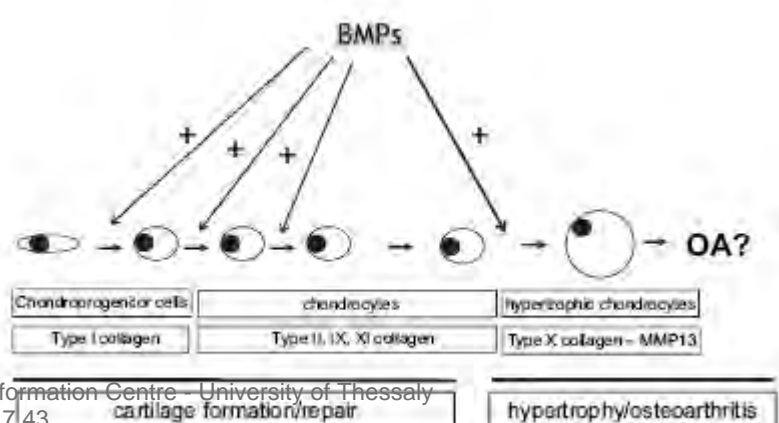
από ασθενείς μετά από τραυματισμό [179, 180]. Επίσης, στον ΟΑ χόνδρο έχει παρατηρηθεί έκφραση των ανταγωνιστών της δράσης του σηματοδοτικού μονοπατιού των BMPs, όπως της gremlin, chordin και follistatin [175]. Οι παραπάνω ανταγωνιστές παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης μεταξύ φυσιολογικού και ΟΑ χόνδρου, καθώς παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα αυτών σε χόνδρο ασθενών με προχωρημένη ΟΑ [181, 182]. Τέλος, οι ενδοκυτταριοί αναστολείς Smad 6 και 7 εκφράζονται τόσο στο φυσιολογικό όσο και στον ΟΑ χόνδρο χωρίς όμως να παρατηρείται διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των ιστών [183]. Γίνεται φανερό πως η μεταβολή της ισορροπίας μεταξύ BMPs και των αναστολέων τους μπορεί να διαταράξει τη φυσιολογική αναδόμηση του χόνδρου και να ενεργοποιήσει διαδικασίες διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων που παρατηρούνται φυσιολογικά μόνο κατά την ΕΟ.

Μέχρι σήμερα πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει τον σημαντικό ρόλο των τοπικά παραγόμενων BMPs στην προστασία του χόνδρου και στην ενεργοποίηση των διαδικασιών της αναδόμησης του μετά από φλεγμονή, τραυματισμό ή στον ΟΑ χόνδρο [151, 177, 184]. Σε μοντέλα ζώων τα οποία εμφάνισαν αρθρίτιδα μετά από τραυματισμό, παρατηρήθηκε αυξημένη καταστροφή του χόνδρου μετά από υπερέκφραση του αναστολέα των BMPs, noggin, και αναστροφή της αποδόμησης του χόνδρου μετά από αναστολή της δράσης του [185]. Επίσης, η μειωμένη δράση των BMPs στον αρθρικό χόνδρο επιφέρει μείωση της σύνθεσης των πρωτεογλυκανών της εξωκυττάριας ουσίας, επιβεβαιώνοντας την προστατευτική δράση των BMPs στον αρθρικό χόνδρο μετά από τραυματισμό [186].

Ωστόσο, παρόλη την αναβολική δράση των BMPs στον μεταβολισμό του αρθρικού χόνδρου μέσω επαγωγής της έκφρασης του κολλαγόνου τύπου II και της

αγγρεκάνης, οι BMPs συμβάλλουν στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου καθώς συμμετέχουν στην αλλαγή του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων. Τα αυξημένα προϊόντα που παράγονται από την αποδόμηση της εξωκυτταρικής ουσίας επάγουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, όπως αυξητικών και μεταγραφικών παραγόντων [187]. Ένα τέτοιο μόριο είναι η BMP-2 που υπερεκφράζεται στην OA άρθρωση ποντικών ενισχύοντας την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών όπως της MMP-13, η οποία αποτελεί δείκτη τελικής διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων [186]. Το αποτέλεσμα της επίδρασης των BMPs στην έκφραση της MMP-13 δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητό καθώς η BMP-2 αυξάνει την έκφραση της σε χονδροκύτταρα ποντικών και σε κύτταρα χονδροσαρκώματος [188, 189], ενώ η BMP-7 δεν έχει καμιά επίδραση στην έκφραση της MMP-13 σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα ανθρώπου [190].

Συμπερασματικά, τα αυξημένα επίπεδα των BMPs που παρατηρούνται στον κατεστραμμένο χόνδρο συμβάλουν στην αναδόμηση του ιστού επάγοντας τη σύνθεση συστατικών της εξωκυτταρικής ουσίας. Από την άλλη πλευρά μπορούν να ενεργοποιήσουν την αποδόμηση του χόνδρου μέσω αλλαγής της συμπεριφοράς και του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων και την παραγωγή της MMP-13 (Εικόνα 11). Ωστόσο, νέες μελέτες απαιτούνται για να εξακριβωθεί ο ρόλος των BMPs τόσο στην εξέλιξη της OA όσο και στην προστασία έναντι αυτής, ώστε μια πιθανή αναστολή ή ενίσχυση της δράσης τους αντίστοιχα, να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο για την OA.



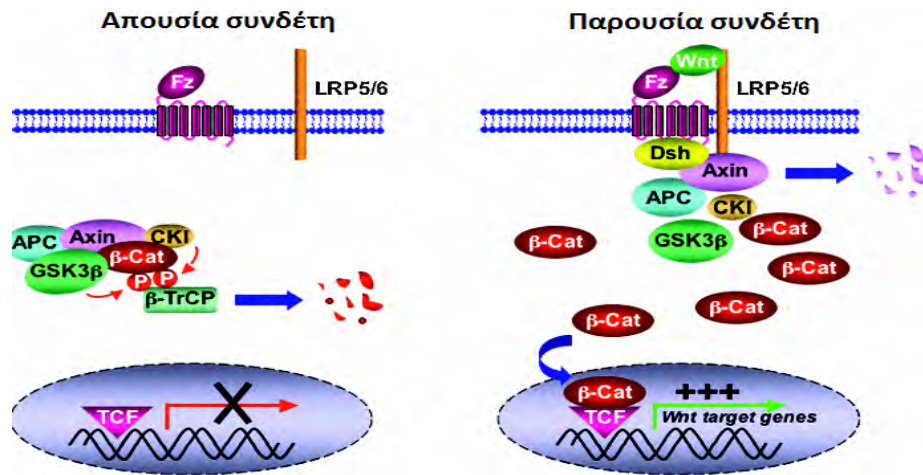
*Εικόνα 11: Ο διπλός ρόλος των BMPs στην οστεοαρθρίτιδα*

### **A.5 Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη**

Η οικογένεια των Wnt πρωτεϊνών, περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό εκκριτικών, πλούσιων σε κυστεΐνη γλυκοπρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών όπως κυτταρική διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμός και απόπτωση των κυττάρων [191]. Η σηματοδότηση του Wnt μονοπατιού πραγματοποιείται μέσω τριών διαφορετικών μονοπατιών: ενός κανονικού μονοπατιού (μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης) και δύο μη κανονικών μονοπατιών (μονοπάτι Wnt/ασβεστίου, μονοπάτι Wnt/πολικότητας) [192]. Η ενεργοποίηση του κανονικού μονοπατιού απαιτεί τη σύνδεση των Wnt πρωτεϊνών με ένα σύμπλοκο μεμβρανικών υποδοχέων που αποτελείται από έναν Frizzled υποδοχέα και από τον LRP5/6 συνυποδοχέα [193]. Αντιθέτως, η ενεργοποίηση των μη κανονικών μονοπατιών απαιτεί τη σύνδεση των σηματοδοτικών μορίων Wnt μόνο με έναν Frizzled υποδοχέα [194]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι που θα ενεργοποιηθεί κάθε φορά εξαρτάται από τον συνδυασμό των Wnt πρωτεϊνών, των Frizzled υποδοχέων, των συνυποδοχέων LRPs και τον τύπο του κυττάρου που θα δράσει.

Το Wnt μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει η β-κατενίνη, έχει μελετηθεί περισσότερο σε σχέση με τα άλλα δύο μονοπάτια, καθώς συμμετέχει στον μεταβολισμό

του χόνδρου και των οστών. Απουσία του Wnt συνδέτη, η β-κατενίνη συνδέεται σε ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών που αποτελείται από τις πρωτεΐνες APC ( adenomatous polyposis coli) και AXIN. Η σύνδεση αυτή προκαλεί την ενεργοποίηση των κινασών GSK3 (glycogen synthase kinase 3) και CK1 (casein kinase 1) που φωσφορυλιώνουν την β-κατενίνη σε μία σειρά διατηρημένων καταλοίπων σερίνης / θρεονίνης κοντά στο αμινικό της άκρο. Η φωσφορυλιωμένη β-κατενίνη αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη β-TrCP, συστατικό του συμπλέγματος ουβικουιτίνης λιγάσης E<sub>3</sub>, με αποτέλεσμα η β-κατενίνη να ουβικουιτιώνεται και να αποδομείται από το πρωτεόσωμα [192, 195, 196]. Αντίθετα, η ενεργοποίηση του μονοπατιού επιτυγχάνεται μετά τη σύνδεση μιας Wnt πρωτεΐνης με το σύμπλεγμα των υποδοχέων Frizzled-LRP5/6. Αρχικά, ενεργοποιείται η πρωτεΐνη Dsh (Dishevelled) και στρατολογεί το σύμπλοκο αποδόμησης στην πλασματική μεμβράνη, ενώ η AXIN αλληλεπιδρά άμεσα με την κυτταροπλασματική ουρά του LRP5/6. Η μείωση της αποδόμησης της β-κατενίνης μετά την ενεργοποίηση του μονοπατιού πραγματοποιείται με δύο τρόπους: α) η AXIN αποδομείται με αποτέλεσμα να απενεργοποιείται το σύμπλοκο αποδόμησης και β) η Dsh καταστέλλει την κινάση GSK3 και έτσι αποτρέπεται η φωσφορυλίωση της β-κατενίνης. Η μη φωσφορυλιωμένη β-κατενίνη μεταπηδά στον πυρήνα, αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας TCFs/LEFs πρωτεϊνών και ενεργοποιείται η μεταγραφή των γονιδίων στόχων όπως του c-Jun και της Axin [192, 195, 196] (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Το σηματοδοτικό μονοπάτι της β-κατενίνης απουσία και παρουσία συνδέτη

Η ρύθμιση του Wnt μονοπατιού επιτυγχάνεται με τη δράση ενός μεγάλου αριθμού εξωκυττάρων ουσιών. Οι sFRPs (secreted frizzled-related protein) και οι WIFs (Wnt inhibitory factors) είναι πρωτεΐνες που συνδέονται με τους Frizzled υποδοχείς και με τις πρωτεΐνες Wnt αντίστοιχα, με αποτέλεσμα την καταστολή όλων των μονοπατιών που επάγονται από τις Wnt πρωτεΐνες [197]. Αντιθέτως, οι Dkk πρωτεΐνες, η σκληροστίνη και η Wise πρωτεΐνη συνδέονται μόνο με τον LRP5/6 καταστέλλοντας το Wnt μονοπάτι όπου συμμετέχει η β-κατενίνη [198]. Οι Dkks πρωτεΐνες για να μπορέσουν να επιτύχουν την καταστολή του μονοπατιού χρειάζονται την παρουσία ενός άλλου μεμβρανικού υποδοχέα (Kremen). Η Dkk πρωτεΐνη συνδέεται τόσο με την Kremen πρωτεΐνη όσο και με τον υποδοχέα LRP5/6, με αποτέλεσμα το σύμπλοκο που δημιουργείται να εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου και να καταστρέφεται. Μ' αυτόν τον τρόπο ρυθμίζεται η παρουσία του LRP5/6 στην πλασματική μεμβράνη και κατ' επέκταση η δράση του μονοπατιού [199].

### A.5.1 Wnt/ $\beta$ -κατενίνη και Ενδοχόνδρια Οστεοποίηση

Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός *in vivo* και *in vitro* μελετών έχει επιβεβαιώσει τον ρόλο των Wnt σηματοδοτικών μονοπατιών στη ρύθμιση της χονδρογένεσης και της ανάπτυξης του χόνδρου και των οστών μέσω της ενδοχόνδριας οστεοποίησης [200-203]. Οι Wnts πρωτεΐνες και κυρίως μέσω του κανονικού μονοπατιού έχουν διπλό ρόλο κατά τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων: καταστέλλουν τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε χονδροκύτταρα, ενώ στα τελικά στάδια διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας, το σηματοδοτικό μονοπάτι της  $\beta$ -κατενίνης είναι απαραίτητο για την τελική διαφοροποίησή τους σε υπερτροφικά [204-206].

Όσον αφορά τον ρόλο των Wnt σηματοδοτικών μονοπατιών στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων, μελέτες απέδειξαν ότι διαφορετικές Wnts πρωτεΐνες μπορούν να ρυθμίζουν θετικά ή αρνητικά την διαδικασία της έναρξης των χονδρογένεσης, επιβεβαιώνοντας την πολυπλοκότητα της ρύθμισης του σχηματισμού του αρθρικού χόνδρου. Η Wnt-4 και ο Fzd-7 καταστέλλουν το σχηματισμό των μεσεγχυματικών συσσωματωμάτων, ενώ η Wnt-1, 7 και 14 σταματούν τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε χονδροκύτταρα, μετά τον σχηματισμό των συσσωματωμάτων στις πρωτογενείς θέσεις έναρξης της οστεοποίησης [200, 207]. Επίσης, η Wnt-3a αναστέλλει τη διαδικασία της χονδρογένεσης μέσω ενός μηχανισμού που συμμετέχει η  $\beta$ -κατενίνη, παρόλο που δεν έχει αποδεχθεί εάν η ανασταλτική δράση της Wnt-3a στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων απαιτεί τη μεταγραφική δραστηριότητα της  $\beta$ -κατενίνης [208]. Μελέτες σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων έχουν δείξει, πως η Wnt-3a πρωτεΐνη ή η συσσώρευση της  $\beta$ -κατενίνης μπλοκάρουν τη χονδρογένεση μέσω ενίσχυσης των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων που

επιτυγχάνονται με τη β-κατενίνη και όχι μέσω της μεταγραφικής δραστηριότητας της [209, 210]. Αντίθετα, ενεργοποίηση του Wnt/β-κατενίνη σηματοδοτικού μονοπατιού μέσω αύξησης της ενεργότητας των μεταγραφικών παραγόντων LEFs, προωθεί την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων με τη βοήθεια ενός μηχανισμού ο οποίος εξαρτάται από τον Sox-9 [204]. Παρόλο την ανασταλτική δράση του κανονικού μονοπατιού στα αρχικά στάδια της χονδρογένεσης, τα άλλα δύο σηματοδοτικά μονοπάτια των Wnts φαίνεται να έχουν αντίθετη δράση. Οι Wnt-5a και 5b που δρουν στα μη κανονικά μονοπάτια προωθούν τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε *in vitro* πειράματα, ενισχύοντας τον σχηματισμό του χόνδρου μέσω του πολλαπλασιασμού και της σταδιακής διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων [201, 211].

Βιβλιογραφικά δεδομένα των τελευταίων ετών επιβεβαιώνουν τον βασικό ρόλο του Wnt/β-κατενίνης σηματοδοτικού μονοπατιού στο τελικό στάδιο διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά. Μόλις το 2012 μια ερευνητική ομάδα απέδειξε ότι η δράση της β-κατενίνης ρυθμίζει την ωρίμανση των χονδροκυττάρων, τη δημιουργία των πρωτογενών και δευτερογενών κέντρων οστεοποίησης και τον σχηματισμό του περιχόνδριου οστού κατά την σκελετική ανάπτυξη [212]. Επιπλέον, η β-κατενίνη επάγει την έκφραση των MMPs κατά το σχηματισμό των πρωτογενών και δευτερογενών κέντρων οστεοποίησης προκειμένου να ξεκινήσει η απορρόφηση της εξωκυτταρικής ουσίας και η αγγείωση της περιοχής με φυσικό επακόλουθο την ανάπτυξη των μακρών οστών [212]. Ο Tamamura και οι συν. σε μια *in vivo* μελέτη έδειξαν πως η ενεργή μορφή της β-κατενίνης αυξάνει την έκφραση δεικτών των υπερτροφικών κυττάρων, όπως την MMP-13, το κολλαγόνου τύπου X και τον VEGF, προωθώντας την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά [213]. Αντίθετα, μείωση της δράσης του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης

καθυστερεί την ωρίμανση των χονδροκυττάρων και την ανάπτυξη των οστών μέσω της ενδοχόνδριας οστεοποίησης [206].

Επίσης, μελέτες έχουν δείξει πως η αύξηση της έκφρασης Wnts πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι της β-κατενίνης ενισχύουν τη διαδικασία διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας μέσω αύξησης της έκφρασης του κολλαγόνου τύπου X και του βασικού μεταγραφικού παράγοντα της υπερτροφίας, Runx-2 [201, 214, 215]. Αντίθετα, τα μη κανονικά μονοπάτια των Wnts έχουν ανασταλτική δράση στη διαδικασία της ωρίμανσης των χονδροκυττάρων, καθώς οι Wnt-5a και 5b όπως και οι υποδοχείς Fzd-1 και 7 αναστέλλουν την υπερτροφική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες [201, 211, 216, 217].

#### **A.5.2 Wnt/β-κατενίνη και Οστεοαρθρίτιδα**

Το σηματοδοτικό μονοπάτι της β-κατενίνης αποτελεί βασικό ρυθμιστή της σκελετικής ανάπτυξης και της ομοιόστασης της οστικής μάζας των ενήλικων ατόμων μέσω της επαγωγής της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας [200, 201]. Τις τελευταίες δεκαετίες μια σειρά ερευνητικών μελετών έχουν αποδείξει πως η απορύθμιση της σωστής λειτουργίας του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης μπορεί να συμβάλλει στην αποδόμηση του χόνδρου που παρατηρείται στις εκφυλιστικές ασθένειες, καθώς διαταράσσει την ισορροπία μεταξύ των διαδικασιών σύνθεσης και αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας, ενώ παράλληλα συμμετέχει στην αλλαγή του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων και στην απόπτωση τους [207, 218-221].

Οι πρώτες ενδείξεις για συμμετοχή του μονοπατιού της β-κατενίνης στην παθογένεια της νόσου προέρχονται από μελέτες έκφρασης οι οποίες έδειξαν πως μόρια



που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι της Wnt/ $\beta$ -κατενίνης παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης μεταξύ φυσιολογικού και ΟΑ χόνδρου. Η Wnt-7a βρέθηκε αυξημένη στον ΟΑ χόνδρο [222], ενώ τα επίπεδα έκφρασης της Wnt-16 πρωτεΐνης αυξάνονται σε περιοχές της ίδιας άρθρωσης που παρουσιάζουν μεγαλύτερο βαθμό αλλοίωσης [223]. Η πρωτεΐνη FrzB-2 που ανήκει στην οικογένεια των ανταγωνιστών των Wnts, sFRPs, εκφράζεται στην ΟΑ άρθρωση και κυρίως σε περιοχές με μεγάλη αποδόμηση του χόνδρου, ενώ παράλληλα εμπλέκεται στην απόπτωση των χονδροκυττάρων [224]. Επιπρόσθετα, στον οστεοαρθρικό χόνδρο έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα της  $\beta$ -κατενίνης, ικανά να επιφέρουν τροποποίηση του φυσιολογικού φαινοτύπου των χονδροκυττάρων, ενεργοποιώντας την καταβολική τους δράση, με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών (MMP9 και MMP13), αλλά και διαφόρων άλλων δεικτών υπερτροφίας όπως κολλαγόνο τύπου X, οστεοκαλσίνη κ.α., διαδικασίες οι οποίες συντελούν τόσο στον σχηματισμό οστεοφύτων όσο και στην αποδόμηση του χόνδρου [223, 225]. Τα τελευταία χρόνια μελέτες ανάλυσης σύνδεσης που πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς με ΟΑ αποκάλυψαν σύνδεση της χρωμοσωμικής περιοχής 11q και συγκεκριμένα της περιοχής 11q13.4-q14.3 με ΟΑ ισχίου σε θήλεα άτομα, περιοχή στην οποία εντοπίζεται το γονίδιο του LRP-5 [17, 226], το προϊόν του οποίου δρα ως συνυποδοχέας του μονοπατιού της  $\beta$ -κατενίνης. Επίσης, μελέτες συσχέτισης αποκάλυψαν έναν απλότυπο του γονιδίου LRP-5 να σχετίζεται με ΟΑ γόνατος [227]. Στο γονίδιο του LRP-5 έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις που σχετίζονται με ασθένειες οι οποίες χαρακτηρίζονται από μη φυσιολογική σύνθεση οστικής μάζας [228]. Δεδομένου ότι τα άτομα που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα εμφανίζουν νέες οστικές δομές κυρίως στις αρθρώσεις του ισχίου και του γόνατος, πιθανολογείται η εμπλοκή του γονιδίου LRP-5 στην παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας.

Γενετικές μελέτες απέδειξαν συσχέτιση ενός πολυμορφισμού (Arg324Gly) που εντοπίζεται στο *FRZB* γονίδιο με ΟΑ ισχίου σε γυναίκες [229]. Το προϊόν του γονιδίου δρα ως ανταγωνιστής της δράσης του σηματοδοτικού μονοπατιού της Wnt/ $\beta$ -κατενίνης καταστέλλοντας τη δράση του. Ο λειτουργικός πολυμορφισμός που σχετίστηκε με την ΟΑ μειώνει την ανταγωνιστική δράση του *FRZB* με αποτέλεσμα την εκτεταμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού της  $\beta$ -κατενίνης σε γυναίκες ασθενείς με ΟΑ ισχίου [229]. Η παρατεταμένη ενεργοποίηση της  $\beta$ -κατενίνης οδηγεί στην αύξηση της οστικής μάζας, η οποία μπορεί να σχετίζεται με τον σχηματισμό νέων οστικών δομών, των οστεοφύτων που παρατηρούνται στην ΟΑ άρθρωση [229, 230]. Επίσης, ένας απλότυπος του *FRZB* γονιδίου που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία παρουσιάζει αλλαγές σε δύο κατάλοιπα αργινίνης αποτελεί ισχυρό παράγοντα επικινδυνότητας για πρωτογενή ΟΑ ισχίου [229]. Εκτός από τον ανταγωνιστή *FRZB*, ένας άλλος ανταγωνιστής του μονοπατιού της  $\beta$ -κατενίνης, η *Dkk-1* βρέθηκε ότι παρουσιάζει διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης στον ορό ασθενών με ΟΑ και φυσιολογικών ατόμων. Τα αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης *Dkk-1* που παρατηρήθηκαν στον ορό γυναικών με ΟΑ ισχίου συσχετίστηκαν με μειωμένο κίνδυνο στένωσης του μεσάρθριου διαστήματος που αποτελεί ένδειξη μείωσης της επιφάνειας του αρθρικού χόνδρου και εξέλιξης της νόσου [231].

Οι πιο ισχυρές ενδείξεις για την συμμετοχή του μονοπατιού της Wnt/ $\beta$ -κατενίνης παρέχονται από *in vivo* μελέτες σε μοντέλα ζώων. Ποντίκια τα οποία υπέστησαν απαλοιφή του γονιδίου *frzb* γεννήθηκαν φαινοτυπικά φυσιολογικά, αλλά παρουσίασαν σε μικρή ηλικία εκφυλισμό του χόνδρου σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα ελέγχου. Η καταστροφή του χόνδρου και η μείωση των πρωτεογλυκανών συσχετίστηκε με τα αυξημένα επίπεδα της  $\beta$ -κατενίνης αλλά και των μεταλλοπρωτεϊνών, προτείνοντας τη

συμμετοχή του FRZB στη ρύθμιση των επιπέδων της ενεργής μορφής της β-κατενίνης στον αρθρικό χόνδρο και του ρόλου της στην διαταραχή της ισορροπίας της αναδόμησης του χόνδρου κατά την OA [232]. Επίσης σε STR/ort ποντίκια, τα οποία εμφανίζουν αλλοιώσεις χόνδρου παρόμοιες με αυτές που συναντώνται στην OA γόνατος, παρατηρήθηκε μείωση του αναστολέα *sfrp1* και αύξηση της δράσης του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης με αποτέλεσμα την πρόωρη ωρίμανση των χονδροκυττάρων και την απόπτωσης τους [233]. Ο Yuasa και οι συν. ενίσχυσαν την άποψη για τη συμμετοχή της β-κατενίνης στην παθογένεια της OA, καθώς σε ζώα προχωρημένης ηλικίας με OA γόνατος παρατηρήθηκαν υψηλότερα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-κατενίνης όχι μόνο στο κυτταρόπλασμα αλλά και στον πυρήνα των χονδροκυττάρων σε σχέση με ζώα μικρότερης ηλικίας. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν πως η β-κατενίνη αποτελεί ισχυρό ενεργοποιητή της καταβολικής δράσης των χονδροκυττάρων, αποτελώντας μέρος των μηχανισμών που συμμετέχουν στην εκτεταμένη αναδόμηση και αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου που παρατηρείται στις εκφυλιστικές παθήσεις της άρθρωσης [225]. Τέλος, ποντίκια στα οποία είχε ενεργοποιηθεί το γονίδιο της β-κατενίνης (β-catenin cAct mice ) παρουσίασαν OA η οποία συσχετίστηκε με την εκτεταμένη δράση του μονοπατιού καθώς παρατηρήθηκε καταστροφή του χόνδρου και δημιουργία οστεοφύτων σε γενετικά τροποποιημένα ζώα 8 μηνών. Επίσης, στα β-catenin cAct ποντίκια παρατηρήθηκε αύξηση των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-13 και 9, της αλκαλικής φωσφατάσης και του κολλαγόνου τύπου X, επιβεβαιώνοντας την συμμετοχή της β-κατενίνης στην πρόωρη ωρίμανση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά [234].

Γίνεται λοιπόν φανερό, πως το σηματοδοτικό μονοπάτι της β-κατενίνης συμβάλλει στην παθογένεια της OA καθώς διαταράσσει την ομοιοστασία του χόνδρου

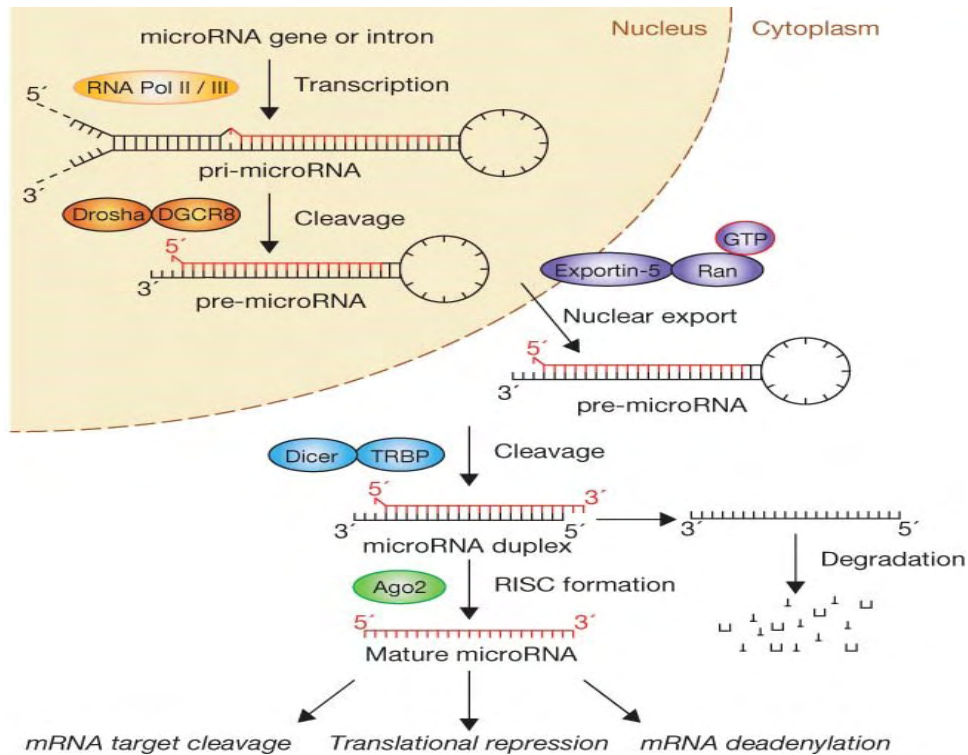
μέσω της ωρίμανσης των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά και της ενεργοποίησης της καταβολικής τους δράσης, διαδικασίες που φυσιολογικά παρατηρούνται κατά την σκελετική ανάπτυξη. Επίσης, τα επίπεδα των ανταστολέων FRZB και Dkk1 στον ορό των ασθενών θα μπορούσαν να αποτελέσουν δείκτες της αποδόμησης του χόνδρου καθώς σχετίζονται με την στένωση του μεσάρθριου διαστήματος που παρατηρείται σε μια OA άρθρωση. Ωστόσο, νέες γενετικές και κλινικές μελέτες απαιτούνται προκειμένου να διερευνηθεί ο πλήρης ρόλος αυτών των μορίων στην εκδήλωση OA με απώτερο σκοπό να αποτελέσουν νέους θεραπευτικούς στόχους για την αντιμετώπιση της νόσου.

## **A.6 microRNAs**

Τις τελευταίες δεκαετίες, η ραγδαία πρόοδος στον τομέα των Βιοεπιστημών οδήγησε στην ανακάλυψη αρκετών νέων γονιδίων τα οποία δεν παράγουν πρωτεΐνες αλλά μικρά μόρια RNAs. Τα μόρια αυτά ονομάζονται microRNAs (miRNAs), έχουν μήκος 21–23 νουκλεοτίδια και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση στα ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω πρόσδεσης στην 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR) του mRNA του εκάστοτε γονιδίου, αν και σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε σύνδεση των miRNAs την 5' αμετάφραστη περιοχή του mRNA [235, 236]. Τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση είτε αναστέλλοντας τη μετάφραση, είτε προωθώντας την αποδόμηση συγκεκριμένων mRNAs. Παρά το γεγονός ότι μόλις 3% των γονιδίων του ανθρώπου κωδικοποιεί miRNAs, τα εν λόγω miRNAs ρυθμίζουν >50% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες [237, 238]. Η πλειοψηφία των γονιδίων των miRNAs των θηλαστικών συναντώνται σε εσώνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή σε μεταγραφικές μονάδες που εντοπίζονται μεταξύ γονιδίων και δεν κωδικοποιούν

πρωτεΐνες. Πιο σπάνια βρίσκονται σε εξώνια, εμφανίζοντας αντινοσηματικό προσανατολισμό σε σχέση με το γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη [239].

Η βιογένεση των microRNAs είναι μια πολύπλοκη και εξειδικευμένη διαδικασία και ξεκινά με τη μεταγραφή του microRNA γονιδίου από το ένζυμο RNA πολυμεράση II [240] (Εικόνα 13). Το πρώιμο microRNA (pri-miRNA) μετάγραφο που παράγεται έχει μέγεθος πάνω από 100 νουκλεοτίδια, καλύπτεται με μια μεθυλιωμένη γουανίνη (5' cap) και πολυαδενυλιώνεται [241]. Αρκετές φορές τα pri-miRNAs φέρουν ιντρόνια όπως δηλαδή και τα κανονικά μετάγραφα mRNAs και υφίστανται τη διαδικασία της ωρίμανσης. Το pri-miRNA στη συνέχεια υφίσταται πέψη από την RNάση Drosha (η οποία για να δράσει απαιτεί την παρουσία του DGCR8) και παράγεται το πρόδρομο microRNA (pre-miRNA) που έχει τη μορφή βρόχου- φουρκέτας και μήκος περίπου 70 νουκλεοτίδια [242]. Το pre-miRNA στη συνέχεια εξάγεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια της μεταφορικής πρωτεΐνης Exportin 5 μέσω υδρόλυσης GTP [243]. Η διαδικασία παραγωγής του ενεργού μορίου microRNA ολοκληρώνεται με την ωρίμανση του πρόδρομου microRNA και την παραγωγή του ώριμου microRNA μέσω της δράσης της ενδοριβονουκλεάσης Dicer. Η Dicer είναι μια πολύ καλά συντηρημένη RNase III ανάμεσα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η Dicer με την ιδιότητα ελικάσης που έχει επεξεργάζεται το πρόδρομο microRNA και παράγει ένα μόριο περίπου 22 νουκλεοτιδίων που είναι το τελικό ώριμο microRNA [244]. Τα microRNAs αλληλεπιδρούν με ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών που ονομάζεται RISC, προωθώντας την αποδόμηση του mRNA στόχου ή την καταστολή της μετάφρασης μέσω της σύνδεσης τους σε κατάλληλες περιοχές της 3'-UTR του mRNA του εκάστοτε γονιδίου [245].



Εικόνα 13: Ο μηχανισμός βιογένεσης των microRNAs

### A.6.1 miR-140 και χονδρογένεση

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 2.042 miRNAs στα ανθρώπινα κύτταρα, καθένα από τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση διαφορετικών γονιδίων στόχων [246]. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών την τελευταία δεκαετία έχει αποδείξει ότι η διαδικασία της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων κατά τη χονδρογένεση δε ρυθμίζεται μόνο από τη δράση μεταγραφικών και αυξητικών παραγόντων αλλά σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν και τα miRNAs [247, 248]. Οι πρώτες βάσιμες ενδείξεις για τη συμμετοχή των miRNAs στον έλεγχο της ανάπτυξης του αρθρικού

χόνδρου παρέχονται από μελέτες σε ποντίκια τα οποία υπέστησαν απαλοιφή του γονιδίου *Dicer*. Η έλλειψη της *Dicer* επέφερε μη φυσιολογική διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων στα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης με αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρότερων άκρων στα ποντίκια, σκελετικές ανωμαλίες και πρόωρο θάνατο [249] [250]. Οι αναπτυξιακές βλάβες συσχετίστηκαν με τη μείωση των χονδροκυττάρων που πολλαπλασιάζονται στην αναπτυξιακή πλάκα και την αύξηση του ρυθμού διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά, προτείνοντας τη συμμετοχή της *Dicer* στα διάφορα στάδια διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων [249].

Το καλύτερο μελετημένο miRNA που εκφράζεται στον αρθρικό χόνδρο είναι το miR-140. Το γονίδιο του miR-140 βρίσκεται μεταξύ των εξονίων 16 και 17 του γονιδίου *Wwr2*, που κωδικοποιεί την πρωτεϊνική λιγάση E3 της ουβικουιτίνης, και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16 του ανθρώπινου γονιδιώματος [251]. Αρχικά η έκφραση του miR-140 ταυτοποιήθηκε στον χόνδρο ψαριών [252], ενώ στη συνέχεια αποδείχτηκε ότι το συγκεκριμένο miRNA είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική ανάπτυξη του χόνδρινου ιστού κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη των ποντικών [251]. Τα τελευταία χρόνια η χρήση μικροσυστοιχιών απέδειξε έναν μεγάλο αριθμό miRNAs που παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ χονδροκυττάρων, αποδιαφοροποιημένων χονδροκυττάρων και μεσεγχυματικών κυττάρων ανθρώπου, με το miR-140 να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη διαφορά έκφρασης μεταξύ των συγκρινόμενων κυτταρικών τύπων, έχοντας υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα χονδροκύτταρα [253], [254]. Επίσης, τα αυξημένα επίπεδα του miR-140 που παρατηρήθηκαν στα χονδροκύτταρα ακολουθούν την αύξηση της έκφρασης του SOX-9 και του COL2A1, μορίων χαρακτηριστικών της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων, προτείνοντας τη συμμετοχή του στη διαδικασία της χονδρογένεσης [253]. Πρόσφατες μελέτες

αποκάλυψαν ότι η έκφραση του miR-140 στον αρθρικό χόνδρο ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα SOX-9 σε συνεργασία με άλλα μέλη της οικογένειας SOX, όπως τον SOX-5 και SOX-6 [255-257].

Τα τελευταία χρόνια μελέτες απέδειξαν πως ο ρόλος του miR-140 στην ΕΟ επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων. Το miR-140 ρυθμίζει την έκφραση της αποακετυλάσης των ιστονών 4 (HDAC4) [251], που δρα ως αναστολέας του RUNX-2, και του γονιδίου Smad-3 που συμμετέχει στην ανάπτυξη των οστών κατά την ΕΟ [258]. Σε *in vivo* μελέτες, τα ποντίκια που είχαν υποστεί απαλοιφή του γονιδίου miR-140 παρουσίασαν αύξηση της πρωτεΐνης Dnrep που δρα ως ανταγωνιστής του σηματοδοτικού μονοπατιού των BMPs, προτείνοντας τον βασικό ρόλο του miR-140 στον έλεγχο της δράσης των αυξητικών παραγόντων που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων [259]. Επίσης, δύο τελευταίες μελέτες ανέδειξαν τη ρύθμιση της έκφρασης της BMP-2 μέσω της δράσης του miR-140 τόσο σε χονδροκύτταρα ποντικού όσο και σε χονδροκύτταρα ανθρώπου [259, 260]. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται προκειμένου να διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος του miR-140 στην ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου και η πιθανή συμμετοχή του στην εκδήλωση ασθενειών της άρθρωσης όπως η οστεοαρθρίτιδα.

#### **A.6.2 miR-140 και Οστεοαρθρίτιδα**

Το miR-140 εκτός του βασικού του ρόλου στη διαδικασία της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων και στην ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου, φαίνεται να εμπλέκεται και στην αιτιοπαθογένεια της ΟΑ. Το 2008 ο Iliorouλος και οι συν. μελετήσανε τα επίπεδα έκφρασης 365 miRNAs σε φυσιολογικούς και ΟΑ χόνδρους και



παρατήρησαν διαφοροποιημένη έκφραση σε 16 miRNAs μεταξύ των συγκρινόμενων ιστών. Μεταξύ αυτών τα 9 υπερεκφραζόταν στον ΟΑ χόνδρο, ενώ τα υπόλοιπα 7, μεταξύ των οποίων και το miR-140 παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης στον ΟΑ χόνδρο [58]. Η μειωμένη έκφραση του miR-140 στην ΟΑ επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια μέσω δύο νέων μελετών, ενισχύοντας την άποψη για συμμετοχή του miR-140 στην εκδήλωση της νόσου [253, 261].

Την τελευταία δεκαετία μία σειρά μελετών απέδειξε πως το miR-140 ενέχεται στον εκφυλισμό του χόνδρου μέσω της ρύθμισης της έκφρασης καταβολικών ενζύμων, όπως της αγγρεκανάσης, ADAMTS-5. *In vitro* πειραματικές μελέτες απέδειξαν πως η IL-1β μειώνει τα μεταγράφα του miR-140, ενισχύοντας παράλληλα τα επίπεδα έκφρασης της MMP-13 και της ADAMTS-5. Αντίθετα, διαμόλυνση των χονδροκυττάρων με ds-miR-140 επέφερε μείωση της παραγωγής της ADAMTS-5 που επάγεται μέσω της IL-1β και επαναφορά των πρωτεϊνικών επιπέδων της αγγρεκάνης σε φυσιολογικά επίπεδα [253]. Η οριστική επιβεβαίωση ότι η ADAMTS-5 αποτελεί άμεσο στόχο του miR-140 ήρθε μετά από την πραγματοποίηση *in vivo* πειραμάτων σε ποντίκια [262]. Ο Miyaki και οι συν. δημιούργησαν διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν το miR-140 και ποντίκια τα οποία είχαν υποστεί απαλοιφή του γονιδίου miR-140 (miR-140<sup>-/-</sup> ποντίκια). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα miR-140<sup>-/-</sup> ποντίκια εμφάνισαν αλλαγές στο χόνδρο που προσομοιάζουν αυτές του οστεοαρθρικού αρθρικού χόνδρου (μείωση πρωτεογλυκανών και σχηματισμός ινώδους χόνδρου) και συσχετίστηκαν με τα αυξημένα επίπεδα της ADAMTS-5 λόγω της μη αποδόμησης της από το miR-140. Αντίθετα, τα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν το miR-140 στον χόνδρο, αποδείχτηκαν ανθεκτικά στην εκδήλωση αρθρίτιδας, αυξάνοντας τη σύνθεση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας και μειώνοντας τα επίπεδα της ADAMTS-5 [262].

Εκτός της ADAMTS-5, το miR-140 ρυθμίζει την έκφραση δύο άλλων μορίων που εμπλέκονται στην εκδήλωση της νόσου, της MMP-13 και του IGFBP-5 [263]. Το 2012 μια *in vitro* μελέτη αποκάλυψε την άμεση ρύθμιση της έκφρασης της MMP-13 από το miR-140, καθώς με μεθόδους βιοπληροφορικής αποδείχθηκε ότι η 3' UTR του mRNA της MMP-13 περιέχει μία θέση πρόσδεσης του miR-140, προτείνοντας την αντίστροφη συσχέτιση της αυξημένης έκφρασης της MMP-13 με τα μειωμένα μετάγραφα του miR-140 στον ΟΑ χόνδρο [261, 263]. Επίσης, διαμόλυνση χονδροκυττάρων με pre-miR-140 επέφερε μείωση των επίπεδων έκφρασης του IGFBP-5, ενώ αναστολή της δράσης του miR-140 με κατάλληλο anti-miR-140 αύξησε την έκφραση του στα χονδροκύτταρα, προτείνοντας τη ρύθμιση ενός άλλου γονιδίου που ενέχεται στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων από το miR-140. Ο IGFBP-5 είναι ένα μόριο που εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στον ΟΑ χόνδρο και ελέγχει τη δράση IGF1, έναν από τους σημαντικότερους αναβολικούς παράγοντες των χονδροκυττάρων [261].

Όλες οι παραπάνω μελέτες αποδεικνύουν τον διπλό ρόλο του miR-140 στον αρθρικό χόνδρο. Το miR-140 είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου, όταν όμως διαταράσσονται τα επίπεδα της έκφρασης του, συμμετέχει στον εκφυλισμό της χόνδρινης επιφάνειας των οστών, καθώς απορυθμίζεται η έκφραση γονιδίων που ελέγχουν την ομοιοστασία των χονδροκυττάρων. Η πλήρης κατανόηση του μοριακού μηχανισμού που ρυθμίζει την έκφραση του miR-140 αλλά και η ανακάλυψη όλων των γονιδίων που αποτελούν στόχο του εν λόγω μορίου θα συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της μοριακής βάσης της ΟΑ, αναδεικνύοντας νέους θεραπευτικούς στόχους για την αντιμετώπιση της.

## A.7 Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της μοριακής βάσης της υπερτροφίας των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων μέσω της μελέτης της έκφρασης γονιδίων και μηχανισμών που ελέγχουν τη δράση τους στον οστεοαρθρικό χόνδρο, καθώς και η ανάδειξη νέων μορίων στόχων, τα οποία θα στοχεύουν στην αναστροφή του οστεοαρθρικού φαινοτύπου των χονδροκυττάρων σε πρώιμα στάδια της εξέλιξης της νόσου.

Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκαν:

- ✓ Η μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση γονιδίων που ανήκουν στην οικογένεια των BMPs, όπως οι BMP-2, BMP-4, BMP-7, αλλά και οι υποδοχείς τους, BMPRI-A και BMPRI-B σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκυττάρια
- ✓ Η μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι της β-κατενίνης, όπως οι υποδοχείς LRP-5, LRP-6 και οι μεταγραφικοί παραγόντες, LEF-1, και TCF-4 σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκυττάρια
- ✓ Ο ρόλος της BMP-2 στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης στον οστεοαρθρικό χόνδρο μέσω επίδρασης της BMP-2 σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων

- ✓ Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης μεταξύ της BMP-2 και της β-κατενίνης στην επαγωγή της έκφρασης των καταβολικών ενζυμών, MMP-7, 9, 13, 14, ADAMTS-4 και 5 και του δείκτη υπερτροφίας COL10A1
- ✓ Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης στην καταβολική δράση των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων και στη διαφοροποίηση τους σε υπερτροφικά μετά από *in vitro* ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού
- ✓ Ο ρόλος του miR-140 στη ρύθμιση της έκφρασης της BMP-2 και στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου μέσω της χορήγησης miR-140 σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **B.1 Υλικά και Μέθοδοι**

### **B.1.1 Συλλογή δειγμάτων**

Τα δείγματα οστεοαρθρικού αρθρικού χόνδρου που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη ελήφθησαν από τους μηριαίους και κνημιαίους κονδύλους ασθενών που υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική γόνατος λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Από όλους τους ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη ελήφθη επίσης αρθρικό υγρό υπό άσηπτες συνθήκες στο χώρο του χειρουργείου καθώς και περιφερικό αίμα.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 46 δείγματα ασθενών (8 άνδρας και 38 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας  $64.7 \pm 9.7$ ). Τα δείγματα του αρθρικού χόνδρου που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη απομονώθηκαν από περιοχές του χόνδρου που παρουσίαζαν μεγάλο βαθμού αλλοιώσεις, δηλαδή εμφάνιζαν προχωρημένο στάδιο ΟΑ. Ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα ή αρθρίτιδα στα πλαίσια άλλου αυτοάνοσου νοσήματος, καθώς και χονδροδυσπλασία, σηπτική ΟΑ και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 14 άτομα (6 άνδρας και 8 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας  $54.6 \pm 7.6$ ), χωρίς ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων, τα οποία είχαν υποστεί χειρουργική επέμβαση επανόρθωσης κατάγματος ή ακρωτηριασμό.

Αναλυτικά κλινικά δεδομένα από κάθε ασθενή συμπληρώθηκαν σε ειδική φόρμα που αφορούσαν το βαθμό της φυσικής τους κατάστασης, το φύλο, την ηλικία, τον δείκτη μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI), τη παρουσία πόνου, δυσκαμψίας, διόγκωσης της άρθρωσης, την παρουσία οστεοφύτων και την παρουσία άλλων νοσημάτων. Πριν οι ασθενείς υποβληθούν σε ολική αρθροπλαστική, έγινε ακτινογραφικός έλεγχος και οι ακτινογραφίες βαθμολογήθηκαν με βάση το σύστημα Kellgren-Lawrence (K/L score) [264]. Η ακτινολογική ταξινόμηση της ΟΑ με βάση το σύστημα Kellgren-Lawrence γίνεται με τη χρήση μιας κλίμακας 5 βαθμίδων (0-4) όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2). Από το σύνολο των ασθενών με πρωτοπαθή ΟΑ, 10 ασθενείς εμφάνισαν K/L score = 3 και 36 βαθμολογήθηκαν με K/L score = 4, ενώ όλα τα δείγματα των φυσιολογικών αρθρικών χόνδρων είχαν K/L score = 0.

<b>Βαθμίδα</b>	<b>0</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
<b>Κριτήρια</b>	Φυσιολογική άρθρωση	Ελάχιστα οστεόφυτα	Σαφή οστεόφυτα	Οστεόφυτα, στένωση μεσαρθρίου διαστήματος	Οστεόφυτα, στένωση μεσαρθρίου διαστήματος, σκλήρυνση υποχόνδριου οστού.

--	--	--	--	--	--

Πίνακας 2: Ακτινολογική ταξινόμηση της ΟΑ με βάση το σύστημα Kellgren-Lawrence

## **B.1.2 Απομόνωση και καλλιέργεια χονδροκυττάρων**

### B.1.2.1. Συνθήκες καλλιέργειας των χονδροκυττάρων

Η απομόνωση και η καλλιέργεια των χονδροκυττάρων έγινε από τμήμα αρθρικού χόνδρου που ελήφθη άσηπτα κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης. Το τμήμα το αρθρικού χόνδρου υπέστη ενζυμική διάσπαση προκειμένου να απελευθερωθούν τα χονδροκύτταρα. Η καλλιέργεια τους πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες των 25cm<sup>3</sup>, χρησιμοποιώντας κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Η ανάπτυξη τους έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Heraeus Instrumanets), όπου επικρατούσαν κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη τους, όπως σταθερή θερμοκρασία στους 37°C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO<sub>2</sub>. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ειδικό στείρο χώρο και όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής προς αποφυγή εξωτερικών μολύνσεων. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

### B.1.2.2 Υλικά απομόνωσης και καλλιέργειας χονδροκυττάρων

- Θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F-12 (DMEM/F-12, GIBCO BRL, UK). Στο θρεπτικό υλικό πριν τη χρήση του προστίθεται ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) σε αναλογία 10% του όγκου του θρεπτικού DMEM, ο οποίος παρέχει παράγοντες που συμβάλλουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και αντιβιοτικά πενικιλίνη και



στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin,P/S) σε αναλογία 1% του όγκου του θρεπτικού DMEM.

- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (HyClone)
- Προνάση (Roche)
- Κολλαγενάση (Roche)

#### B.1.2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης και καλλιέργειας χονδροκυττάρων

- Έκλυση του ιστού με PBS για απαλλαγή από υπολείμματα του χειρουργείου και τεμαχισμός με αποστειρωμένο νυστέρι
- Προσθήκη 5mg/ml προνάσης σε 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο για 30 λεπτά
- Αφαίρεση του υπερκειμένου, προσθήκη 5mg/ml κολλαγενάσης σε 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο για 90 λεπτά
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε πλαστικό σωληνάριο των 15 ml και φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού
- Επαναιώρηση του ιζήματος, μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα των 25cm<sup>3</sup> και επώαση στον κλίβανο

Τα χονδροκύτταρα αρχικά είναι στρογγυλά και βρίσκονται ελεύθερα στο θρεπτικό υλικό. Μετά από 2 ημέρες προσκολλώνονται στη φλάσκα και αποκτούν πεπλατυσμένο, πολυγωνικό σχήμα. Όταν τα χονδροκύτταρα αύξησαν τον πληθυσμό τους και κάλυψαν την επιφάνεια της φλάσκας τότε είτε γινόταν ανακαλλιέργεια είτε χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA, πρωτεϊνών, υλικού για CHIP και για την πραγματοποίηση των επιδράσεων με διάφορες χημικές ουσίες.

Η ανακαλλιέργεια των χονδροκυττάρων γινόταν κάθε 7 ημέρες περίπου, ανάλογα με το μέγεθος του αρχικού ιστού και τον αριθμό των κυττάρων που απομονώνονταν, όταν τα χονδροκύτταρα είχαν αυξήσει τον πληθυσμό τους και είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Μετά από 1 έως 2 ανακαλλιέργειες γινόταν και κατάψυξη των κυττάρων για μελλοντική χρήση.

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων απαιτούνταν η αποκόλλησή τους. Αρχικά γινόταν αφαίρεση του καλλιεργητικού υλικού από τη φλάσκα, έκπλυση με 5ml PBS w/o  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  και κατόπιν προσθήκη θρυψίνης (1ml). Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο, το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησής τους και έτσι τα κύτταρα αποκολλώνται και μπορούν να συλλεχθούν. Οι φλάσκες παρέμεναν στον επωαστικό κλίβανο για 5 λεπτά περίπου μέχρι τα κύτταρα να αποκολληθούν (μέγιστος χρόνος 10 λεπτά). Η αποκόλληση των κυττάρων ελέγχονταν στο μικροσκόπιο και στη συνέχεια, για τη διακοπή της δράσης της θρυψίνης, προστίθεντο άμεσα πλήρες θρεπτικό υλικό σε δεκαπλάσια ποσότητα από αυτή της θρυψίνης και ακολούθως γινόταν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και εκπλύσεις προς συλλογή των κυττάρων. Στη συνέχεια γινόταν μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο με πλάκα Newbauer: 20μl από το κυτταρικό εναιώρημα αναμιγνύονταν με 20μl Trypan Blue και στη συνέχεια τοποθετούνταν πάνω στην πλάκα. Το Trypan Blue βάφει μπλε τα κύτταρα των οποίων η κυτταρική μεμβράνη έχει υποστεί αλλοιώσεις, όπως τα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα. Τα υγιή κύτταρα δεν βάφονται και είναι αυτά που μετρώνται. Με τον τρόπο αυτό υπολογίζεται η συγκέντρωση του κυτταρικού εναιωρήματος και γίνεται η τοποθέτηση των κυττάρων σε καινούργιες φλάσκες σε συγκέντρωση  $1-2 \times 10^6$  κύτταρα/ml φρέσκου θρεπτικού υλικού.

Για την κατάψυξη των κυττάρων, τα κύτταρα τοποθετούνται σε ειδικό κρυοφιαλίδιο σε συγκέντρωση  $4-5 \times 10^6$ /ml θρεπτικού υλικού το οποίο περιέχει 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich) και 30% FBS χωρίς προσθήκη αντιβιοτικών. Το DMSO συντελεί στην αργή ψύξη των κυττάρων και του θρεπτικού υλικού, αποφεύγοντας τη δημιουργία κρυστάλλων που θα κατέστρεφαν την κυτταρική μεμβράνη. Η κατάψυξη των κυττάρων γίνεται σταδιακά. Αρχικά το κρυοφιαλίδιο τοποθετείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 4 ώρες, κατόπιν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 24ώρες και τελικά στους  $-150^{\circ}\text{C}$ .

Σε αντίθεση με την σταδιακή κατάψυξη των κυττάρων, η απόψυξή τους γίνεται γρήγορα με την τοποθέτηση του κρυοφιαλιδίου σε υδατόλουτρο στους  $37^{\circ}\text{C}$  και άμεση μεταφορά του περιεχομένου του φιαλιδίου σε σωληνάριο των 15ml το οποίο περιέχει 5ml πλήρες θρεπτικό υλικό. Το σωληνάριο φυγοκεντρείται για 5 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τοποθετούνται σε φλάσκα των 25ml και στη συνέχεια στον επωαστικό κλίβανο.

### **B.1.3 Απομόνωση RNA από χονδροκύτταρα κυτταροκαλλιέργειας**

#### **B.1.3.1 Υλικά απομόνωσης RNA**

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

### B.1.3.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA

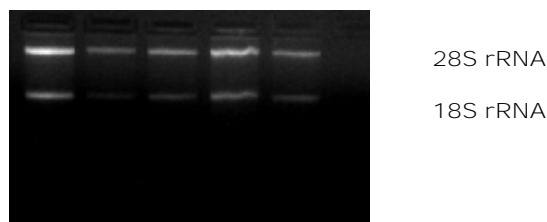
- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS (δύο φορές)
- Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση για 2-3 λεπτά στον κλίβανο
- Αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης
- Μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας σε πλαστικό σωληνάριο
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2000 στροφές για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml HBSS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2000 στροφές για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 1-3 ml Trizol, ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος των κυττάρων
- Επώαση για 5 λεπτά στους 15-30 °C σε υδατόλουτρο
- Προσθήκη 0,2ml χλωροφόρμιου για κάθε ml Trizol
- Καλή ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα
- Επώαση για 2-3 λεπτά στους 15-30 °C σε υδατόλουτρο
- Φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές για 15 λεπτά στους 2-8 °C
- Μεταφορά υπερκείμενου σε erpendorf των 2 ml
- Προσθήκη 0,5ml Ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε ml Trizol
- Επώαση για 10 λεπτά στους 15-30 °C σε υδατόλουτρο
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 10 λεπτά στους 2-8 °C

- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα του RNA με 1ml 70% αιθανόλης
- Ανάδευση σε Vortex
- Φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά στους 2-8 °C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και στέγνωμα RNA σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό για λίγη ώρα
- Διάλυση του RNA σε RNase-free water (περίπου 50μl)
- Επώαση για 10 λεπτά στους 55-60 °C σε υδατόλουτρο
- Αποθήκευση του RNA στους -80 °C

Για τον έλεγχο της ποσότητας του RNA πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση κάθε δείγματος στα 260 και 280 nm, αφού πρώτα κάθε δείγμα είχε αραιωθεί 1:100. Η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε ως εξής:

**συγκέντρωση RNA = αραιώση x OD<sub>260</sub> x 40 (mgr/ml)**

Επίσης πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ποιότητας του RNA μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 2% (Εικόνα 14)



Εικόνα 14: Δείγματα RNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%

#### **B.1.4 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)**

Τα RNAs που απομονώθηκαν μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής *in vitro*, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας και το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης.

#### B.1.4.1 Υλικά για τη σύνθεση cDNA

- Random hexamers (2,97 µg/µl, Invitrogen)
- Κιτ αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript III (200U/µl, Invitrogen)
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs 50mM, Invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό (DEMO S.A.)

#### B.1.4.2 Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε 1µg RNA κάθε δείγματος ενώ ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25 µl. Αναλυτικότερα:

- Αρχικά το RNA διαλύθηκε σε ddH<sub>2</sub>O και προστέθηκε 1µl Random Primers ώστε ο τελικός όγκος να είναι 15 µl
- Το μείγμα θερμάνθηκε στους 70 °C για 10 λεπτά, ώστε να γίνει αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών των μορίων RNA
- Ακολούθησε προσθήκη των υπολοίπων αντιδραστηρίων στις εξής ποσότητες

Ρυθμιστικό διάλυμα 5x: 4µl

Δεοξυριβονουκλεοτίδια: 2µl

Χλωριούχο Μαγνήσιο: 2µl

DTT: 2µl

Super Script III (200U/µl): 0,5µl

- Το διάλυμα αντίδρασης ακολούθησε το παρακάτω πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

20 °C, 10 λεπτά

42 °C, 45 λεπτά

99 °C, 3 λεπτά

18 °C, 5 λεπτά

τελική θερμοκρασία: 4 °C

Για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων πραγματοποιείται ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην συγκεκριμένη περίπτωση, ως μετάγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου **GAPDH** (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Το cDNA κάθε δείγματος ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο GAPDH:

**Forward:** 5' GAGTCAACGGATTTGGTCGT 3'

**Reverse:** 5' GACAAGCTTCCCGTTCTCAG 3'

Το διάλυμα αντίδρασης (AmpIriTaq Gold 360 Master Mix, Applied Biosystems) για την ανίχνευση του γονιδίου GAPDH περιείχε:

cDNA	3	μl
Ρυθμιστικό διάλυμα 2x	12,5	μl
Εκκινητής Forward (50p/mol)	1	μl
Εκκινητής Reverse (50p/mol)	1	μl
δισ απεσταγμένο νερό	7,5	μl

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του mRNA του γονιδίου ήταν οι εξής:

- αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 10 λεπτά
- 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:

-αποδιάταξη στους 95°C για 30''

-υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60°C για 30''

-επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό

- τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ο έλεγχος παρουσίας ή όχι του τμήματος που ενισχύθηκε πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% με μάρτυρα προτύπων μοριακών βαρών 100 bp (Fermentas).

**B.1.5 Ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων COL2A1, COL10A1, AG-GRECAN, BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMPR-IA, BMPR-IB, LRP-5, LRP-6, LEF-1, TCF-4, MMP-7, 9, 13, 14, ADAMTS-4 και 5 με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR)**

B.1.5.1 Γενικές αρχές ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) στηρίζεται στην ενζυματική ενίσχυση μιας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA *in vitro*, με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης και των εκκινητών. Η Taq πολυμεράση είναι μια θερμοανθεκτική πολυμεράση η οποία εξάγεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Οι εκκινητές (primers) είναι μονόκλωνες νουκλεοτιδικές ακολουθίες, ολιγονουκλεοτίδια, οι οποίοι υβριδίζονται στις συμπληρωματικές θέσεις των δύο αλυσίδων, στα άκρα του τμήματος του DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Έτσι, λοιπόν, για να πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός του συγκεκριμένου τμήματος του DNA το μείγμα αντίδρασης θα πρέπει να περιέχει : τη δίκλωνη ακολουθία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, Taq πολυμεράση με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα, το ζεύγος των εκκινητών, διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών



δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) τα οποία χρησιμοποιεί η πολυμεράση και διάλυμα  $MgCl_2$  που διευκολύνει τη δράση της πολυμεράσης.

Η ποσοτική αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου συνίσταται σε αξιόπιστη ανίχνευση και μέτρηση των προϊόντων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσό του αρχικού μητρικού μορίου κατά την έναρξη της PCR. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να μετρηθεί η ποσότητα του προϊόντος PCR ενώ η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση. Ένα από τα καταλληλότερα συστήματα καταγραφής αποτελεί το σύστημα ABI 7300 (Applied Biosystems). Η αρχή του συστήματος στηρίζεται στην χρήση ειδικών φθορίζουσών χρωστικών και στην ανίχνευση του φθορισμού, που εκπέμπεται κατά την ενσωμάτωση τους στο DNA του δείγματος.

Στην παρούσα εργασία για την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα ουσία SYBR Green. Η SYBR Green έχει την ικανότητα να συνδέεται σε δίκλινα μόρια DNA, ενισχύοντας τον φθορισμό της και επιτρέποντας στο σύστημα καταγραφής την ανίχνευση των επιθυμητών προϊόντων. Η μέγιστη απορρόφηση της ουσίας είναι στα 497 nm. Η SYBR Green ουσία προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε πραγματικό χρόνο. Μπορεί να συνδεθεί σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA αλλά μόνο σε μια συγκεκριμένη περιοχή κάθε φορά, αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου. Ενώ ο υπολογισμός του φθορισμού σε αυξανόμενες θερμοκρασίες μειώνει την ανίχνευση μη ειδικών προϊόντων.

Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους θερμοκρασιακούς κύκλους (30-35), καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία στάδια:

- αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 94-95°C

- σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα της μονόκλωνης πια ακολουθίας-στόχου, σε θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από τη σύνθεση των εκκινητών
- θέρμανση του μείγματος στους 68-72 °C, έτσι ώστε η πολυμεράση να πραγματοποιήσει την αντιγραφή του DNA-στόχου με τη βοήθεια των dNTPs, ξεκινώντας από τους εκκινητές.

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

#### B.1.5.2 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των mRNA μεταγράφων των υπομελέτη γονιδίων

- cDNA
- Ρυθμιστικό διάλυμα με SYBR Green και ROX (Fermentas)
- Εκκινητές (5 μM) των γονιδίων
- Δις απεσταγμένο νερό (DEMO S.A)

#### B.1.5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων των γονιδίων

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

cDNA:	3 μl
SYBR Green:	12,5 μl
Εκκινητής forward:	1 μl
Εκκινητής reverse:	1 μl
ddH <sub>2</sub> O:	7,5 μl

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο φαίνονται στον πίνακα 3

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του mRNA των γονιδίων ήταν οι εξής:

- αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 10 λεπτά
- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
  - αποδιάταξη στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα
  - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60°C για 60 δευτερόλεπτα
  - επιμήκυνση στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα
- τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά

Γονίδιο	Αλληλουχία Forward εκκινητή	Αλληλουχία Reverse εκκινητή
<b>BMP-2</b>	CCCAGCGTGAAAAGAGAGAC	GGAAGCAGCAACGCTAGAAG
<b>BMPR-1A</b>	TTTATGGCACCCAAGGAAAG	TGGTATTCAAGGGCACATCA
<b>LEF-1</b>	CCCTTCCAACCTCTCCTTTCC	TTGAAGGGGATCATCTCGTC
<b>LRP-6</b>	GACTGGGTTGCACGAAATCT	TACACGGTCAGAACCATCCA
<b>LRP-5</b>	GTGCCTGGGTGAGATTCTTC	CACGAAGACTGCGAAACAGA
<b>MMP-7</b>	TGCTCACTTCGATGAGGATG	TGGGGATCTCCATTTCCATA
<b>MMP-13</b>	TGGCATTGCTGACATCATGA	GCCAGAGGGCCCATCAA
<b>MMP-14</b>	GAGCTCAGGGCAGTGGATAG	GGTAGCCCGGTTCTACCTTC
<b>MMP-9</b>	TTGACAGCGACAAGAAGTGG	GCCATTCACGTCGTCCTTAT
<b>BMP-4</b>	ATGAAGCCCCCAGCAGAAGT	TCACATTGTGGTGGACCAGTC

<b>ADAMTS-4</b>	TCCTGCAACACTGAGGACTG	GGTGAGTTTGCCTGGTCCT
<b>ADAMTS-5</b>	CAGCAGTGCAACCTGACATT	CAGATTCTCCCCTTCCACA
<b>COL10A1</b>	CAGGCATAAAAGGCCAC	GTGGACCAGGAGTACCTTGC
<b>COL2A1</b>	ATGACAATCTGGCTCCCAACTGC	GACCGGCCCTATGTCCACACCGAAT
<b>AGGRECAN</b>	TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC	GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA
<b>BMPR-IB</b>	TCGTGCAGATGGCTTGTATC	TTAGCCTGACGGATGTTCC
<b>BMP-7</b>	CGGATCAGCGTTTATCAGGT	CAACTTGGGGTTGATGCTCT
<b>TCF-4</b>	CCGTCCAGGAACCTATGGAGA	CTGGTGGCAACCCTGTAAGT
<b>GAPDH</b>	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG

Πίνακας 3: Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στη real-time PCR

### **B.1.6 Απομόνωση πρωτεϊνών από χονδροκύτταρα κυτταροκαλλιέργειας**

#### B.1.6.1 Υλικά απομόνωσης πρωτεϊνών

- Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis buffer)
  - 30 mM Tris (Invitrogen)
  - 10% Glycerol (Invitrogen)
  - 150 mM NaCl (Sharlau)
  - 1% NP40 (Ambion)
- Αναστολείς πρωτεασών (Roche)
- Αναστολείς φωσφατασών (Roche)

#### B.1.6.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών

- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα

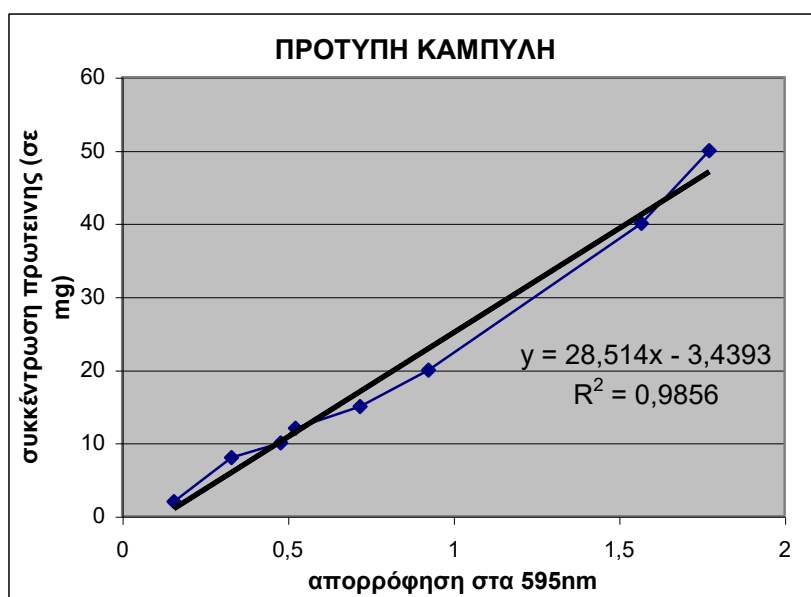
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS (δύο φορές)
- Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση για 2-3 λεπτά στον κλίβανο
- Αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης
- Μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας σε πλαστικό σωληνάριο
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2000 στροφές για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2000 στροφές για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 100 μl διάλυμα λύσης με 10% αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών σε ίζημα  $10^5$  κυττάρων.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος και διατήρηση της πρωτεΐνης στον πάγο για 40 λεπτά και ανάδευση αυτής σε vortex κάθε 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 15 λεπτά
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούριο erpendorf
- Φωτομέτρηση της πρωτεΐνης και αποθήκευση της στους  $-80^{\circ}\text{C}$

#### B.1.6.3 Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford

Ο υπολογισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν έγινε με χρήση υλικών της εταιρίας Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay). Συγκεκριμένα, ο υπολογισμός έγινε με τη μέθοδο Bradford, κατά την οποία μια χρωστική (Coomassie Brilliant Blue G-250 ), όταν δεσμευτεί σε μια πρωτεΐνη αλλάζει το μέγιστο απορρόφησης από τα 460nm στα 595nm. Καταρχήν, δημιουργήθηκε μια πρότυπη

καμπύλη συσχέτισης τιμών απορρόφησης με πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις, με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα:

- Ποσότητες από 1μg έως 20μg αλβουμίνης του ορού του βοός ( Bovine Serum Albumine-BSA ) διαλύθηκαν σε 800μl dH<sub>2</sub>O
- Προσθήκη 200μl χρωστικής σε κάθε δείγμα πρωτεΐνης,
- Επάση μίγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Ήπια ανάδευση των δειγμάτων αρκετές φορές
- Μεταφορά σε κυβέττα και φωτομέτρηση στα 595 nm
- Κατασκευή πρότυπης καμπύλης βάσει των τιμών απορρόφησης των διαφόρων συγκεντρώσεων



Εικόνα 15: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών

Όσον αφορά στις πρωτεΐνες άγνωστης συγκέντρωσης, ποσότητα 5μl από την πρωτεΐνη προστέθηκε σε 495 μl διαλύματος Bradford (5%) και ακολούθησε η παραπάνω

διαδικασία. Οι τιμές απορρόφησης που προέκυψαν συγκρίθηκαν με την πρότυπη καμπύλη και βρέθηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών.

### **B.1.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS**

#### B.1.7.1 Γενικές αρχές της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο γεγονός ότι ένα μόριο με καθαρό φορτίο, όπως πρωτεΐνες, DNA, RNA, θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης ( $u$ ) μίας πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ( $E$ ), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης ( $z$ ) και τον συντελεστή τριβής ( $f$ ):

$$u = Ez/f$$

Η σταθερά τριβής εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου. Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πηκτή και όχι σε υγρό, κυρίως για δύο λόγους. Καταρχάς η πηκτή καταστρέφει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις θερμοκρασίας – απαραίτητη προϋπόθεση για σωστό διαχωρισμό. Δεύτερον, η πηκτή λειτουργεί σαν μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής κινούνται εύκολα δια μέσου της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου είναι προτιμότερες για ηλεκτροφόρηση, γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις, ενώ οι πόροι της πηκτής μπορούν εύκολα να ρυθμιστούν, επιλέγοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου και μεθυλενοδισακρυλαμιδίου, στον πολυμερισμό για τον σχηματισμό της πηκτής.

Σε μία ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει του μοριακού τους βάρους. Το δωδεκακυλοθειϊκό (SDS) είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει τις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κυρίες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά 2 αμινοξέα, που δίνει στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιαταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο απ' ό,τι το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης, επομένως αυτό το αρχικό φορτίο καθίσταται αμελητέο. Η μετακίνηση γίνεται σε λεπτή κατακόρυφη στιβάδα και με αυτόν τον τρόπο ηλεκτροφόρησης η μετακίνηση των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων κάτω από αυτές τις συνθήκες είναι απολύτως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους.

#### B.1.7.2 Υλικά ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

- Διάλυμα χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (Sample buffer, Invitrogen)
- Αναγωγικό διάλυμα (Reducing buffer, Invitrogen)
- Πηκτή πολυακτυλαμιδίου-SDS (NuPage Novex Tris-Acetate Mini Gels, Invitrogen)
- Μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (NuPage MES or MOPS Running buffer, Invitrogen)
- Αντιοξειδωτικό (NuPage Antioxidant, Invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό (DEMO S.A)

#### B.1.7.3 Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

I) Αποδιάταξη πρωτεϊνών



Πριν την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται αποδιάταξη και διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 35 μg.

Το διάλυμα αποδιάταξης των πρωτεϊνών περιείχε:

Πρωτεΐνη:	x μl
Sample buffer:	5 μl
Reducing buffer:	2 μl
ddH <sub>2</sub> O:	γ μl (μέχρι τελικό όγκο 20 μl)

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε συσκευή PCR για αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους 95 °C για 5 λεπτά

## II) Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Xcell Surelock (Invitrogen) και η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής:

- Στήσιμο της συσκευής Xcell Surelock
- Προσθήκη 600ml Running buffer (50ml Running buffer σε 950ml ddH<sub>2</sub>O) στο μπροστά και πίσω μέρος της συσκευής. Στο μεσαίο μέρος της συσκευής προστίθενται 200 ml Running buffer και 500μl antioxidant
- Φόρτωση δειγμάτων στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Στην αριστερή άκρη της πηκτής φορτώνεται ο μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών
- Ηλεκτροφόρηση στα 200V και 120mA για 50 λεπτά
- Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης προετοιμάζονται τα διαλύματα και τα υλικά που θα χρησιμοποιηθούν στην ανοσοαποτύπωση

### **B.1.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)**

#### B.1.8.1 Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης βασίζεται στη μεταφορά των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών σε μία ειδική επιφάνεια και στην ανίχνευση των επιλεγμένων πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Η επιφάνεια αυτή είναι συνήθως μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και βοηθάει τις πρωτεΐνες να αντιδράσουν με το αντίσωμα. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει την πρωτεΐνη σαν αντιγόνο και δεσμεύεται σε αυτή. Το σύμπλοκο αντιγόνου – αντισώματος στην επιφάνεια μπορεί να ανιχνευτεί με την προσθήκη δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο. Το δεύτερο αντίσωμα συνήθως είναι σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP) με αποτέλεσμα να δημιουργείται σκοτεινή γραμμή σε φιλμ ακτίνων X (αυτοραδιογραφία) η οποία αντιπροσωπεύει τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτης πρωτεΐνης.

#### B.1.8.2 Υλικά ανοσοαποτύπωσης

- Διάλυμα μεταφοράς
  - 5% Transfer buffer (Nu Page Transfer buffer, Invitrogen)
  - 1% μεθανόλη (Applichem)
  - 0,1% αντιοξειδωτικό (Invitrogen)
- Χαρτί Whitman (Bio-Rad)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham Biosciences)
- Σφουγγαράκια (Invitrogen)
- Χρωστική μεμβράνης (Ponseau, Sigma)
- Διάλυμα πλύσης TBS-Tween
  - 50 mM Tris (Invitrogen)
  - 150 mM NaCl (Scharlau)

1 mM EDTA (Scharlau)

0,05% Tween (Bio-Rad)

- Σκόνη μπλοκαρίσματος (Blotting Grade Blocker, Bio-Rad)
- Ορός αλβουμίνης βοοειδών (BSA, Invitrogen)
- Developer buffer
- Fixer buffer
- Φιλμ ακτίνων X (Kodak)
- Ενισχυτικό σήματος ECL<sup>+</sup> (GE Healthcare)
- Πρώτο αντίσωμα για τα υπό μελέτη γονίδια

anti-LRP-5 (sc-21389, Santa Cruz Biotechnology)

anti-BMP-2 (sc-57040, Santa Cruz Biotechnology)

anti-BMP-4 (AF757, R&D systems)

anti-BMPR-IA (sc-134285, Santa Cruz Biotechnology)

anti-LEF-1 (sc-8591, Santa Cruz Biotechnology)

anti-phospho-β-catenin (#9561, Cell Signalling Technology)

anti-β-catenin (#9582, Cell Signalling Technology)

- Δεύτερο αντίσωμα

Mouse anti-goat HRP (Santa Cruz Biotechnology)

Goat anti-mouse HRP (Invitrogen)

Goat anti-rabbit HRP (Invitrogen)

- Mouse monoclonal anti-β-actin (R&D System)

#### B.1.8.3. Πρωτόκολλο ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών

Για την μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιήθηκε και πάλι η συσκευή Xcell Surelock. Αναλυτικότερα:

- Πριν την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών επωάζονται σε transfer buffer τα εξής υλικά:

Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (5 cm x 8 cm)

6 σφουγγαράκια

Δύο χαρτιά Whitman (5 cm x 8 cm)

Πηκτή πολυακρυλαμιδίου

- Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών κατασκευάζεται το sant wits: 3 σφουγγαράκια → χαρτί Whitman → πηκτή πολυακρυλαμιδίου → μεμβράνη νιτροκυτταρίνης → χαρτί Whitman → 3 σφουγγαράκια
- Μεταφορά του sant wits στο κουτί Xcell Blot Module και τοποθέτηση του στη συσκευή Xcell Surelock
- Προσθήκη 600 ml ddH<sub>2</sub>O στο μπροστά και πίσω μέρος της συσκευής. Στο μεσαίο τμήμα προστίθενται 200 ml Transfer buffer
- Μεταφορά των πρωτεϊνών στα 30V και 200 mM για 1 ώρα και 40 λεπτά (πρόγραμμα blotting)
- Μετά το πέρας της μεταφοράς ακολουθεί βάψιμο της μεμβράνης με Ponceau, μέχρι να εμφανιστούν οι μπάντες των πρωτεϊνών
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 15 λεπτά και επιπλέον τρεις φορές για 5 λεπτά με ανάδευση
- Μεταφορά της μεμβράνης σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% (2,5 gr σκόνης μπλοκαρίσματος σε 50 ml TBST) ή σε BSA 5% αν το αντίσωμα αναγνωρίζει φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη. Επώαση στους 4 °C με ανάδευση ολονύκτια
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 15 λεπτά και επιπλέον τρεις φορές για 5 λεπτά με ανάδευση

- Επώαση της μεμβράνης στο κατάλληλο πρώτο αντίσωμα στους 4 °C με ανάδευση ολονύκτια. Το αντίσωμα διαλύεται σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% (αν το αντίσωμα αναγνωρίζει φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη διαλύεται σε BSA 5%)
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 15 λεπτά και επιπλέον τρεις φορές για 5 λεπτά με ανάδευση
- Επώαση της μεμβράνης στο κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα για δύο ώρες με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 15 λεπτά και επιπλέον τρεις φορές για 5 λεπτά με ανάδευση
- Η ανίχνευση γίνεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε για ένα λεπτό σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1,25 mM σε 0,1 M Tris-Cl pH 8,5), στο οποίο προστέθηκαν 10 μl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και 100 μl κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO). Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν της λουμινόλη σε 3-αμινοφθαλικό, ουσία η οποία εκπέμπει φως. Στη συνέχεια η μεμβράνη καλύφθηκε με διαφανή μεμβράνη και ακολούθησε έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ Hyperfilm ECL (Amersham). Το φιλμ εμφανίστηκε με τα αντιδραστήρια εμφάνισης (3 λεπτά επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης (Kodak), 3 λεπτά στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak) και 3 λεπτά σε νερό.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ανοσοαποτύπωση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Image Quant 6. Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιεί μία διαδικασία ποσοτικοποίησης, κατά την οποία συγκρίνει τη σχετική ένταση διαφορετικών ζωνών πάνω σε μία σαρωμένη εικόνα ενός πηκτώματος ή μεμβράνης. Συνεπώς, οι μεμβράνες σαρώθηκαν και προσδιορίστηκε η ένταση των ζωνών πάνω στην εικόνα για όλες τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος.

### **B.1.9 Ανοσοϊστοχημεία**

#### **B.1.9.1 Αρχή της μεθόδου**

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της έμμεσης ανοσοϊστοχημείας, τεχνική κατά την οποία ένα αντίσωμα κατευθύνεται προς το ειδικό αντιγόνο-στόχο και κατόπιν δεύτερο σσημασμένο με χρωμογόνο αντίσωμα καθιστά ορατό το σύμπλεγμα στο μικροσκόπιο. Η ανίχνευση των συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος βασίστηκε σε σημασμένα δευτερογενή αντισώματα HRP (horseradish peroxidase). Όταν έχει χρησιμοποιηθεί υπεροξειδάση, είναι απαραίτητη η προσθήκη διαλύματος διαμινοβενζιδίνης (DAB) που προσδίνει καφέ χρώμα στη θέση των συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντίσωμα.

Αμέσως μετά τη λήψη του αρθρικού χόνδρου από το χειρουργείο, τμήμα του δείγματος μονιμοποιήθηκε σε 10% φορμαλίνη, έπειτα υπέστη απασβέστωση με τη χρήση διαλύματος 13% EDTA για 3 εβδομάδες και ακολούθησε σκλήνωση σε λειωμένη παραφίνη 58-60 °C σε κύβους. Από τους σκληνωμένους σε παραφίνη ιστούς, ελήφθησαν αντιπροσωπευτικές τομές πάχους 4μm με τη χρήση ειδικού μικροτόμου. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες (Polysine Superfrost Plus) για την εφαρμογή της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου.

#### B.1.9.2 Υλικά ανοσοϊστοχημείας

- Ξυλόλη (Scharlau)
- Αιθανόλη (Scharlau)
- Διάλυμα πλύσης TBS pH= 7.6
  - 50 mM Tris (Invitrogen)
  - 150 mM NaCl (Scharlau)
  - 1 mM EDTA (Scharlau)
- BSA (Sigma)
- 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Substrate reagent 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Thermo Scientific)
- Πρώτο αντίσωμα: anti-BMP-2 (sc-57040, Santa Cruz Biotechnology)
- Δεύτερο αντίσωμα: Goat anti-mouse HRP (Invitrogen)

#### B.1.9.3 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας

- Εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (2 φορές)
- Εμβάπτιση των τομών σε ισομοριακό μίγμα ξυλόλης/αλκοόλης για 2 λεπτά.
- Ενυδάτωση των τομών σε σειρά διαλυμάτων αλκοόλης ελατούμενης συγκέντρωσης (100%v/v, 90%v/v, 70%v/v ) για 2 λεπτά σε κάθε διάλυμα.
- Τοποθέτηση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS buffer για 5 λεπτά
- Προσθήκη στα πλακάκια με τις τομές διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) με σκοπό την αναστολή της ενεργότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης των κυττάρων. Τα πλακάκια παραμένουν σ' αυτό το διάλυμα για 5 λεπτά και σε

σκοτεινό μέρος, για να αποφευχθεί η διάσπαση του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και  $O_2$  με την επίδραση του φωτός.

- Ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBS για 5 λεπτά
- Επώαση των τομών με το διάλυμα Protein-Blocking Agent (2%BSA in TBS) για 30 λεπτά
- Ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBS για 1 λεπτά (τρεις φορές)
- Επώαση των τομών με το πρωτογενές αντίσωμα (αραίωση 1:20) σε 2%BSA in TBS ολονυκτία στους 4°C
- Ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBS για 1 λεπτά (τρεις φορές)
- Επώαση των τομών με το δευτερογενές αντίσωμα (αραίωση 1:250) σε 2%BSA in TBS για 60 λεπτά
- Ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBS για 1 λεπτά (τρεις φορές)
- Τοποθέτηση διαλύματος 2% DAB σε κάθε τομή για 10 λεπτά
- Ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBS για 1 λεπτά (τρεις φορές)
- Αφυδάτωση των τομών σε σειρά διαλυμάτων αλκοόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης (70%v/v , 90%v/v, 100%v/v) για 2 λεπτά σε κάθε διάλυμα.
- Εμβάπτιση των τομών σε ισομοριακό μίγμα ξυλόλης/αλκοόλης για 2 λεπτά.
- Εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (2 φορές)
- Μετά το πέρας των διαδοχικών εμβαπτίσεων, σε κάθε πλακάκι τοποθετείται από μια καλυπτρίδα.
- Τέλος ακολουθεί παρατήρηση των τομών σε οπτικό μικροσκόπιο και εξαγωγή συμπερασμάτων.



### **B.1.10 Επίδρασεις με BMP-2 και LiCl σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων**

#### B.1.10.1 Επίδραση με BMP-2 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και οστεοαρθριτικών χονδροκυττάρων

Φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα αφού καλλιεργήθηκαν με τη διαδικασία που αναλύθηκε προηγουμένως, τοποθετήθηκαν σε ειδικές πλάκες με 6 πηγαδάκια (six-well plate). Όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 70-80% του χώρου, έγινε επίδραση με 50 ng/ml BMP-2 για 12, 24 και 48 ώρες. Το πείραμα για κάθε δείγμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Μετά το πέρας του χρόνου των επιδράσεων, τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA και πρωτεϊνών, ακολουθώντας τις διαδικασίες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Επίσης, κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως υλικό για τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης που περιγράφεται παρακάτω.

#### B.1.10.2 Επίδραση με LiCl σε καλλιέργειες φυσιολογικών και οστεοαρθριτικών χονδροκυττάρων

Φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα τοποθετήθηκαν σε ειδικές πλάκες με 6 πηγαδάκια (six-well plate). Όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 70-80% του χώρου, έγινε επίδραση με 20 mM LiCl για 12, 24 και 48 ώρες. Η πειραματική διαδικασία για κάθε δείγμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Μετά το πέρας του χρόνου των επιδράσεων, τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA και πρωτεϊνών, ακολουθώντας τις διαδικασίες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Επίσης, κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως υλικό για τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης που περιγράφεται παρακάτω.

### **B.1.11 Ανοσοκατακρήμιση της χρωματίνης**

Ο προσδιορισμός των μεταγραφικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τους υποκινητές των υπό μελέτη γονιδίων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του kit ανοσοκατακρήμισης της χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay kit) (Upstate USA).

Με τη συγκεκριμένη δοκιμασία, τα κύτταρα μονιμοποιούνται έτσι ώστε οι μεταγραφικοί παράγοντες να παραμείνουν προσκολλημένοι στον υποκινητή. Τα κύτταρα υφίστανται λύση, το DNA τους κόβεται σε τμήματα των 200-1000 βάσεων, στη συνέχεια πραγματοποιείται κατακρήμιση των μεταγραφικών παραγόντων με τα αντίστοιχα αντισώματα, απομόνωση DNA στα δείγματα και έλεγχος της παρουσίας ή μη του τμήματος του υποκινητή με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και τη χρήση κατάλληλων υποκινητών.

#### **B.1.11.1 Πρωτόκολλο Ανοσοκατακρήμισης της χρωματίνης (ChIP)**

- Αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα με τη βοήθεια θρυψίνης και προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού για αν σταματήσει η δράση της
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2000 στροφές για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση υπερκείμενου, επαναδιάλυση των κυττάρων σε 10 ml προθερμασμένο στους 37°C πλήρες θρεπτικό υλικό και προσθήκη 270μl φορμαλδεΐδης 37%.
- Τοποθέτηση των σωληνάρων στους 37°C για 10 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η μονιμοποίηση των κυττάρων και η μονιμοποίηση των ιστονών και των υπόλοιπων μεταγραφικών παραγόντων στο DNA.

- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2000 στροφές για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και ξέπλυμα των κυττάρων 2 φορές με παγωμένο PBS που περιέχει αναστολείς πρωτεασών. Οι αναστολείς των πρωτεασών προστίθενται στο PBS λίγο πριν από τη χρησιμοποίηση του διαλύματος για το ξέπλυμα των κυττάρων, καθώς η διάρκεια ημίσειας ζωής τους είναι περίπου 30 λεπτά μέσα σε υδατικά διαλύματα. Ως αναστολείς πρωτεασών χρησιμοποιούνται οι : PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) σε συγκέντρωση 1mM, aprotinin σε συγκέντρωση 1μg/ml και pepstatin A σε συγκέντρωση 1μg/ml. Τα πλυσίματα των κυττάρων συνοδεύονται από φυγοκεντρήσεις των 800 στροφών για 5 λεπτά.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 200μl ζεστού διαλύματος λύσης των κυττάρων που περιέχει SDS
- Επώαση στον πάγο για 10 λεπτά. Μετά από το στάδιο αυτό, τα δείγματα μπορούν να τοποθετηθούν στους -80°C και να αποθηκευτούν εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.
- Κατάτμηση του DNA με τη χρήση υπερήχων. Χρησιμοποιείται για το λόγο αυτό συσκευή παραγωγής υπερήχων (UP50H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Germany). Ανάλογα με τις δυνατότητες της συσκευής, διαφέρει ο αριθμός των επαναλήψεων καθώς και η ένταση των υπερήχων και η διάρκεια της επίδρασης. Αυτό το στάδιο χρήζει ιδιαίτερης προσοχής και πρέπει να επαναπροσδιορίζεται για τον κάθε τύπο κυττάρων. Για το λόγο αυτό, για την κάθε κυτταρική σειρά ή δείγμα, χρειάστηκε να γίνει έλεγχος της αποτελεσματικότητας και επαναληψιμότητας της μεθόδου κατάτμησης του DNA με την εφαρμογή

υπερήχων, ώστε μετά από απομόνωση του DNA με τη μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου (η οποία περιγράφεται πιο κάτω) και μετά από ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης 1%, το DNA έχει κοπεί σε τμήματα των 200-1000 βάσεων. Η εφαρμογή των υπερήχων στα δείγματα, προκαλεί θέρμανση αυτών, για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η διατήρηση των δειγμάτων στον πάγο καθόλη τη διάρκεια της επίδρασης των υπερήχων. Για τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, ένα σύνηθες πρωτόκολλο υπερήχων που εφαρμόστηκε ήταν 15 επαναλήψεις διάρκειας 15 δευτερολέπτων.

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13000 στροφές σε θερμοκρασία 4 °C
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο των 2 ml
- Προσθήκη 75 μl Protein A Agarose/ DNA σπέρματος σολωμού (50% Slurry) και μεταφορά των δειγμάτων στους 4 °C, με ήπια ανάδευση για 30 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 1000 στροφές για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο των 2 ml
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αντισώματος σε κάθε δείγμα και ολονύκτια επώαση στους 4°C με ήπια ανάδευση.
- Προσθήκη 60 μl Protein A Agarose/ DNA σπέρματος σολωμού (50% Slurry) σε κάθε δείγμα και επώαση για μία ώρα στους 4 °C με ήπια ανάδευση ώστε να δημιουργηθούν σύμπλοκα αντισωμάτων και πρωτεϊνών.
- Φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 1 λεπτό και αφαίρεση υπερκειμένου, το οποίο περιέχει μη συνδεδεμένο, μη ειδικό DNA, απομακρύνεται προσεκτικά.

- Διαδοχικά ξεπλύματα του συμπλόκου πρωτεΐνης A αγαρόζης /αντισώματος /μεταγραφικού παράγοντα για 3 λεπτά με ήπια ανάδευση με 1 ml με τα ακόλουθα διαλύματα:
  - Διάλυμα έκπλυσης του συμπλόκου του αντισώματος χαμηλής περιεκτικότητας σε άλατα
  - Διάλυμα έκπλυσης του συμπλόκου του αντισώματος υψηλής περιεκτικότητας σε άλατα
  - Διάλυμα έκπλυσης του συμπλόκου του αντισώματος LiCl
  - Ρυθμιστικό διάλυμα TE, 2 πλυσίματα
- Φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 1 λεπτό, αφαίρεση ρυθμιστικού διαλύματος TE και προσθήκη 250 μl από το διάλυμα αποδέσμευσης
- Ανάδευση για μερικά δευτερόλεπτα σε vortex και επώαση για 15 λεπτά με κυκλική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 1 λεπτό, μεταφορά υπερκειμένου σε νέο φιαλίδιο. Η διαδικασία της αποδέσμευσης επαναλαμβάνεται και τα υπερκείμενα ενώνονται σε κοινό φιαλίδιο σε τελικό όγκο 500 μl.
- Προσθήκη 20 μl 5M NaCl σε κάθε δείγμα και επώαση στους 65°C για 4 ώρες με στόχο την αποδέσμευση του DNA από τις ιστόνες ή τους μεταγραφικούς παράγοντες. Σε αυτό το στάδιο, μετά την επώαση, τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C.
- Προσθήκη προστίθενται 10 μl 0.5M EDTA, 20μl 1M Tris-HCl και 2μl πρωτεϊνάσης K με συγκέντρωση 10 mg/ml σε κάθε δείγμα και επακολουθεί επώαση για μία ώρα στους 45°C.

#### B.1.11.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA

Η απομόνωση του κατακρημνισμένου DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο φαινόλης χλωροφορμίου, η οποία περιγράφεται στη συνέχεια :

- Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης και ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση σε vortex.
- Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο
- Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης-χλωροφορμίου και ακολουθεί καλή ανάδευση σε vortex.
- Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο
- Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και ακολουθεί καλή ανάδευση σε vortex.
- Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο
- Προσθήκη διπλάσιου όγκου παγωμένης αιθανόλης 100% σε κάθε δείγμα
- Τοποθέτηση δειγμάτων στους -20°C για τουλάχιστον 24 ώρες.
- Την επόμενη ημέρα, φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C Αμέσως μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο των φιαλιδίων απομακρύνεται και στα φιαλίδια απομένει μικρό λευκό ίζημα.
- Προσθήκη 1 ml αιθανόλης 70%, για ξέπλυμα του DNA και φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C.
- Αφαίρεση υπερκειμένου και τοποθέτηση των δειγμάτων στους 4°C, μέχρι να εξατμιστεί εντελώς η εναπομείνουσα αιθανόλη.
- Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O για τη διαλυτοποίηση του DNA, σε ποσότητα ανάλογη με την ποσότητα του ιζήματος.

Για να ελεγχθεί η ποσότητα του DNA πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε κάθε δείγμα. Αραιώσεις κάθε δείγματος (1:100) φωτομετρούνται στα 260 και 280 nm. Υπολογίζεται ο λόγος 260/280 καθώς και η συγκέντρωση του DNA ως εξής:

- συγκέντρωση RNA = αραιώση x OD<sub>260</sub> x 50 (mgr/ml)
- Για να ελεγχθεί η ποιότητα του DNA πραγματοποιείται σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε ηλεκτική αραρόζης 1%.

Στα δείγματα επακολουθεί αντίδραση PCR για τους υποκινητές των γονιδίων. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης επιλέχθηκαν έτσι ώστε να περικλείουν τις περιοχές πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων που μελετήθηκαν και φαίνονται στον πίνακα 4.

Για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, χρησιμοποιήθηκε το kit Hotstar Taq

Υποκινητής	Αλληλουχία Forward εκκινητή	Αλληλουχία Reverse εκκινητή
------------	-----------------------------	-----------------------------

της εταιρείας Qiagen. Συγκεκριμένα για το κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν :

- 12,5 μl Hotstar Taq Master Mix
- 7,5 μl δις απεσταγμένο νερό
- 1 μl Forward primer

<b>MMP-13</b>	GGACGGTGGTCAAGAACATT	GGCTAGCACAAACAGGGATT
<b>MMP-9</b>	TAAGACATTTGCCCGAGGTC	CTCCCTGACAGCCTTCTTTG
<b>MMP-14</b>	TCTCCACACTTTTCCTGCT	AAGAAGGGATTGGGAGTTGG
<b>ADAMTS-5</b>	TTTCTCCCTTCCTCCTGGT	TCAGCAAATACGGGAAAAGG
<b>COL10A1</b>	GGAATTGTCCTCCTCAACCA	CACTTTCCTCAAAGGTGGA
<b>LRP-5</b>	GTTCCAGAGCCCTTCTGT	CCGGACACTTGTTCACCT
<b>AXIN-2</b>	CTGTCCCTTTAAGGCGGG	CTTTACAGCAGGGCCTTC
<b>Osteocalcin</b>	CCCCGCTCCTCTTTAGACT	GTCTGATTGTGGCTCACCT

- 1 µl Reverse primer
- 3 µl από το DNA

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- Αρχική αποδιάταξη 95°C για 5 λεπτά
- 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
  - αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
  - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 58-65°C για 30 δευτερόλεπτα
  - επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα.

*Πίνακας 4: Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τη μέθοδο CHIP*

## **B.1.12 Αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων με τη χρήση των μικρών παρεμβατικών μορίων RNA (siRNAs και microRNAs)**

### **B.1.12.1 Γενικές αρχές της μεθόδου αποσιώπησης γονιδίων**



Η τεχνολογία των μικρών παρεμβατικών μορίων RNA αποτελεί μια νέα προσέγγιση που στοχεύει στην επιλεκτική αναστολή της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην εκδήλωση των νοσημάτων. Συγκεκριμένα, τεχνητά μόρια siRNA, αλληλουχίας μήκους 19-21 νουκλεοτιδίων συμπληρωματικά με τα mRNA των υπό διερεύνηση γονιδίων μεταφέρονται στο εσωτερικό των κυττάρων και συνδέονται με τα μόρια του mRNA των γονιδίων στόχων, με αποτέλεσμα την αποδόμηση τους και την μείωση της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η επιμόλυνση των κυττάρων με εξωγενή μόρια siRNAs γίνεται με βοήθεια κατάλληλων φορέων (π.χ. πλασμίδια) ή λιποσωμάτων. Στην παρούσα εργασία ως μόρια μεταφοράς του siRNA χρησιμοποιήθηκε η λιποφεκταμίνη. Η λιποφεκταμίνη είναι μία λιπιδιακή κατιονική δομή που προσφέρει υψηλή αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Μετά τη σύνδεση της με το siRNA, εισέρχεται με ενδοκύτωση στο εσωτερικό των κυττάρων και καταστέλλει τη δράση του μορίου στόχου.

Επιπρόσθετα, αναστολή της έκφρασης γονιδίων πραγματοποιήθηκε και με τη χρήση microRNAs. Τα microRNA είναι αλληλουχίες μήκους 21-23 νουκλεοτιδίων, συμπληρωματικά με περισσότερα του ενός mRNA γονιδίων, και δρουν ως αρνητικοί μετα-μεταγραφικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. Τα microRNAs πλην του φυσιολογικού τους ρόλου στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, έχει αποδειχθεί ότι συνδέονται με την εκδήλωση διαφόρων ασθενειών, μέσω τροποποίησης της έκφρασης γονιδίων στόχων. Στην παρούσα διατριβή η αναστολή της έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων πραγματοποιήθηκε με την χρήση κατάλληλων μορίων microRNAs, με σκοπό τη ταυτοποίηση των μοριακών μονοπατιών που ενέχονται στην διαδικασία υπερτροφίας των χονδροκυττάρων στην οστεοαρθρίτιδα, δίνοντας το έναυσμα για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Να τονιστεί ότι **κάθε δείγμα** στο οποίο πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση

της γονιδιακής έκφραση μελετήθηκε **εις διπλούν** (για την επαναληψιμότητα της μεθόδου).

#### B.1.12.2 Υλικά αποσιώπησης των γονιδίων LRP-5 και LEF-1

- Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)
- Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen)
- siRNA LRP-5 (Ambion Applied Biosystems)

**sense:** 5' CGCAGUAGACCGAUUAUAUtt 3'

**antisense:** 5' AUAUAAUCGCUGUACUGCG tc 3'

- siRNA LEF-1 (Invitrogen)

**sense:** 5' UCCUCACUGUCAGUCGACACUCCA 3'

**antisense:** 5' UGGAAGUGUCGACUGACAGUGAGGA 3'

- microRNA 140 (Qiagen) 5 CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG 3'

#### B.1.12.3 Πρωτόκολλο αποσιώπησης γονιδίων με siRNA

Μία ημέρα πριν γίνει η επιμόλυνση των χονδροκυττάρων με siRNA κατά του LRP-5 ή LEF-1 τα κύτταρα μεταφέρονται σε πλάκα με 6 πηγαδάκια και προστίθενται 2ml θρεπτικού υλικού DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων σε στείρες συνθήκες σε κλίβανο για 24 ώρες (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Τα κύτταρα πρέπει να καλύπτουν το 30-50% της επιφάνειας των πηγαδιών την στιγμή της επιμόλυνσης. Τα κύτταρα από τα τρία πηγαδάκια χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα ελέγχου (δεν προστέθηκε ποσότητα siRNA), ενώ στα υπόλοιπα τρία πηγαδάκια έγινε επιμόλυνση των κυττάρων για την αποσιώπηση του γονιδίου. Η συγκέντρωση του siRNA και της λιποφεκταμίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100 pmol/ml.

Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για την επιμόλυνση κάθε πηγαδιού ήταν η εξής:

- Προσθήκη 5 μl λιποφεκταμίνης σε 495 μl Opti-MEM I Reduced Serum Medium. Καλή ανάδευση
- Προσθήκη 5 μl siRNA σε 495 μl Opti-MEM I Reduced Serum Medium. Καλή ανάδευση
- Επώαση των δύο παραπάνω διαλυμάτων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Ανάμειξη του διαλύματος της λιποφεκταμίνης με αυτό του siRNA. Καλή ανάδευση
- Επώαση του μίγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από τα πηγαδάκια και ξέπλυμα με PBS (δύο φορές)
- Μεταφορά 1 ml σε κάθε πηγαδάκι του μίγματος λιποφεκταμίνη /siRNA
- Προσθήκη 1,5 ml Opti-MEM I Reduced Serum Medium (στα πηγαδάκια που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου προστέθηκε μόνο 2,5 ml Opti-MEM I Reduced Serum Medium)
- Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο για 4 ώρες
- Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού με το siRNA και προσθήκη 2 ml θρεπτικού υλικού DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά.

Μετά από τις 24 ώρες το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και προστέθηκε καινούριο θρεπτικό υλικό με 50 ng/ml BMP-2 στις καλλιέργειες που έγινε αποσιώπηση του γονιδίου LRP-5 ή 20 mM LiCl στις καλλιέργειες που έγινε αποσιώπηση του γονιδίου LEF-1. Τα κύτταρα επώαστηκαν στον κλίβανο για 48 ώρες και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την απομόνωση RNA όσο και για την απομόνωση πρωτεϊνών με τις διαδικασίες που αναλύθηκαν παραπάνω.

#### B.1.12.4 Πρωτόκολλο αποσιώπησης γονιδίων με microRNAs

Μία ημέρα πριν γίνει η επιμόλυνση των χονδροκυττάρων με το miR-140 τα κύτταρα μεταφέρονται σε πλάκα με 6 πηγαδάκια και προστίθενται 2ml θρεπτικού υλικού DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων σε στείρες συνθήκες σε κλίβανο για 24 ώρες (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Τα κύτταρα από τα τρία πηγαδάκια χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα ελέγχου (δεν προστέθηκε ποσότητα microRNA), ενώ στα υπόλοιπα τρία πηγαδάκια έγινε επιμόλυνση των κυττάρων για την αποσιώπηση του γονιδίου. Η συγκέντρωση του microRNA και της λιποφεκταμίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10, 20 και 30 nM.

Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για την επιμόλυνση κάθε πηγαδιού ήταν η εξής:

- Προσθήκη 3 μl λιποφεκταμίνης σε 497 μl DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Καλή ανάδευση
- Προσθήκη 3 μl microRNA σε 497 μl DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Καλή ανάδευση
- Επώαση των δύο παραπάνω διαλυμάτων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Ανάμειξη του διαλύματος της λιποφεκταμίνης με αυτό του microRNA. Καλή ανάδευση
- Επώαση του μίγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από τα πηγαδάκια και ξέπλυμα με PBS (δύο φορές)
- Μεταφορά 1 ml σε κάθε πηγαδάκι του μίγματος λιποφεκταμίνη / microRNA

- Προσθήκη 1,5 ml DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά (στα πηγαδάκια που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου προστέθηκε μόνο 2,5 ml DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά)
- Τα κύτταρα επώαστηκαν στον κλίβανο για 24 ώρες και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την απομόνωση RNA όσο και για την απομόνωση πρωτεϊνών με τις διαδικασίες που αναλύθηκαν παραπάνω.

### **B.1.13. Ανάλυση των υποκινητών των γονιδίων και της 3' αμετάφραστης περιοχής των mRNAs με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής**

Με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος CHIP Bioinformatics Tools πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των υποκινητών των γονιδίων της MMP-7, 9, 13, 14, ADAMTS-5, 4 και COL10A1 για την ύπαρξη θέσεων σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα LEF-1(5'-CTTTGWW-3') όπως επίσης και του υποκινητή του γονιδίου LRP-5 για θέσεις σύνδεσης των μεταγραφικών παραγόντων Smad (5'-GCCGnGCG-3'). Η περιοχή του γονιδίου που αναλύθηκε ήταν μεταξύ 1500 ζευγών βάσεων πριν το κωδικόνιο έναρξης και 100 ζευγών βάσεων μετά από αυτό.

Επίσης, η ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της BMP-2 για την εύρεση λειτουργικών θέσεων σύνδεσης του miR-140 έγινε με τη χρήση 4 διαφορετικών υπολογιστικών προγραμμάτων (miRanda, miRDB, TargetScan, και Diana-microT), προκειμένου να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.

### **B.1.14 Στατιστική ανάλυση**

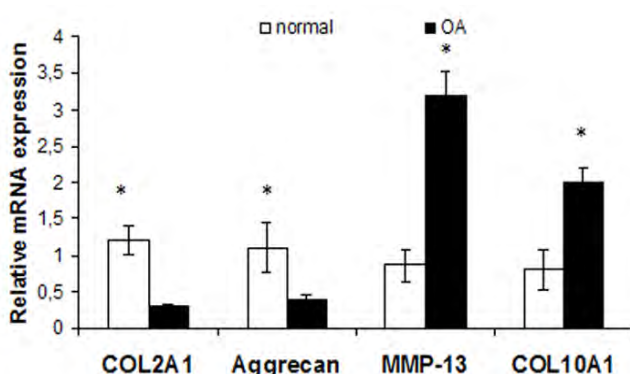
Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 20 και αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες

δοκιμασίες: independent-samples T-test, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney 2-tailed U test, ANOVA (analysis of variance) με Tukey's Honestly Significant Different (HSD) ως post hoc test. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή  $p < 0.05$  και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με την τυπική απόκλιση (mean + standard deviation, SD).

## B.2 Αποτελέσματα

### B.2.1 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων COL2A1, COL10A1, αγκρεκάνη και MMP-13 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων

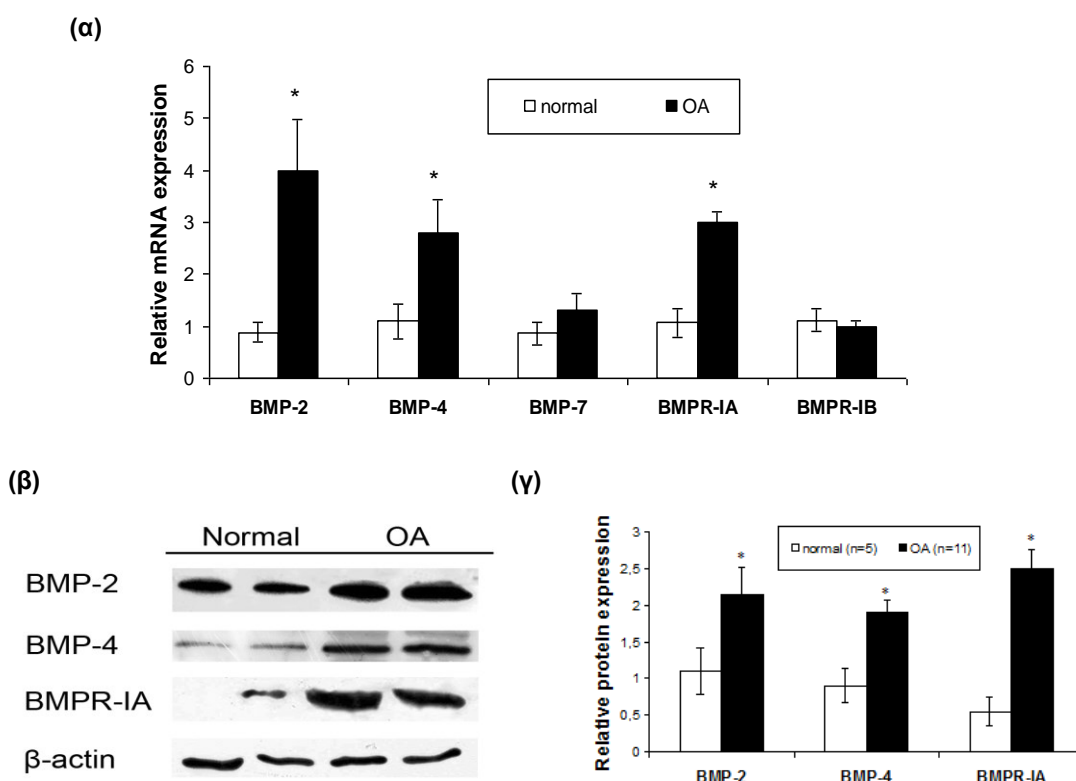
Αρχικά προσδιορίστηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης τεσσάρων γονιδίων COL2A1, COL10A1, αγκρεκάνη και MMP-13 που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων και αποτελούν μοριακούς δείκτες για τη μετατροπή των φυσιολογικών χονδροκυττάρων σε οστεοαρθρικά. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων COL2A1 και αγκρεκάνης σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα OA χονδροκύτταρα ( $p < 0.05$ ). Αντίθετα, τα μεταγραφικά επίπεδα του βασικού καταβολικού ενζύμου της εξωκυττάριας ουσίας, MMP-13, και του δείκτη υπερτροφίας, COL10A1, ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου ( $p < 0.05$ ) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Απεικόνιση των επιπέδων mRNA των γονιδίων COL2A1, COL10A1, αγκρεκάνη και MMP-13 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων. \* $p < 0.05$ .

### B.2.2 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων της BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMPR-IA και BMPR-IB σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των BMPs στην ΟΑ, προσδιορίστηκε η έκφραση των συνδετών BMP-2, BMP-4 και BMP-7, και των υποδοχών τους, BMPR-IA και BMPR-IB, σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα. Παρατηρήθηκε αυξημένη μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση της BMP-2, BMP-4 και του BMPR-IA στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά ( $p < 0.05$ ) (Εικόνα 16α, β και γ). Η έκφραση της BMP-7 και του υποδοχέα BMPR-IB δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων (Εικόνα 16α).

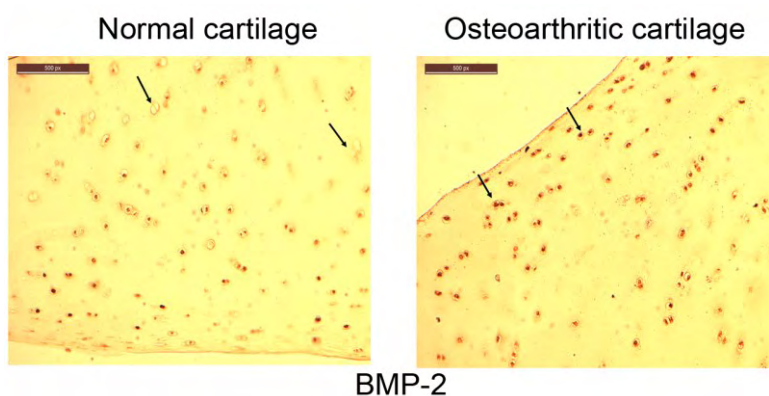


Εικόνα 16: (α) Απεικόνιση των επιπέδων mRNA των γονιδίων BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMPR-IA και BMPR-IB σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων. \* $p < 0.05$ . (β) Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των γονιδίων BMP-2, BMP-4, και BMPR-IA σε καλλιέργειες φυσιολογικών και



ΟΑ χονδροκυττάρων. (γ) Ποσοτική απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των γονιδίων BMP-2, BMP-4, και BMP-1A σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων. \* $p < 0.05$ .

Επιπρόσθετα με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας μελετήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση της BMP-2 στα ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν επιβεβαίωσαν την αυξημένη έκφραση της BMP-2 στα χονδροκύτταρα που προέρχονταν από χόνδρο με προχωρημένη ΟΑ συγκριτικά με τα φυσιολογικά (Εικόνα 17).

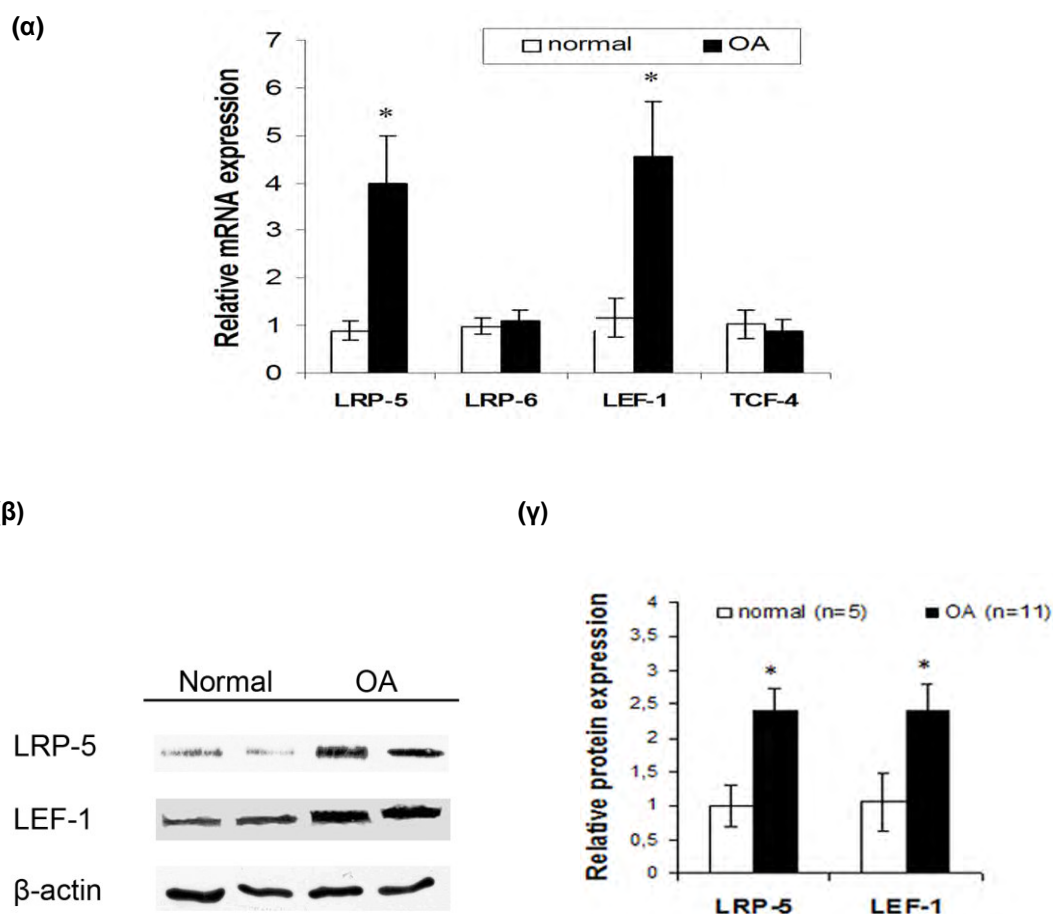


Εικόνα 17: Ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων της BMP-2 σε τομές φυσιολογικού και ΟΑ χόνδρου με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας.

### **Β.2.3 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων LRP-5, LRP-6, φωσφο-β-κατενίνη, LEF-1, και TCF-4 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων**

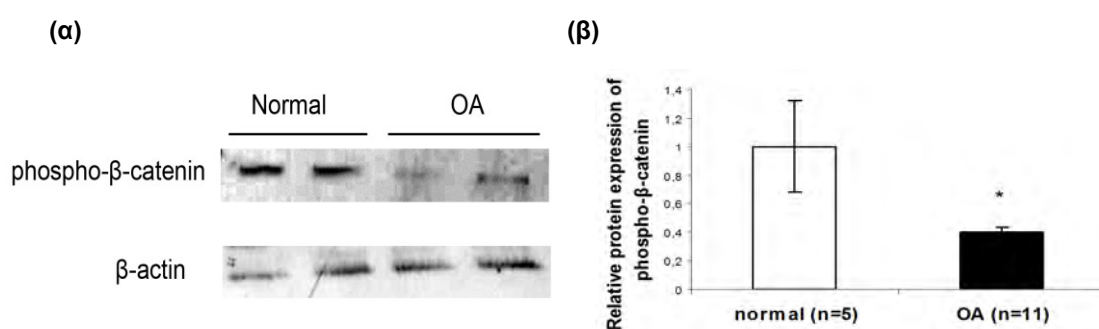
Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων, LRP-5, LRP-6, και των μεταγραφικών παραγόντων LEF-1, και TCF-4, που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι της β-κατενίνης στα ΟΑ και στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι τα ΟΑ χονδροκύτταρα εκφράζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα mRNA του LRP-5 και του LEF-1 σε σχέση με τα φυσιολογικά

( $p < 0.05$ ) (Εικόνα 18α). Η αύξηση της έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων επιβεβαιώθηκε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο με τη χρήση της μεθόδου Western blot (Εικόνα 18β και γ). Η έκφραση του υποδοχέα LRP-6 και του μεταγραφικού παράγοντα TCF-4 δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων (Εικόνα 18α).



Εικόνα 18: (α) Απεικόνιση των επιπέδων mRNA των γονιδίων LRP-5, LRP-6, LEF-1, και TCF-4 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων. \* $p < 0.05$ . (β) Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των γονιδίων LRP-5, και LEF-1 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων. (γ) Ποσοτική απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των γονιδίων LRP-5, και LEF-1 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων. \* $p < 0.05$ .

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αυξημένη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -κατενίνης στα OA χονδροκύτταρα, προσδιορίστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφραση της φωσφορυλιωμένης  $\beta$ -κατενίνης (φώσφο- $\beta$ -κατενίνη). Τα αποτελέσματα της μεθόδου Western blot έδειξαν μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της φωσφο- $\beta$ -κατενίνης στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά (Εικόνα 19α και β).

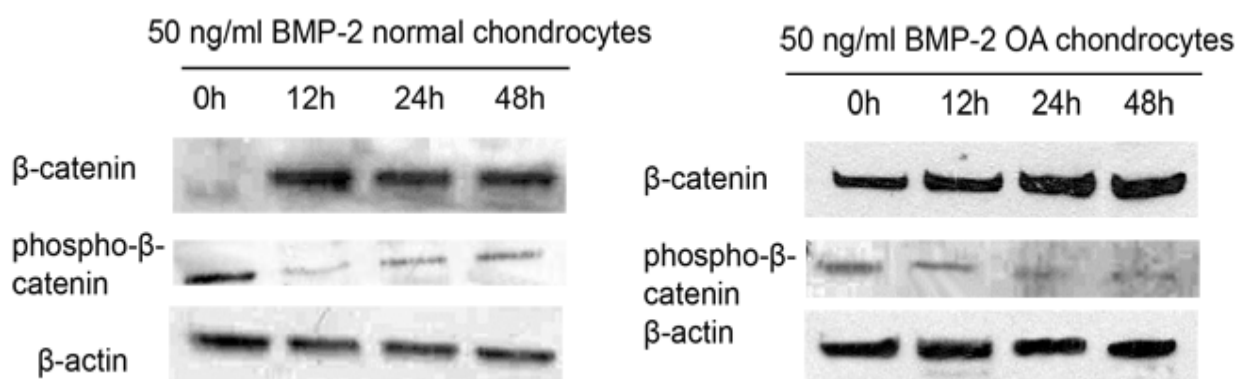


Εικόνα 19: (α) Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της φώσφο- $\beta$ -κατενίνης σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων. (β) Ποσοτική απεικόνιση των πρωτεϊνικών της φώσφο- $\beta$ -κατενίνης σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων. \* $p < 0.05$ .

#### **B.2.4 Προσδιορισμός της έκφρασης της $\beta$ -κατενίνης και της φωσφο- $\beta$ -κατενίνης σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με BMP-2**

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια της BMP-2 και της  $\beta$ -κατενίνης παίζουν κύριο ρόλο στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας. Προκειμένου να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση των παραπάνω μορίων έγινε επίδραση με 50 ng/ml BMP-2 για 12, 24 και 48 ώρες σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων και ακολούθησε προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της ενεργούς μορφής της  $\beta$ -

κατενίνης και της φώσφο-β-κατενίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η BMP-2 ενισχύει την έκφραση της ενεργής μορφής της β-κατενίνης τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε OA χονδροκύτταρα, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε μείωση των φωσφορικών επιπέδων της πρωτεΐνης της β-κατενίνης.



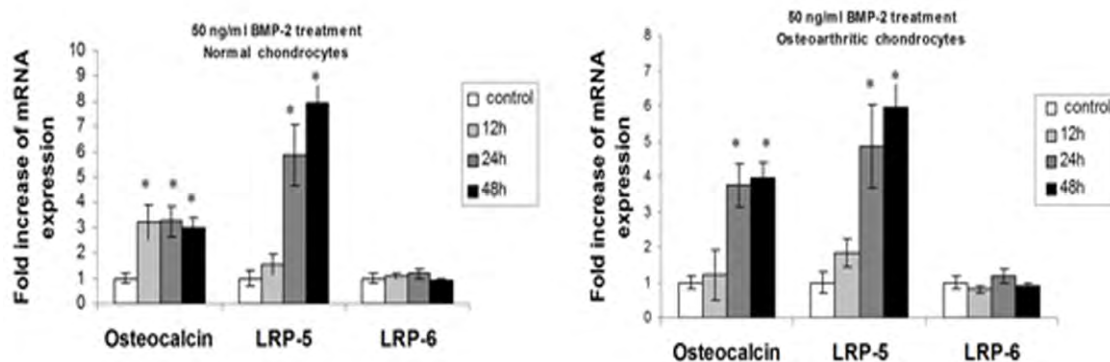
Εικόνα 20: Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της ενεργούς μορφής της β-κατενίνης και της φώσφο-β-κατενίνης σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με 50 ng/ml BMP-2 για 12, 24 και 48 ώρες.

### **B.2.5 Προσδιορισμός της έκφρασης του LRP-5 και LRP-6 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με BMP-2**

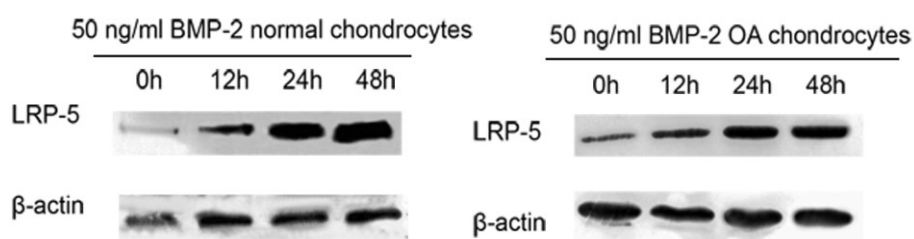
Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της BMP-2 στην έκφραση των υποδοχέων, LRP-5 και LRP-6, μέσω των οποίων ενεργοποιείται το μονοπάτι της β-κατενίνης. Παρατηρήθηκε ότι η BMP-2 προκαλεί σημαντική αύξηση της μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης του LRP-5 και συγκεκριμένα ότι η ενίσχυση της έκφρασης του συμβαίνει με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο καθώς τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν μετά από 48 ώρες χορήγησης της BMP-2 σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα ( $p < 0.05$ ) (Εικόνα 21α και β). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική

αλλαγή στα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα του LRP-6 μετά τη χορήγηση της BMP-2 (Εικόνα 21α).

(α)



(β)

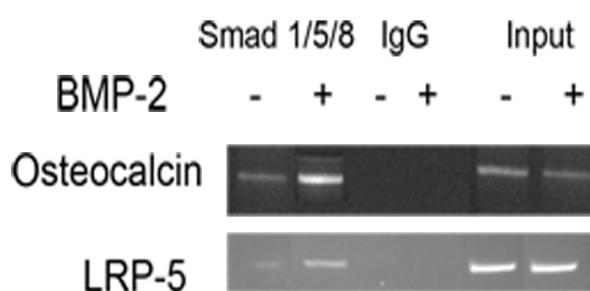


Εικόνα 21: (α) Απεικόνιση των επιπέδων mRNA των γονιδίων LRP-5 και LRP-6 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με 50 ng/ml BMP-2 για 12, 24 και 48 ώρες. \* $p < 0.05$ . (β) Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων του LRP-5 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με 50 ng/ml BMP-2 για 12, 24 και 48 ώρες.

## B.2.6 Ανάλυση του υποκινητή του γονιδίου *LRP-5* για την ύπαρξη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων *Smad 1/5/8*

Η διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού μέσω του οποίου η BMP-2 επάγει την έκφραση του LRP-5, πραγματοποιήθηκε μετά από ανάλυση του υποκινητή του γονιδίου

*LRP-5* για την ύπαρξη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων Smad 1/5/8. Σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με ειδικό αντίσωμα για το σύμπλοκο των μεταγραφικών παραγόντων Smad 1/5/8. Παρατηρήθηκε ότι στον υποκινητή του *LRP-5* υπάρχει τουλάχιστον μία θέση σύνδεσης των Smad 1/5/8 στην περιοχή -280 έως 270 από το κωδικόνιο έναρξης ATG. Επίσης, παρατηρήθηκε ενίσχυση της σύνδεσης των Smad 1/5/8 στον υποκινητή του *LRP-5* στα χονδροκύτταρα τα οποία υπέστησαν επίδραση με BMP-2 (Εικόνα 22). Για την αποτελεσματικότητα και εγκυρότητα της μεθόδου ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η οστεοκαλσίνη, ο υποκινητής της οποίας φέρει ειδικά στοιχεία πρόσδεσης των Smad 1/5/8.

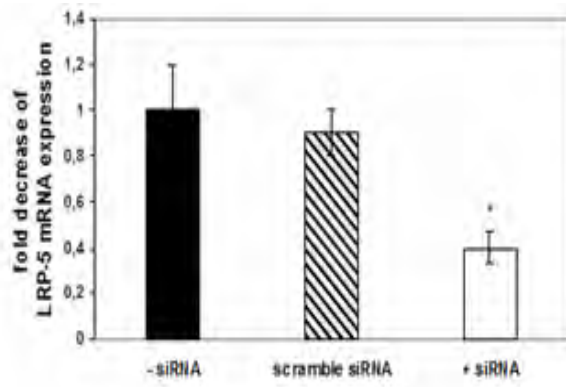


Εικόνα 22: Ανάλυση του υποκινητή του γονιδίου *LRP-5* για την ύπαρξη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων Smad 1/5/8. Ο υποκινητής της OC χρησιμοποιήθηκε ως θετικό control, ενώ ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε μη ειδικό αντίσωμα για τις ανοσοσφαιρίνες IgG.

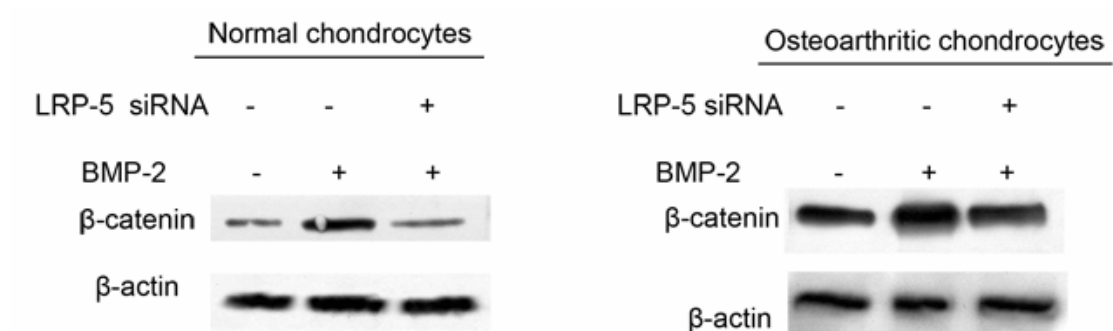
### **B.2.7 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης της β-κατενίνης και της φωσφο-β-κατενίνης σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με BMP-2 και ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου *LRP-5* με τη χρήση siRNA έναντι του *LRP-5***

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ενεργοποίηση της δράσης της β-κατενίνης από την BMP-2 μέσω της επαγωγής της έκφρασης του υποδοχέα LRP-5, πραγματοποιήθηκε αναστολή της έκφρασης του LRP-5 με τη τεχνολογία των siRNAs σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί BMP-2. Αρχικά επιβεβαιώθηκε η επιτυχία αναστολής του LRP-5 με έλεγχο της μεταγραφικής και πρωτεϊνικής του έκφρασης μόνο σε OA χονδροκύτταρα, καθώς εκεί παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του υποδοχέα. Η χρήση siRNA κατά του LRP-5 οδήγησε σε 60% μείωση των επιπέδων mRNA και 45% των πρωτεϊνικών επιπέδων του LRP-5 στα OA χονδροκύτταρα (Εικόνα 23α). Στη συνέχεια ακολούθησε προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της ενεργούς μορφής της β-κατενίνης αλλά και των φωσφορικών της επιπέδων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αναστολή της έκφρασης του LRP-5 μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ενεργούς μορφής της β-κατενίνης, τα οποία είχαν αυξηθεί με τη χορήγηση της BMP-2 τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα OA χονδροκύτταρα (Εικόνα 23β). Αντίθετα, παρατηρήθηκε αύξηση των φωσφορικών επιπέδων της β-κατενίνης μετά από επίδραση με BMP-2 και ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου LRP-5 με τη χρήση siRNA συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασης της σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα που τους χορηγήθηκε μόνο BMP-2 (Εικόνα 23γ).

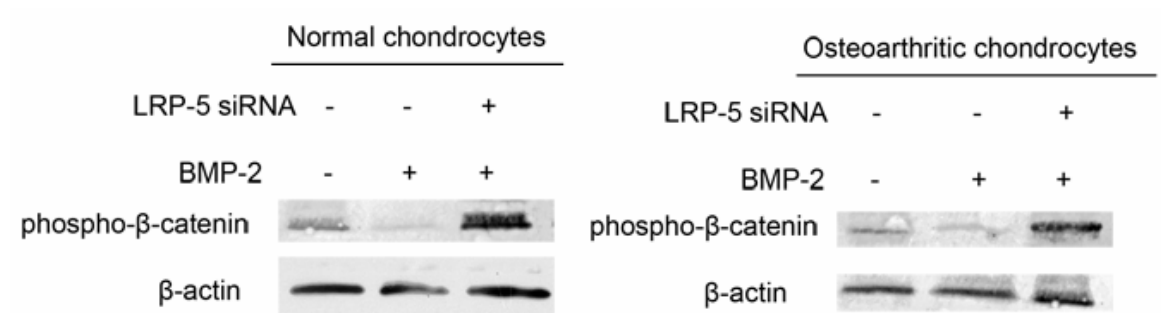
**(α)**



(β)



(γ)



Εικόνα 23: (α) Απεικόνιση των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων του γονιδίου LRP-5 σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με siRNA έναντι του LRP-5 για 24 ώρες. \* $p < 0.05$ . Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων (β) της ενεργούς μορφής της β-κατενίνης και (γ) της

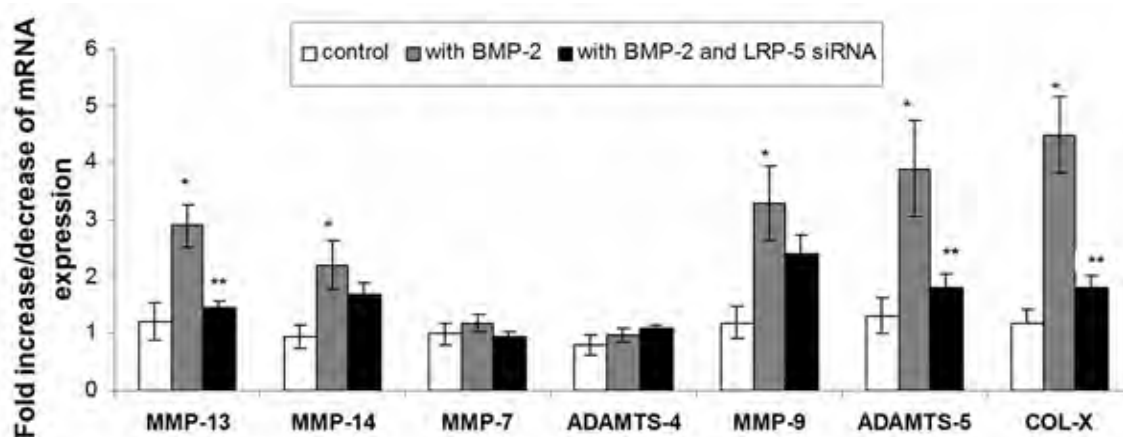


φωσφο-β-κατενίνης σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με 50 ng/ml BMP-2 και ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου LRP-5 με τη χρήση siRNA έναντι του LRP-5.

### **B.2.8 Προσδιορισμός της έκφρασης καταβολικών ενζύμων και υπερτροφικών παραγόντων σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με BMP-2 και ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου LRP-5 με τη χρήση siRNA έναντι του LRP-5**

Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης της BMP-2 και της β-κατενίνης στον οστεοαρθρικό φαινότυπο των χονδροκυττάρων μελετήθηκε μέσω προσδιορισμού της έκφρασης μεταλλοπρωτεϊνάσων (MMP-7, 9, 13, 14, ADAMTS-4 και 5) οι οποίες συμμετέχουν στην αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου αλλά και δεικτών υπερτροφίας όπως του κολλαγόνου τύπου X (COL10A1). Αρχικά σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων χορηγήθηκε 50 ng/ml BMP-2 για 48 ώρες και πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των μεταγραφικών επιπέδων των ανωτέρω γονιδίων. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων της MMP-9, 13, 14, ADAMTS-5 και COL10A1 σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα που χορηγήθηκε BMP-2 συγκριτικά με αυτά που δεν υπέστησαν τη δράση της ( $p < 0.05$ ). Στη συνέχεια για να μελετηθεί αν η αύξηση της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων από την BMP-2 επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των επιπέδων mRNA των ανωτέρω χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με BMP-2 και ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου LRP-5 με τη χρήση siRNA έναντι του LRP-5. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων της MMP-9, 13, 14, ADAMTS-5 και COL10A1 που

επιτυγχάνεται μετά τη χορήγηση της BMP-2 αναστέλλεται μέσω της αποσιώπησης του γονιδίου LRP-5 με τη χρήση siRNA στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα ( $p < 0.05$ ) (Εικόνα 24).

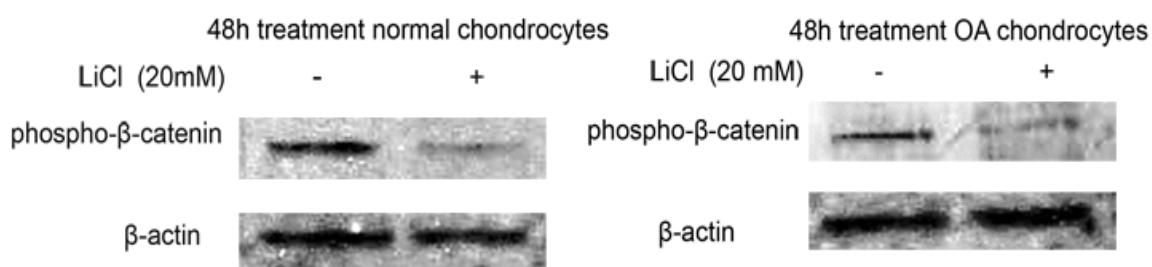


Εικόνα 24: Απεικόνιση των επιπέδων mRNA των γονιδίων MMP-7, 9, 13, 14, ADAMTS-4 και 5 και COL10A1 μετά από επίδραση με 50 ng/ml BMP-2 και ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου LRP-5 με τη χρήση siRNA έναντι του LRP-5 σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων.

### **B.2.9 Προσδιορισμός της έκφρασης καταβολικών ενζύμων και υπερτροφικών παραγόντων σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με LiCl και ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου LEF-1 με τη χρήση siRNA έναντι του LEF-1.**

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η BMP-2 μέσω της επαγωγής της έκφρασης του υποδόχεια της β-κατενίνης, LRP-5, ενισχύει την καταβολική δράση των χονδροκυττάρων και την διαφοροποίησή τους σε υπερτροφικά. Προκειμένου να διερευνηθεί η άμεση επαγωγή της έκφρασης των καταβολικών ενζύμων (MMP-7, 9, 13, 14, ADAMTS-4 και 5) και του COL10A1, από τη δράση της β-κατενίνης, πραγματοποιήθηκε *in vitro* ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-

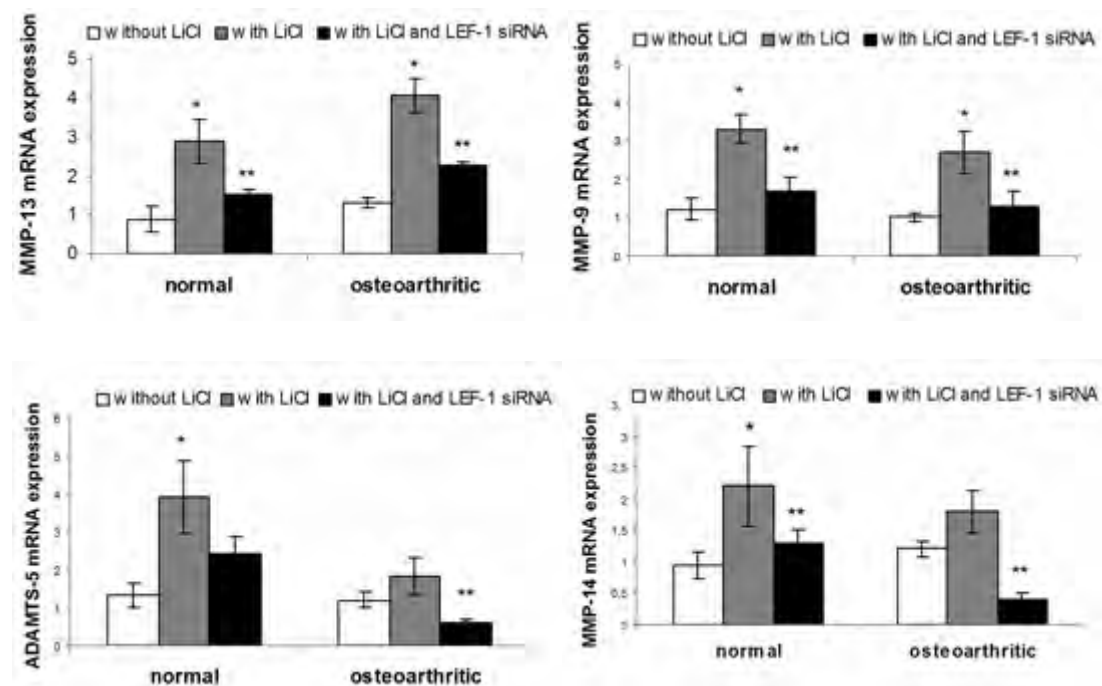
κατενίνης με τη χορήγηση LiCl σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων. Αρχικά, επιβεβαιώθηκε η ενεργοποίηση του μονοπατιού μέσω του προσδιορισμού των πρωτεϊνικών επιπέδων της φώσφο-β-κατενίνης, καθώς παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της στα φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα που υπέστησαν την επίδραση του LiCl (Εικόνα 25).

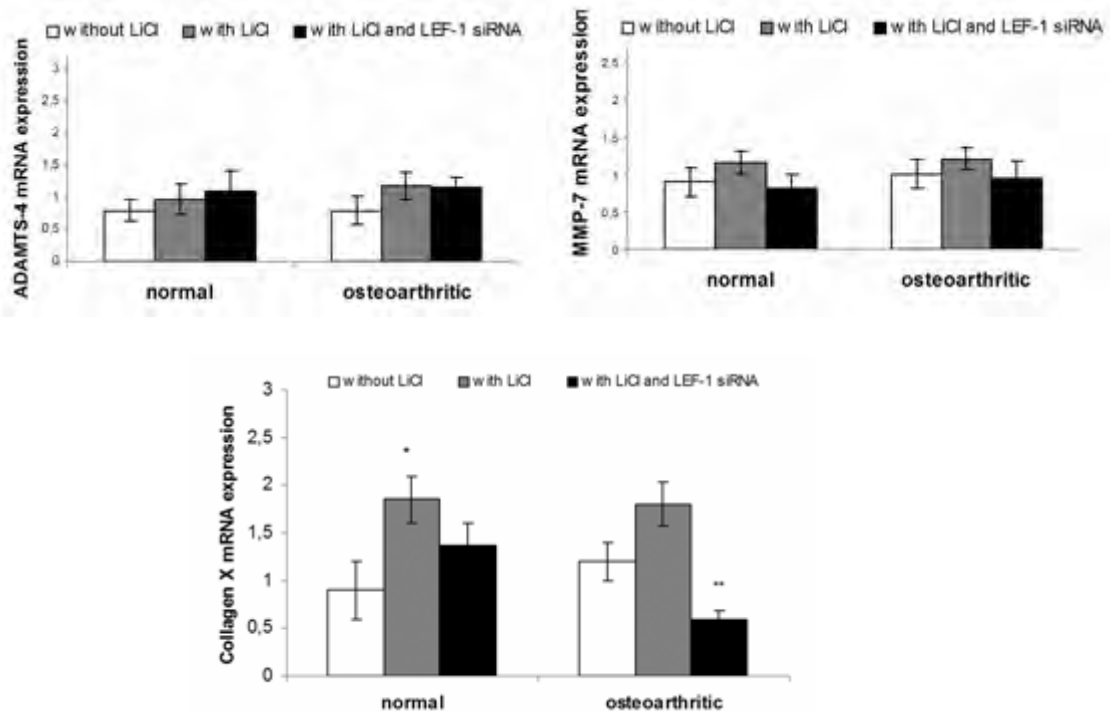


Εικόνα 25: Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της φωσφο-β-κατενίνης μετά από επίδραση με 20 mM LiCl για 48 ώρες σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων.

Στη συνέχεια ακολούθησε προσδιορισμός των επιπέδων mRNA των μεταλλαπρωτεϊνών (MMP-7, 9, 13, 14, ADAMTS-4 και 5) και του COL10A1 μετά τη χορήγηση LiCl σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων (Εικόνα 26). Παρατηρήθηκε ότι το LiCl αυξάνει την μεταγραφική έκφραση της MMP-13 και της MMP-9 στα φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα, ενώ τα επίπεδα mRNA της MMP-14, ADAMTS-5 και του COL10A1 αυξήθηκαν σημαντικά στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα αλλά όχι στα OA χονδροκύτταρα ( $p < 0.05$ ). Τέλος, σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων που είχε ήδη χορηγηθεί LiCl έγινε αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα LEF-1, μέσω του οποίου ασκεί τη δράση της η β-κατενίνη, και μελετήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των παραπάνω γονιδίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η αναστολή του LEF-

1 με siRNA μείωσε σημαντικά τα επίπεδα mRNA της MMP-13, 9 και 14 τα οποία αυξήθηκαν μετά τη χορήγηση του LiCl στα φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα ( $p < 0.05$ ). Αντίθετα, στατιστικά σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων της ADAMTS-5 και του COL10A1 παρατηρήθηκε μόνο στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα που υπέστησαν επίδραση με LiCl και ταυτόχρονα αποσιώπηση του LEF-1 με siRNA ( $p < 0.05$ ). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα mRNA της MMP-7 και 9 μετά από επίδραση με LiCl και ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου LEF-1 τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα OA χονδροκύτταρα.



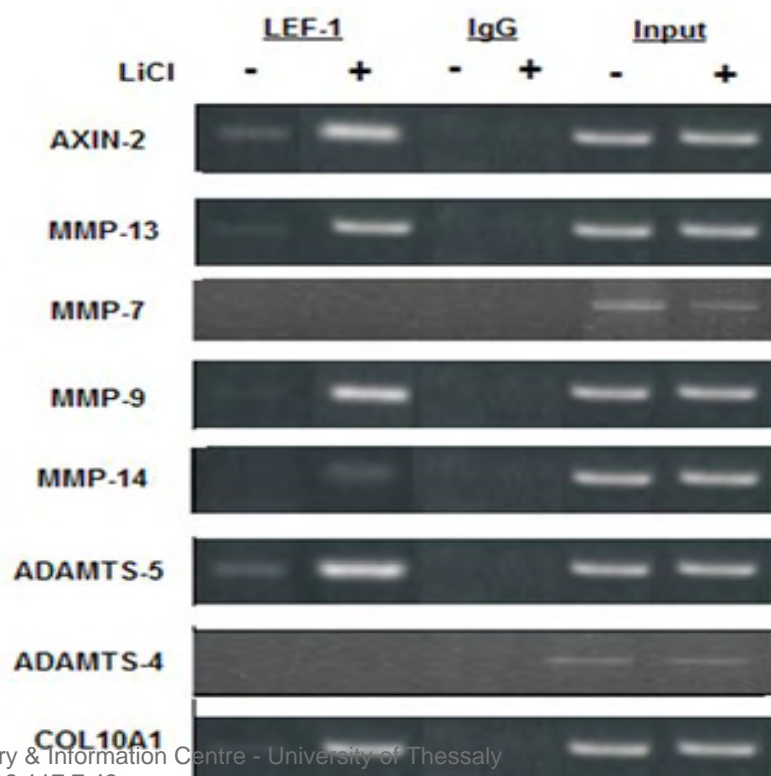


Εικόνα 26: Απεικόνιση των επιπέδων mRNA των γονιδίων MMP-13, 9, 7, 14, ADAMTS-4 και 5 και COL10A1 μετά από επίδραση με 20 mM LiCl και ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου LRP-5 με τη χρήση siRNA έναντι του LRP-5 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων.

### B.2.10 Ανάλυση του υποκινητή των γονιδίων MMP-7, 9, 13, 14, ADAMTS-5, 4 και COL10A1 για την ύπαρξη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του LEP-1

Η διερεύνηση για την ύπαρξη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα LEP-1 στον υποκινητή των γονιδίων *MMP-7, 9, 13, 14, ADAMTS-5, 4* και *COL10A1* έγινε με στόχο τη μελέτη της άμεσης επαγωγής της έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων του από την β-κατενίνη. Σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα που υπέστησαν επίδραση με LiCl για 24 ώρες εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με ειδικό αντίσωμα για τον LEP-1. Παρατηρήθηκε ότι στον υποκινητή των γονιδίων *MMP-9* (-737 έως -733 από το κωδικόνιο έναρξης ATG), *MMP-13* (-1142 έως -

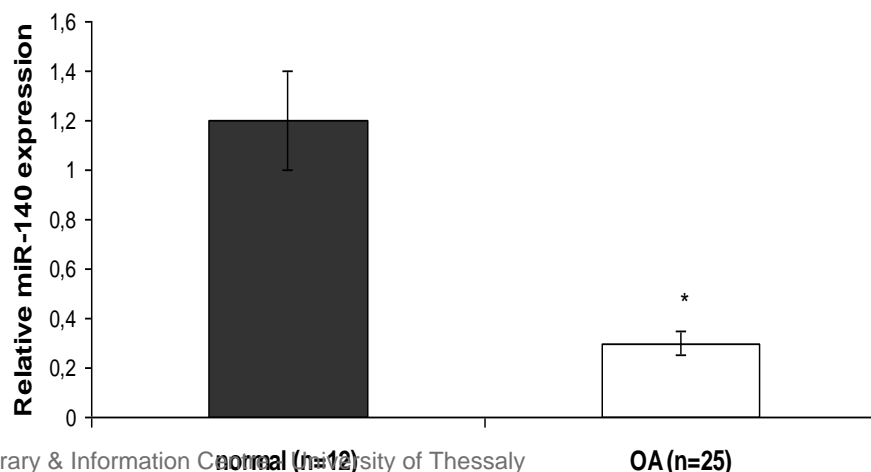
1138), *MMP-14* (-575 έως -571), *ADAMTS-5* (-755 έως -751), και *COL10A1* (-784 έως -781), υπάρχει θέση σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα LEF-1. Επίσης, παρατηρήθηκε αυξημένη σύνδεση του LEF-1 στον υποκινητή των ανωτέρω γονιδίων στα χονδροκύτταρα τα οποία υπέστησαν επίδραση με LiCl, καθώς το LiCl σταθεροποιεί την ενεργή μορφή της β-κατενίνης, ενισχύοντας τη σύνδεση του συμπλόκου β-κατενίνης/LEF-1 στις κατάλληλες θέσεις σύνδεσης στους υποκινητές των γονιδίων. Δεν παρατηρήθηκε θέση σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα LEF-1 στον υποκινητή των γονιδίων *MMP-7* και *ADAMTS-4* (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Ανάλυση του υποκινητή των γονιδίων MMP-7, 9, 13, 14, ADAMTS-5, 4 και COL10A1 για την ύπαρξη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του LEF-1 με την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης τα χρωματίνης (ChIP) σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Ως θετικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ο υποκινητής της Axin, ενώ ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε μη ειδικό αντίσωμα για τις ανοσοσφαιρίνες IgG.

### **B.2.11 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του miR-140 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων**

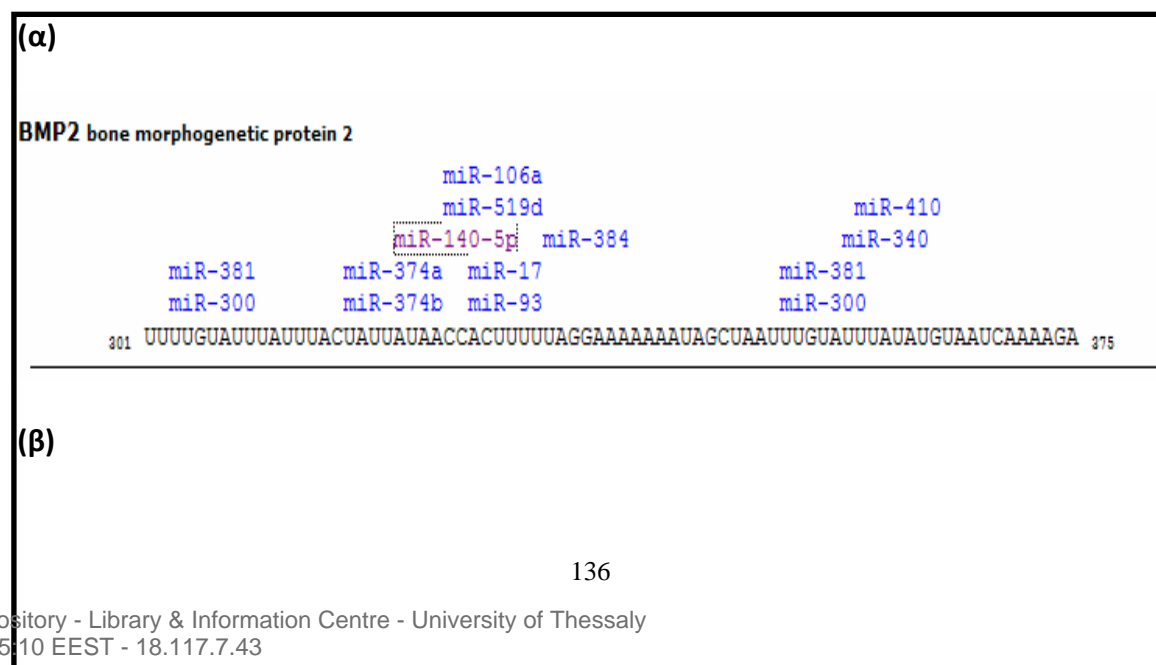
Το miR-140 παίζει καταλυτικό ρόλο στην ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου μέσω της ρύθμισης της έκφρασης μορίων που συμμετέχουν στη διαδικασία της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων και φαίνεται να εμπλέκεται και στην αιτιοπαθογένεια της OA. Αρχικά προσδιοριστήκαν τα επίπεδα έκφρασης του σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων. Τα αποτελέσματα μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του miR-140 με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, επιβεβαίωσαν τη σημαντική μείωση των επιπέδων του miR-140 στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα ( $p < 0.05$ ) (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων του miR-140 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων. \*p<0.05.

### B.2.12 Μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης της BMP-2 μέσω της δράσης του miR-140

Στη συνέχεια ακολούθησε η διερεύνηση του ρόλου του miR-140 στη γονιδιακή ρύθμιση της BMP-2, της οποίας τα επίπεδα βρέθηκαν αυξημένα στον ΟΑ χόνδρο. Σε μια πρώτη φάση, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της BMP-2 για την εύρεση λειτουργικών θέσεων σύνδεσης του miR-140, με τη χρήση τεσσάρων κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων ( miRanda, miRDB, TargetScan και Dianna-microT) (Εικόνα 29α). Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη της αλληλουχίας που αναγνωρίζει το miR-140 στην 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της BMP-2, μέσω της οποίας ασκεί τη δράση του (Εικόνα 29β).





### hsa-miR-140-5p/BMP2 Alignment

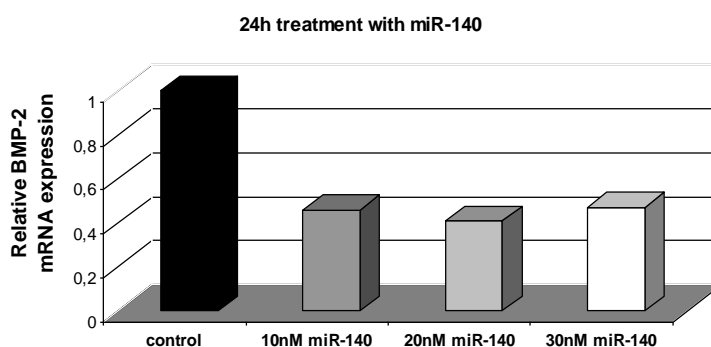
```
3' gaugguaucuccAUUUUUGGUGAc 5' hsa-miR-140-5p
      ||| ||| ||| ||| |||
309:5' uuauuuuacuaUUAUAACCACUu 3' BMP2
```

mirSVR score: -1.3240  
PhastCons score: 0.7607

Εικόνα 29: (α) Απεικόνιση της αλληλουχίας της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της BMP-2 και των πιθανών microRNAs που μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση της. (β) Απεικόνιση της θέσης σύνδεσης του miR-140 στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της BMP-2 όπως βρέθηκε μετά τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

Στη συνέχεια, προκειμένου να μελετηθεί σε κυτταρικό επίπεδο η άμεση ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της BMP-2 από το miR-140, ακολούθησε ο προσδιορισμός των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων της BMP-2 μετά τη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων miR-140 (10, 20 και 30 nM) σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων για 24 ώρες. Παρατηρήθηκε, σημαντική μείωση των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων της BMP-2 στα OA χονδροκύτταρα που υπέστησαν επίδραση με miR-140, συγκριτικά με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε miR-140 ( $p < 0.05$ ) (Εικόνα 30α και β). Η μείωση των μεταγράφων mRNA της BMP-2 δε συνέβει με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο καθώς δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της στις διάφορες συγκεντρώσεις του miR-140.

(α)

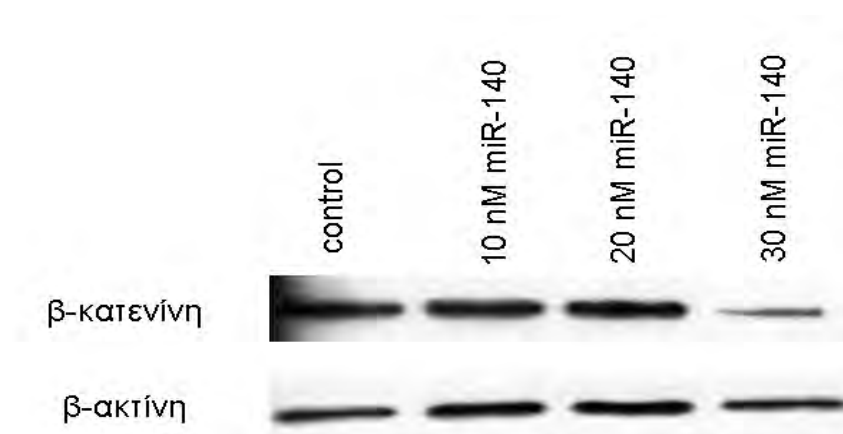


Εικόνα 30: Απεικόνιση των επιπέδων mRNA της BMP-2 μετά από επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις

miR-140 σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων.

### B.2.13 Προσδιορισμός της έκφρασης της β-κατενίνης μετά από επίδραση με miR-140

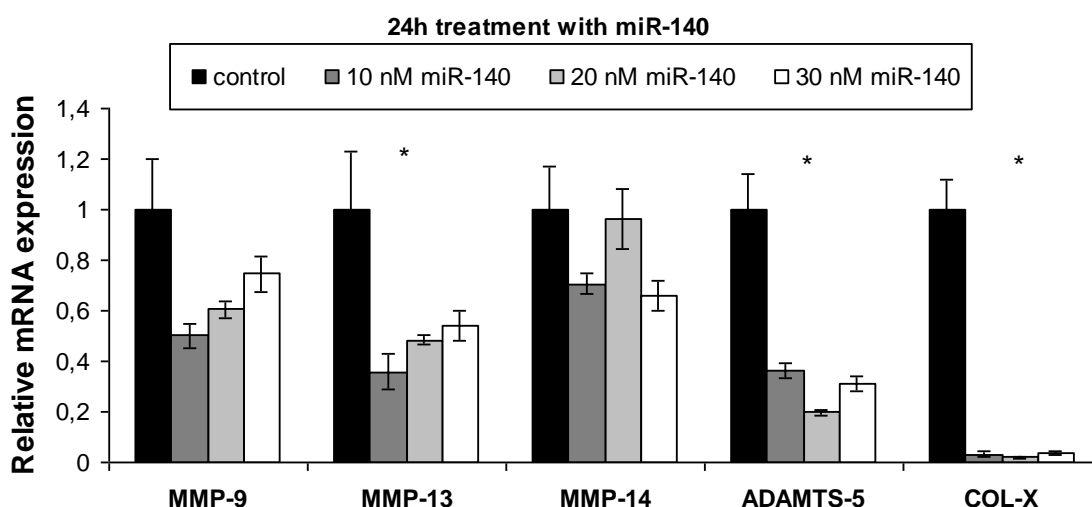
Επιπλέον, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του miR-140 στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης που επάγεται από την BMP-2, προσδιορίστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της έκφρασης της β-κατενίνης στα OA χονδροκύτταρα μετά τη χορήγηση 10, 20 και 30 nM miR-140 σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της μεθόδου Western blot έδειξαν σημαντική μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της β-κατενίνης στα OA χονδροκύτταρα που είχαν υποστεί την επίδραση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση του miR-140 σε σχέση με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε miR-140 ή που τους χορηγήθηκε 10 και 20 nM miR-140 (Εικόνα 31).



Εικόνα 31: (α) Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-κατενίνης μετά από επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις miR-140 σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων για 24 ώρες.

### B.2.14 Προσδιορισμός της έκφρασης καταβολικών ενζύμων και υπερτροφικών παραγόντων σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με miR-140

Στη συνέχεια ακολούθησε προσδιορισμός των επιπέδων mRNA των μεταλλαπρωτεϊνών (MMP-9, 13, 14 και ADAMTS-5) και του COL10A1 μετά τη χορήγηση 10, 20 και 30 nM miR-140 σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων για 24 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα mRNA της MMP-13, ADAMTS-5 και του COL10A1 μειώθηκαν σημαντικά στα OA χονδροκύτταρα που είχαν υποστεί την επίδραση του miR-140 ( $p < 0.05$ ), ενώ παρατηρήθηκε τάση για μείωση των μεταγραφικών επιπέδων της MMP-9 και 14 μετά τη χορήγηση του miR-140, χωρίς αυτή η διαφορά να ήταν στατιστικά σημαντική. Η μείωση των μεταγράφων mRNA της MMP-13, ADAMTS-5 και του COL10A1 δε συνέβει με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο καθώς δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των μορίων στις διάφορες συγκεντρώσεις του miR-140 (Εικόνα 32).



Εικόνα 32: (α) Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων της MMP-9, 13, 14, ADAMTS-5 και COL10A1 μετά από επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις miR-140 σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων για 24 ώρες. \* $p < 0.05$ .

### **B.3 Συζήτηση**

Η Οστεοαρθρίτιδα (OA) αποτελεί την πιο κοινή αρθροπάθεια καθώς ετησίως διαγιγνώσκονται περίπου 15 εκατομμύρια νέοι ασθενείς με OA στην Ευρωπαϊκή Ένωση και 21 εκατομμύρια στις Ηνωμένες Πολιτείες [265]. Ειδικά για την Ελλάδα, το Ελληνικό ίδρυμα Ρευματολογικών Ερευνών αναφέρει ότι η συνολική συχνότητα της συμπτωματικής OA ανέρχεται στο 13,1% των ενηλίκων, που υπολογίζεται σε περισσότερο από 1 εκατομμύριο πάσχοντες Έλληνες [9]. Η συχνότητα της νόσου αυξάνει με την ηλικία έτσι ώστε μετά τα 65 χρόνια, 3 στους 4 Έλληνες και Ελληνίδες να

πάσχουν από ΟΑ ενώ περισσότερο από το 85% των ατόμων αυτών αν και έχουν παθολογικά ακτινολογικά ευρήματα στις αρθρώσεις τους είναι ακόμη ασυμπτωματικοί [9].

Η ΟΑ είναι μια χρόνια πάθηση που οδηγεί στον σταδιακό εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου και ευθύνεται για προβλήματα κινητικότητας, πόνου καθώς και δυσκολία στη μετακίνηση και την εκτέλεση των καθημερινών δραστηριοτήτων μεγάλου μέρους του πληθυσμού. Η αιτιολογία της νόσου είναι πρακτικά άγνωστη και πιστεύεται πως είναι πολυπαραγοντική. Η μηχανική επιβάρυνση, η παχυσαρκία, οι τραυματισμοί και η γενετική προδιάθεση ευθύνονται για την εμφάνισή της, ενώ ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός της νόσου παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστος [2]. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν διαθέσιμοι δείκτες κατάλληλοι για την πρόγνωση της ΟΑ, ούτε θεραπευτικές μέθοδοι που να μπορούν να αναστείλουν ή να τροποποιήσουν την εξέλιξή της [265].

Παρόλο που η ΟΑ δεν απειλεί τη ζωή, υποβαθμίζει σημαντικά την ποιότητά της, αποτελώντας μια από τις σημαντικότερες αιτίες αναπηρίας του ανθρώπινου πληθυσμού. Αν και υπάρχουν φάρμακα που ανακουφίζουν τον πόνο των ασθενών το πραγματικό πρόβλημα δεν αντιμετωπίζεται με τη φαρμακευτική αγωγή και έτσι οι περισσότεροι ασθενείς καταλήγουν σε χειρουργικές λύσεις για την αντιμετώπιση του προβλήματός τους. Υπολογίζεται ότι το ετήσιο κόστος για επεμβάσεις ολικής αρθροπλαστικής γόνατος, στην Ευρώπη ανέρχεται στα δύο δισεκατομμύρια ευρώ. Βάσει των ανωτέρω οι επιπτώσεις της ΟΑ δεν αφορούν μόνο τον κάθε ασθενή χωριστά αλλά και την κοινωνία ως σύνολο τόσο σε κοινωνικό όσο και σε οικονομικό επίπεδο, καθιστώντας επιτακτική ανάγκη την ανεύρεση δεικτών κατάλληλων για την πρόγνωση της ΟΑ αλλά και νέων θεραπευτικών βιολογικών προσεγγίσεων που θα στοχεύουν στην

αναστροφή του οστεοαρθρικού φαινοτύπου και κατ'επέκταση στην αναστολή της εξέλιξης της νόσου στα πρώιμα στάδια εκδήλωσης της.

Μελέτες της τελευταίας δεκαετίας έχουν παραλληλίσει την εμφάνιση και εξέλιξη της ΟΑ με διεργασίες που συμβαίνουν κατά την ανάπτυξη των μακρών οστών μέσω της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων, δηλαδή κατά την ΕΟ [118, 132, 133]. Οι αλλαγές που παρατηρούνται στον φαινότυπο των ΟΑ χονδροκυττάρων, δηλαδή η διαφοροποίηση τους σε υπερτροφικά, σχετίζονται με τον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, καθώς τα υπερτροφικά ΟΑ χονδροκύτταρα ενισχύουν τη μεταβολική τους δραστηριότητα αλλάζοντας το πρότυπο έκφρασης των μορίων της εξωκυττάριας ουσίας και των καταβολικών ενζύμων του αρθρικού χόνδρου [132, 133]. Αυξητικοί και μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την τελική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά κατά την ΕΟ, παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στον οστεοαρθρικό χόνδρο, προτείνοντας τη συμμετοχή τους στην παθογένεια της νόσου [132, 133, 266]. Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν εστιάσει τις μελέτες τους στη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στη ρύθμιση της έκφρασης των ανωτέρω παραγόντων, προκειμένου να βρεθούν νέοι θεραπευτικοί στόχοι για την αντιμετώπιση της νόσου. Τα τελευταία χρόνια αντικείμενο μελέτης έχει αποτελέσει και ο ρόλος των επιγενετικών μηχανισμών στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην ΟΑ [267]. Συγκεκριμένα ο ρόλος των microRNAs μελετάται πλέον διεξοδικά καθώς έχουν αναφερθεί microRNAs τα οποία συμμετέχουν στις διαδικασίες της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων κατά την ΕΟ και παράλληλα εμφανίζουν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ ΟΑ και φυσιολογικού χόνδρου [247, 267] [248].

Σκοπός της διατριβής ήταν η διερεύνηση του ρόλου της BMP-2 και του σηματοδοτικού μονοπατιού της Wnt/ $\beta$ -κατενίνης στην οστεοαρθρίτιδα και του μηχανισμού μέσω του οποίου ασκούν τη δράση τους.

Μεταξύ των αυξητικών παραγόντων που παίζουν καταλυτικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη των μακρών οστών κατά την ΕΟ συγκαταλέγονται οι BMPs [268-270]. Παρόλο που οι BMPs συμμετέχουν σε όλες τις φάσεις της χονδρογένεσης προωθώντας τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων και τις αναβολικές διεργασίες του αρθρικού χόνδρου, πρόσφατες μελέτες παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι BMPs έχουν αρνητική επίδραση στον ενήλικο αρθρικό χόνδρο, ενισχύοντας την καταβολική δράση των χονδροκυττάρων και τον εκφυλισμό της χόνδρινης αρθρικής επιφάνειας των μακρών οστών κατά την ΟΑ [151, 271] [176, 272]. Στην παρούσα διατριβή, προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος των BMPs την ΟΑ, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των BMP-2, 4 και 7, όπως επίσης και των υποδοχέων, BMPR-IA και IB μέσω των οποίων προσδέονται στην επιφάνεια των κυττάρων, τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε ΟΑ χονδροκύτταρα. Παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της BMP-2 και 4 και του υποδοχέα BMPR-IA στα ΟΑ χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά, ενισχύοντας τις ενδείξεις για ενεργή συμμετοχή του σηματοδοτικού μονοπατιού των BMPs στην εξέλιξη της νόσου. Η παρουσία των BMP-2 και 4 στον φυσιολογικό και ΟΑ χόνδρο αναφέρεται και σε προηγούμενες μελέτες, ωστόσο κάποιες υποστήριζαν την αυξημένη έκφραση της BMP-2 στον φυσιολογικό χόνδρο και κάποιες άλλες στον ΟΑ χόνδρο [178, 179]. Επίσης, το 2012 μια ερευνητική ομάδα έδειξε πως ασθενείς οι οποίοι είχαν υποστεί ολική αρθροπλαστική ισχίου παρουσίαζαν υψηλότερα επίπεδα της BMP-2 στον ορό του αίματος, προτείνοντας την ως νέο βιοχημική δείκτη για τη διάγνωση ή την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας μιας θεραπείας των εκφυλιστικών νόσων

[273]. Η αυξημένη έκφραση της BMP-2 υποστηρίζεται πως σχετίζεται με τα προϊόντα που παράγονται κατά την αποδόμηση των μακρομορίων της εξωκυττάριας ουσίας, τα οποία είναι ικανά να ενεργοποιήσουν την έκφραση αυξητικών παραγόντων που προωθούν τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά [187]. Επίσης, τα κύρια προφλεγμονώδη μόρια, IL-1β και TNF-α, που εμπλέκονται την εκδήλωση της φλεγμονής κατά την ΟΑ, ενεργοποιούν την BMP-2 με αποτέλεσμα την παραγωγή μορίων που προωθούν τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων αλλά και των MMPs που είναι δείκτες της καταβολικής τους δράσης [179, 180].

Οι BMPs εκτός από τη συμμετοχή τους στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, παίζουν κύριο ρόλο και στη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες, γι' αυτό και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τόσο σε προκλινικές όσο και σε κλινικές δοκιμές για να την ανάπλαση των οστών μετά από τραυματισμό [274, 275]. Συγκεκριμένα, η χορήγηση της BMP-2 σε ασθενείς με ανοιχτό κάταγμα κνημιαίου οστού έχει δείχθει ότι επιφέρει γρήγορη αναγέννηση του οστού και επούλωση του τραύματος, προτείνοντας νέες θεραπείες αποκατάστασης των τραυματισμένων αρθρώσεων βασιζόμενες στη δράση των BMPs [276]. Παρόλο που η BMP-2 μπορεί να έχει ευεργετική δράση στην ανάπλαση των οστών, η δράση της αυτή γίνεται αρνητική κατά την εξέλιξη της ΟΑ καθώς συμβάλει στην ανάπτυξη των νέων οστικών δομών που παρατηρούνται σε μια ΟΑ άρθρωση, των οστεοφύτων [176, 277]. Πρόσφατες μελέτες σε ποντίκια με ΟΑ που είχαν τροποποιηθεί γενετικά και παρουσίαζαν υψηλή έκφραση BMP-2, έδειξαν αυξημένο αριθμό οστεοφύτων στις αρθρώσεις τους και διαπιστώθηκε πως στο σχηματισμό των οστεοφύτων συμβάλλει η BMP-2 που παράγεται από τα ίδια τα χονδροκύτταρα [278, 279].



Εκτός από τις BMPs, *in vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν αποκαλύψει τη συσχέτιση μεταξύ του μονοπατιού της β-κατενίνης και της οστεοαρθρίτιδας [219, 220], μέσω της διαδικασίας της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, καθώς η β-κατενίνη προωθεί την ωρίμανση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά με αποτέλεσμα την απόπτωση τους και την αντικατάστασή τους από οστεοβλάστες [200, 201] [209] [213]. Στην παρούσα διατριβή παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της ενεργούς μορφής της β-κατενίνης και του μεταγραφικού παράγοντα LEF-1 στα OA χονδροκύτταρα, προτείνοντας την εκτεταμένη ενεργοποίηση του κανονικού Wnt/β-κατενίνης μονοπατιού στην OA. Αντίθετα, τα επίπεδα της φωσφο-β-κατενίνης ήταν μειωμένα στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά, επιβεβαιώνοντας τη συμμετοχή της β-κατενίνης στην παθογένεια της νόσου. Στο παρελθόν, σε μοντέλα ζώων με OA παρατηρήθηκε συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων της β-κατενίνης με τις οστεοαρθρικές αλλαγές που παρατηρούνται στον αρθρικό χόνδρο ζώων προχωρημένης ηλικίας [225]. Συγκεκριμένα βρέθηκε πως τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα που προερχόταν από νεαρά ζώα παρουσίαζαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης της β-κατενίνης, ενώ αντίθετα στα γηραιότερα ζώα που εμφάνιζαν χαρακτηριστικά της νόσου διαπιστώθηκε η παρουσία της β-κατενίνης τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα των χονδροκυττάρων. Επίσης, μελέτες που διερεύνησαν την ενδαρθρική διακύμανση της έκφρασης της β-κατενίνης σε χόνδρο που προέρχονταν από διαφορετικές περιοχές της ίδιας OA άρθρωσης έδειξαν ότι η πρωτεϊνική έκφραση της β-κατενίνης ήταν αυξημένη στο χόνδρο με προχωρημένη OA συγκριτικά με το χόνδρο που παρουσίαζε ήπιες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις [223].

Στη συνέχεια διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του συνυποδοχέα του κανονικού μονοπατιού της β-κατενίνης, LRP-5, σε OA και φυσιολογικά χονδροκύτταρα

και διαπιστώθηκε αύξηση των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών του επιπέδων στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά. Μέχρι σήμερα *in vivo* μελέτες παρέχουν αντικρουόμενα συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο του LRP-5 στον εκφυλισμό του χόνδρου και κατ' επέκταση στην παθογένεια της OA [280, 281]. Ποντίκια με χειρουργικά επαγόμενη OA τα οποία υπέστησαν απαλοιφή του γονιδίου *LRP-5* παρουσίασαν αύξηση της αποδόμησης του χόνδρου, η οποία σχετίστηκε με τη μειωμένη οστική μάζα των αρθρώσεων [280]. Αντίθετα, σε μια πρόσφατη *in vivo* μελέτη αναφέρεται πως ο LRP-5 παίζει καταλυτικό ρόλο στην αποδόμηση του χόνδρου που παρατηρείται σε ποντίκια με πειραματική OA, καθώς η απαλοιφή του γονιδίου *LRP-5* επέφερε αναστολή του εκφυλισμού του αρθρικού χόνδρου μέσω της ρύθμισης γονιδίων που συμμετέχουν στον μεταβολισμό του, όπως του κολλαγόνου τύπου II και των καταβολικών ένζυμων, MMP-3 και 13 [281].

Παρόλο που ο ρόλος του LRP-5 στην παθογένεια της OA δεν είναι ακριβής τα τελευταία χρόνια γενετικές μελέτες επιβεβαίωσαν τη συμμετοχή του στη ρύθμιση της ομοιοστασίας του οστού, μετά την ανακάλυψη μεταλλάξεων του γονιδίου που σχετίζονται με ασθένειες οι οποίες χαρακτηρίζονται από μη φυσιολογική σύνθεση οστικής μάζας [228, 282]. Η οστεοαρθρίτιδα αν και θεωρείτο κατά βάση νόσημα του χόνδρου, τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί ότι στην εκδήλωση της ενέχονται και αλλαγές στη σύνθεση και στο μεταβολισμό του υποχόνδριου οστού, ενώ ταυτόχρονα υποστηρίζεται η άμεση συνεργασία και αλληλεπίδραση των δύο ανωτέρω δομών της άρθρωσης στην παθογένεια της [283-285]. Συνεπώς, η αυξημένη έκφραση του LRP-5 που παρατηρήθηκε στα OA χονδροκύτταρα μπορεί να σχετίζεται με τη σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού, όπως επίσης και με το σχηματισμό των οστεοφύτων που παρατηρείται κυρίως στις αρθρώσεις του ισχίου και του γόνατος. Είναι πιθανόν η

αύξηση και η σκλήρυνση του οστού να αυξάνει την πίεση μεταξύ των επιφανειών του χόνδρου και του οστού συμβάλλοντας στην ελάττωση του πάχους του χόνδρου και στη διάσπασή του με αποτέλεσμα την εκδήλωση της νόσου.

Μετά από την επιβεβαίωση της αυξημένης ενεργότητας των μονοπατιών της BMP-2 και της β-κατενίνης στον OA χόνδρο, ακολούθησε μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης των παραπάνω μορίων στην OA. Η μελέτη μας έδειξε ότι η BMP-2 συμβάλλει στην αύξηση της ενεργότητας του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης, καθώς παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της ενεργής μορφής της β-κατενίνης και αντίθετα μείωση της φωσφο-β-κατενίνης μετά τη χορήγηση της BMP-2 στα φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα. Επίσης, αποδείχθηκε πως η αλληλεπίδραση των παραπάνω σηματοδοτικών μονοπατιών δεν επιτυγχάνεται άμεσα με την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της β-κατενίνης από την BMP-2 αλλά μέσω της σταθεροποίησης της ενεργούς μορφής της β-κατενίνης από τον LRP-5. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του LRP-5 στα χονδροκύτταρα που υπέστησαν την επίδραση της BMP-2 και μέσω της ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης αποδείχτηκε ο μοριακός μηχανισμός που ενέχεται στην ενεργοποίηση του LRP-5 από την BMP-2 καθώς για πρώτη φορά βρέθηκαν θέσεις σύνδεσης των μεταγραφικών παραγόντων Smad1/5/8 στον υποκινητή του γονιδίου *LRP-5*. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο παρελθόν αναφέρουν την αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών της BMP-2 και της β-κατενίνης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και κυρίως κατά τη διαδικασία διαφοροποίησης των οστεοβλαστών [286-288]. Η BMP-2 σε συνεργασία με την ενεργή μορφή της β-κατενίνης προωθούν τη διαφοροποίηση των πολυδύναμων εμβρυικών κυττάρων σε οστεοβλάστες καθώς επάγουν την έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης και της οστεοκαλσίνης με επακόλουθο την ασβεστοποίηση της εξωκυττάριας ουσίας και

το σχηματισμό νέου οστού [287]. Επίσης, η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης από την BMP-2 οδηγεί σε σχηματισμό νέου οστού σε *in vivo* πειραματικές διαδικασίες, ενώ ποντίκια τα οποία υπέστησαν απαλοιφή του γονιδίου της β-κατενίνης παρουσίασαν αναστολή της διαδικασίας της χονδρογένεσης και της οστεογένεσης που επάγεται από την BMP-2 [288-290].

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ενεργοποίηση της δράσης της β-κατενίνης από την BMP-2 μέσω της επαγωγής της έκφρασης του LRP-5, ακολούθησε αναστολή του LRP-5, με χρήση ειδικού siRNA σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα, τα οποία είχαν ήδη υποστεί την επίδραση της BMP-2. Η αναστολή του LRP-5 επέφερε επαναφορά της έκφρασης της ενεργούς μορφής της β-κατενίνης και των φωσφορικών της επιπέδων στα επίπεδα που είχαν προσδιοριστεί πριν τη χορήγηση της BMP-2, επιβεβαιώνοντας την αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών της BMP-2 και της β-κατενίνης μέσω του LRP-5. Τα αποτελέσματα μας υποστηρίζονται από προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία αναφέρουν πως η BMP-2 είναι ικανή να επάγει την έκφραση του LRP-5 σε κυτταρικές σειρές οστεοβλαστών και προ-οστοεβλαστών με επακόλουθο την αύξηση της ενεργότητας του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης και τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των κυττάρων του οστού [289].

Επόμενος στόχος της διατριβής ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος της αλληλεπίδρασης των δύο παραπάνω σηματοδοτικών μονοπατιών (BMP-2 και β-κατενίνη) που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων κατά την ΕΟ, στις αλλαγές που παρατηρούνται στο φαινότυπο των χονδροκυττάρων κατά την ΟΑ. Γ' αυτόν το λόγο επιλέχθηκαν γονίδια χαρακτηριστικά της καταβολικής δράσης των χονδροκυττάρων, όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP-7, 9, 13, 14, ADAMTS-4 και 5) αλλά

και χαρακτηριστικά της υπερτροφίας (COL10A1) και προσδιορίστηκε η έκφραση τους μετά από επίδραση με BMP-2 σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι η BMP-2 επάγει την έκφραση της MMP-9, 13, 14, ADAMTS-5 και του COL10A1, ενισχύοντας την καταβολική δράση των χονδροκυττάρων και τη διαφοροποίηση τους σε υπερτροφικά. Επίσης, αποδείχθηκε πως η αύξηση της έκφρασης των παραπάνω μορίων από την BMP-2 επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της β-κατενίνης καθώς αναστολή της έκφρασης του LRP-5 επέφερε μείωση των επιπέδων έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν την εμπλοκή των σηματοδοτικών μονοπατιών της BMP-2 και της β-κατενίνης στις φαινοτυπικές αλλαγές που παρατηρούνται στα χονδροκύτταρα κατά την ΟΑ, καθώς αυξάνουν τη μεταβολική δραστηριότητα τους ενισχύοντας την καταβολική τους δράση ενώ ταυτόχρονα επανακινούν τη διαφοροποίηση τους σε υπερτροφικά, χάνοντας τα βασικά χαρακτηριστικά των χονδροκυττάρων του μόνιμου αρθρικού χόνδρου.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, επόμενος στόχος ήταν η διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού μέσω του οποίου η ενεργοποίηση της β-κατενίνης οδηγεί στην επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων που ενέχονται στην καταβολική δράση των χονδροκυττάρων και τη διαφοροποίηση τους σε υπερτροφικά. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε *in vitro* ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης με LiCl η οποία επέφερε αύξηση των καταβολικών ενζύμων της MMP-13 και της MMP-9 στα φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα και της MMP-14, ADAMTS-5 και του COL10A1 μόνο στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Δεδομένου ότι η β-κατενίνη δεν συνδέεται άμεσα στον υποκινητή των γονιδίων-στόχων αλλά επάγει την έκφραση τους μέσω του μεταγραφικού παράγοντα LEF-1, ακολούθησε αναστολή του LEF-1 με siRNA μετά από την *in vitro* ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης με

LiCl και προσδιορίστηκε η έκφραση των ανωτέρω γονιδίων σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι η MMP-13, 9, 14, ADAMTS-5 και το COL10A1 αποτελούν γονίδια-στόχους της β-κατενίνης καθώς αναστολή του LEF-1 επέφερε επαναφορά της έκφρασης τους στα επίπεδα που είχαν προσδιοριστεί πριν τη χορήγηση του LiCl σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα. Μία σειρά *in vivo* μελετών αναφέρουν πως γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που υπερέκφραζαν τη β-κατενίνη παρουσίασαν πρόωρη ωρίμανση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά [234], ενώ ποντίκια προχωρημένης ηλικίας με OA γόνατος έδειξαν εκτεταμένη καταβολική δράση των χονδροκυττάρων η οποία συνδέθηκε με τα υψηλά πρωτεϊνικά επίπεδα της β-κατενίνης στον OA χόνδρο [225].

Η ανάδειξη του μηχανισμού της γονιδιακής ρύθμισης της MMP-13, 9, 14, ADAMTS-5 και το COL10A1 από τη β-κατενίνη στον OA χόνδρο έγινε με τη χρήση της μεθόδου της ανοζοκαθίζησης της χρωματίνης η οποία αποκάλυψε την παρουσία θέσεων σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα LEF-1 στους υποκινητές των ανωτέρω γονιδίων. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν τη μεταγραφική ρύθμιση της MMP-13 από τον LEF-1 λόγω της ύπαρξης θέσης σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα στην 3' περιοχή του γονιδίου MMP-13 σε ποντίκια [291]. Επίσης, *in vivo* μελέτες απέδειξαν την επαγωγή της έκφρασης της MMP-13, ADAMTS-5 και του COL10A1 μέσω του RUNX-2, μεταγραφικού παράγοντα που βρίσκεται υπό τη ρύθμιση της β-κατενίνης και επάγει την υπερτροφία των χονδροκυττάρων [215, 292-294]. Ανάλυση των υποκινητών των παραπάνω γονιδίων έδειξε την ύπαρξη θέσεων σύνδεσης του RUNX-2, υποδεικνύοντας έναν έμμεσο μηχανισμό συσχέτισης μεταξύ των υψηλών επιπέδων της β-κατενίνης και της αυξημένης καταβολικής δράσης των χονδροκυττάρων κατά την OA.

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών της BMP-2 και της β-κατενίνης μέσω του LRP-5 παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ΟΑ, καθώς η απορρύθμιση της σωστής λειτουργίας της β-κατενίνης από την BMP-2 συμβάλλει στις φαινοτυπικές αλλαγές των χονδροκυττάρων που παρατηρούνται στην ΟΑ, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που αποτελούν δείκτες για την καταβολική δράση των χονδροκυττάρων αλλά και τη διαφοροποίηση τους σε υπερτροφικά. Βάσει των ανωτέρω τελικός στόχος της διατριβής αποτέλεσε η αναστολή της ενεργοποίησης της β-κατενίνης που επάγεται από την BMP-2 στα ΟΑ χονδροκύτταρα, προκειμένου να αναδειχτούν νέοι μηχανισμοί και μόρια-στόχοι για πιθανή θεραπευτική προσέγγιση της νόσου. Επειδή τα microRNAs αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης γονιδίων και φαίνεται να παίζουν καταλυτικό ρόλο τόσο στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων όσο και στην εξέλιξη της ΟΑ [248, 267], επιλέχθηκε να μελετηθεί η γονιδιακή ρύθμιση της BMP-2 στην ΟΑ μέσω της δράσης των microRNAs. Τα microRNAs αποτελούν σημαντικά εργαλεία για την αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων που ενέχονται στην εκδήλωση ασθενειών και χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως ως εργαλεία για την ανάδειξη νέων θεραπειών πολλών τύπων καρκίνου [295].

Δεδομένου ότι τα microRNAs συμμετέχουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της σύνδεσης τους κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA στόχου, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της BMP-2 για την ύπαρξη θέσεων σύνδεσης microRNAs με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής. Τα αποτελέσματα των υπολογιστικών προγραμμάτων που χρησιμοποιήθηκαν έδειξαν την παρουσία θέσεων σύνδεσης πολλών διαφορετικών microRNAs που ίσως να ρυθμίζουν την έκφραση της. Μεταξύ των microRNAs που

φαίνεται να συνδέονται στην 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της BMP-2 επιλέχθηκε να μελετηθεί ο ρόλος του miR-140 στην έκφραση της καθώς αποτελεί το πιο καλά χαρακτηρισμένο microRNA που εκφράζεται στον αρθρικό χόνδρο και συμμετέχει στη διαδικασία διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας [253, 262]. Αρχικά, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του miR-140 σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα και διαπιστώθηκε μείωση των μεταγράφων του miR-140 στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά. Το 2008 αναφέρεται πρώτη φορά στη βιβλιογραφία διαφοροποιημένη έκφραση του miR-140 μεταξύ φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων μετά από μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την ανάλυση του προτύπου έκφρασης των microRNAs στην OA [58]. Το 2009 δύο νέες μελέτες επιβεβαίωσαν τα παραπάνω αποτελέσματα, ενισχύοντας τις ενδείξεις για συμμετοχή του miR-140 στην παθογένεια της νόσου [253, 261]. Το miR-140 μπορεί να αποτελεί ένα μόριο που να συμμετέχει στις αλλαγές του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων που παρατηρούνται κατά την OA, καθώς μελέτες έχουν αποδείξει τη συμμετοχή του miR-140 στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων όπως του SOX-9, COL2A1, HDAC-4 και Smad-3 [251, 253, 258]. Το miR-140 βρέθηκε να παρουσιάζει διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ χονδροκυττάρων και μεσεγχυματικών κυττάρων που πρόκειται να δώσουν τα πρώιμα χονδροκύτταρα [258], ενώ σε μια πολύ πρόσφατη μελέτη του 2014 παρατηρήθηκε διαφοροποιημένη έκφραση σε χονδροκύτταρα που προερχόταν από διαφορετικές περιοχές αναπτυσσόμενου ανθρώπινου χόνδρου [296]. Συγκεκριμένα, μεταξύ των τριών κυτταρικών πληθυσμών χονδροκυττάρων που απομονώθηκαν από το ίδιο άτομο (πρόδρομα, διαφοροποιημένα και υπερτροφικά χονδροκύτταρα), παρατηρήθηκε έκφραση του miR-140 και στους τρεις κυτταρικούς πληθυσμούς, ωστόσο στα



υπερτροφικά χονδροκύτταρα βρέθηκαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τους δύο άλλους πληθυσμούς, προτείνοντας τη συμμετοχή του στα αρχικά στάδια διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων.

Η χρήση των υπολογιστικών προγραμμάτων μπορεί να δίνει πληροφορίες σχετικά με την αντιστοίχιση των microRNAs με τα mRNAs στόχους, ωστόσο δεν παρέχει πληροφορίες σε κυτταρικό επίπεδο, δηλαδή ποιά είναι τα επίπεδα έκφρασης τους και με ποιόν τρόπο αλληλεπιδρούν με τα γονίδια στόχους στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους προκειμένου να ρυθμίσουν την έκφραση τους. Ως εκ τούτου, προκειμένου να μελετηθεί διεξοδικά ο τρόπος ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης από τα microRNAs απαιτείται η πειραματική μελέτη των αλληλεπιδράσεων τους με τα mRNAs στόχους σε επίπεδο κυττάρων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, μελετήθηκε πειραματικά η αλληλεπίδραση του miR-140 με την BMP-2 μετά από χορήγηση του miR-140 σε OA χονδροκύτταρα και προσδιορισμό της έκφρασης της BMP-2. Τα microRNAs ρυθμίζουν την αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων με δύο τρόπους είτε καταστέλλοντας τη διαδικασία της μετάφρασης όταν δεν υπάρχει πλήρης συμπληρωματικότητα μεταξύ του microRNA με το mRNA-στόχο, είτε καταστέλλοντας τη διαδικασία της μεταγραφής μέσω της αποδόμησης του mRNA όταν υπάρχει πλήρης συμπληρωματικότητα μεταξύ των δύο μορίων [297]. Η υπολογιστική ανάλυση έδειξε πλήρη συμπληρωματικότητα του miR-140 με την 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της BMP-2 οπότε προσδιορίστηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης της BMP-2 μετά τη χορήγηση του miR-140 σε OA χονδροκύτταρα.

Μετά τη χορήγηση του miR-140 στα OA χονδροκύτταρα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της μεταγραφικής έκφρασης της BMP-2, υποστηρίζοντας πως το miR-140 εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης της BMP-2 και αναδεικνύοντας έναν πιθανό

μοριακό μηχανισμό ο οποίος συμβάλλει στη διαφοροποιημένη έκφραση της BMP-2 στον ΟΑ χόνδρο, καθώς η σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ τους είναι αντιστρόφως ανάλογη. Στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα παρατηρήθηκαν αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα του miR-140 και μειωμένα της BMP-2, ενώ στα ΟΑ χονδροκύτταρα βρέθηκε μειωμένη έκφραση του miR-140 και αύξηση της έκφρασης της BMP-2. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο παρελθόν σε ποντίκια ανέδειξαν την έμμεση ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού των BMPs από το miR-140 στα χονδροκύτταρα [259]. Ποντίκια τα οποία υπέστησαν απαλοιφή του γονιδίου του miR-140 παρουσίασαν ανωμαλίες στην ανάπτυξη των μακρών οστών λόγω συσσώρευσης των χονδροκυττάρων στο στάδιο της υπερτροφίας οι οποίες συσχετίστηκαν με την τροποποίηση της λειτουργίας του σηματοδοτικού μονοπατιού της BMP-2 μέσω του ανταγωνιστή Dnrep που αποτελεί άμεσο στόχο του miR-140. Επίσης, πρόσφατες μελέτες αναφέρουν την BMP-2 ως άμεσο στόχο του miR-140 σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα και σε χονδροκύτταρα προερχόμενα από πτηνά, προτείνοντας ότι η ρύθμιση της έκφρασης των παραγόντων που συμμετέχουν στην ΕΟ είναι συντηρημένη μεταξύ των διαφορετικών ειδών [260].

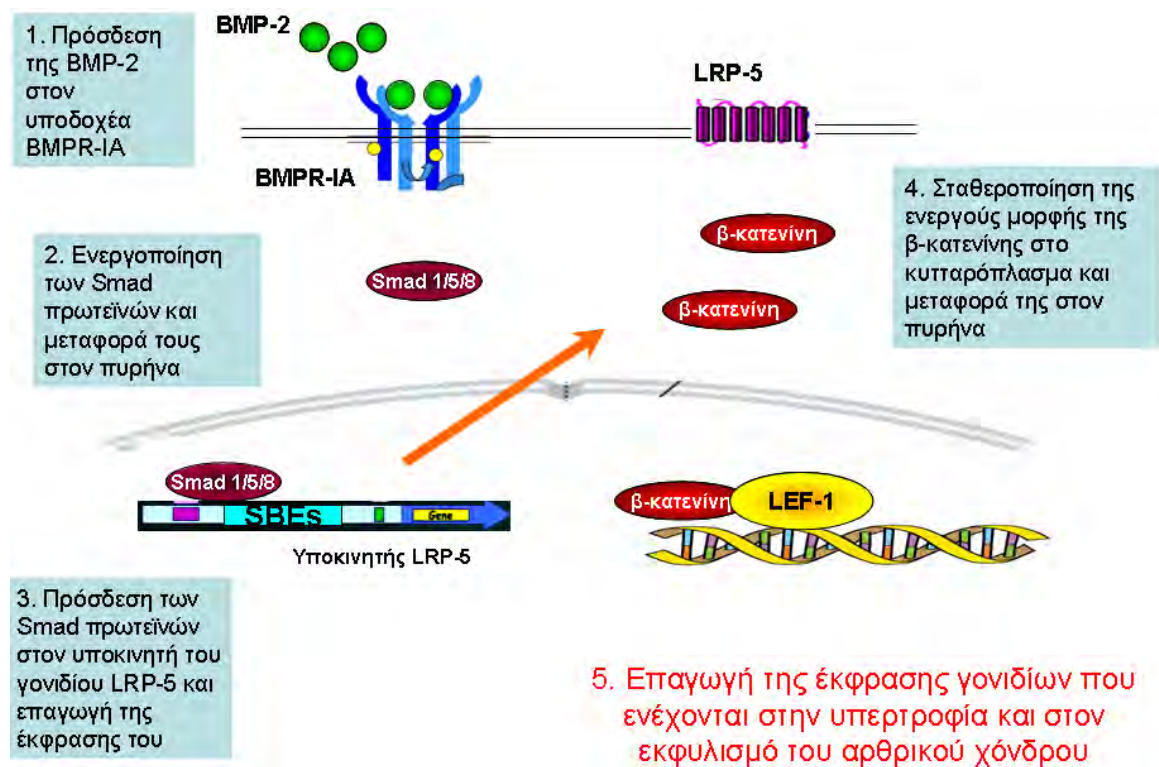
Τέλος, το miR-140 μέσω της αναστολής της έκφρασης της BMP-2 επέφερε μείωση της ενεργούς μορφής της β-κατενίνης αλλά και των καταβολικών ενζύμων (MMP-13, ADAMTS-5) και των δεικτών υπερτροφίας (COL10A1) που επάγονται από αυτή, προτείνοντας έναν πιθανό μοριακό μηχανισμό αναστολής της εξέλιξης της νόσου. Προηγούμενες μελέτες που διερεύνησαν την επιγενετική ρύθμιση της MMP-13 και ADAMTS-5 στον αρθρικό χόνδρο υποστηρίζουν την άμεση εμπλοκή του miR-140 στη ρύθμιση της έκφρασης τους [261-263]. Μοντέλα ζώων με ΟΑ που είχαν υποστεί απαλειφή του miR-140 παρουσίασαν αυξημένη αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου η

οποία συσχετίστηκε με τα αυξημένα επίπεδα της ADAMTS-5 [262]. Βρέθηκε ότι η έκφραση της ADAMTS-5 ρυθμίζεται άμεσα από το miR-140 σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, αποδεικνύοντας για πρώτη φορά τη ρύθμιση ενός μορίου που ενέχεται στην παθογένεια της νόσου από το miR-140 [262]. Όσον αφορά την MMP-13, ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA με υπολογιστικά προγράμματα έδειξαν την ύπαρξη θέσεων σύνδεσης του miR-140 και αρνητική ρύθμιση της έκφρασης της από το συγκεκριμένο microRNA [261, 263].

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκαν σηματοδοτικά μονοπάτια και μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στις φαινοτυπικές αλλαγές των ΟΑ χονδροκυττάρων, καθώς υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για παραλληλισμό των φυσιολογικών γεγονότων που συμβαίνουν κατά την ΕΟ με τις διαδικασίες που οδηγούν στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου κατά την ΟΑ. Συγκεκριμένα, αναδείχτηκε η εκτεταμένη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών της BMP-2 και της β-κατενίνης στα ΟΑ χονδροκύτταρα, δύο βασικών μορίων που εμπλέκονται στην τελική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά, όπως επίσης και η αλληλεπίδραση μεταξύ τους μέσω του υποδόχεια της β-κατενίνης, LRP-5. Εξαιτίας της ενεργοποίησης της β-κατενίνης από την BMP-2, της οποίας η έκφραση βρέθηκε αυξημένη στην ΟΑ, τα ΟΑ χονδροκύτταρα δεν μπορούν να διατηρήσουν τα χαρακτηριστικά του μόνιμου χόνδρου αλλά αντιθέτως ενισχύουν την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας μέσω της επαγωγής της έκφρασης των καταβολικών ενζύμων, MMP-9, 13, 14 και ADAMTS-5 αλλά και της ωρίμανσης τους σε υπερτροφικά μέσω της παραγωγής του κολλαγόνου Χ, παρέχοντας σαφείς ενδείξεις για τη συμμετοχή της BMP-2 και της β-κατενίνης στην παθογένεια της νόσου (Εικόνα 33). Η καταβολική δράση των ανωτέρω μορίων δεν περιορίζεται μόνο στην αποδόμηση του

βασικού συστατικού της εξωκυττάριας ουσίας, του κολλαγόνου τύπου II, αλλά και διαφόρων πρωτεογλυκανών όπως της αγκρεκάνης και της φμπρονεκτίνης μέσω της επαγωγής της έκφρασης της ADAMTS-5 και MMP-9, αντίστοιχα.

Επίσης, το miR-140 επέφερε αναστολή της έκφρασης της BMP-2 και όλων των διαδικασιών που επάγονται από τη δράση της και οδηγούν στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, προτείνοντας το miR-140 ως πιθανό θεραπευτικό στόχο για την αναστολή της εξέλιξης της ΟΑ σε πρώιμα στάδια και αναδεικνύοντας την κλινική σπουδαιότητα των αποτελεσμάτων μας. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μια σειρά μεθόδων για *in vivo* εφαρμογή της τεχνολογίας των microRNAs στην αναδόμη του κατεστραμένου χόνδρου, καθιστώντας τα microRNAs βασικά μοριακά εργαλεία για νέα θεραπευτική προσέγγιση της νόσου. Ωστόσο, απαιτείται τελειοποίηση των μεθόδων μεταφοράς των microRNAs στα χονδροκύτταρα για στοχευμένη και μεγαλύτερης αποτελεσματικότητας θεραπεία έναντι των εκφυλιστικών παθήσεων του αρθρικού χόνδρου, όπως είναι η οστεοαρθρίτιδα.



Εικόνα 33: Πιθανό μοντέλο δράσης της αλληλεπίδρασης μεταξύ της BMP-2 και της β-κατενίνης στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Zhang Y, Jordan JM: **Epidemiology of osteoarthritis**. *Clin Geriatr Med* 2010, **26**(3):355-369.
2. Suri P, Morgenroth DC, Hunter DJ: **Epidemiology of osteoarthritis and associated comorbidities**. *Pm R* 2012, **4**(5 Suppl):S10-19.
3. Grazio S, Balen D: **[Obesity: risk factor and predictor of osteoarthritis]**. *Lijecnicki vjesnik* 2009, **131**(1-2):22-26.
4. Goldring MB, Goldring SR: **Osteoarthritis**. *Journal of cellular physiology* 2007, **213**(3):626-634.
5. Johnson VL, Hunter DJ: **The epidemiology of osteoarthritis**. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2014, **28**(1):5-15.
6. Loughlin J: **The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis: current status**. *Expert reviews in molecular medicine* 2005, **7**(9):1-12.
7. WHO: **The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium**. 2003.
8. Dieppe PA, Lohmander LS: **Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis**. *Lancet* 2005, **365**(9463):965-973.
9. Andrianakos AA, Kontelis LK, Karamitsos DG *et al*: **Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study**. *The Journal of rheumatology* 2006, **33**(12):2507-2513.
10. Senna ER, De Barros AL, Silva EO *et al*: **Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach**. *The Journal of rheumatology* 2004, **31**(3):594-597.
11. Reyes Llerena GA, Guibert Toledano M, Hernandez Martinez AA *et al*: **Prevalence of musculoskeletal complaints and disability in Cuba. A community-based study using the COPCORD core questionnaire**. *Clinical and experimental rheumatology* 2000, **18**(6):739-742.
12. Farooqi A, Gibson T: **Prevalence of the major rheumatic disorders in the adult population of north Pakistan**. *British journal of rheumatology* 1998, **37**(5):491-495.
13. Haq SA, Darmawan J, Islam MN *et al*: **Prevalence of rheumatic diseases and associated outcomes in rural and urban communities in Bangladesh: a COPCORD study**. *The Journal of rheumatology* 2005, **32**(2):348-353.
14. Zeng QY, Chen R, Darmawan J *et al*: **Rheumatic diseases in China**. *Arthritis Res Ther* 2008, **10**(1):R17.
15. Felson DT: **The epidemiology of knee osteoarthritis: results from the Framingham Osteoarthritis Study**. *Semin Arthritis Rheum* 1990, **20**(3 Suppl 1):42-50.

16. Arden N, Nevitt MC: **Osteoarthritis: epidemiology**. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006, **20**(1):3-25.
17. Chapman K, Mustafa Z, Irven C *et al*: **Osteoarthritis-susceptibility locus on chromosome 11q, detected by linkage**. *Am J Hum Genet* 1999, **65**(1):167-174.
18. Loughlin J: **Genome studies and linkage in primary osteoarthritis**. *Rheum Dis Clin North Am* 2002, **28**(1):95-109.
19. Loughlin J, Mustafa Z, Irven C *et al*: **Stratification analysis of an osteoarthritis genome screen-suggestive linkage to chromosomes 4, 6, and 16**. *Am J Hum Genet* 1999, **65**(6):1795-1798.
20. Loughlin J, Mustafa Z, Smith A *et al*: **Linkage analysis of chromosome 2q in osteoarthritis**. *Rheumatology (Oxford)* 2000, **39**(4):377-381.
21. Stefansson SE, Jonsson H, Ingvarsson T *et al*: **Genomewide scan for hand osteoarthritis: a novel mutation in matrilin-3**. *Am J Hum Genet* 2003, **72**(6):1448-1459.
22. Leppavuori J, Kujala U, Kinnunen J *et al*: **Genome scan for predisposing loci for distal interphalangeal joint osteoarthritis: evidence for a locus on 2q**. *Am J Hum Genet* 1999, **65**(4):1060-1067.
23. Demissie S, Cupples LA, Myers R *et al*: **Genome scan for quantity of hand osteoarthritis: the Framingham Study**. *Arthritis and rheumatism* 2002, **46**(4):946-952.
24. Hunter DJ, Demissie S, Cupples LA *et al*: **A genome scan for joint-specific hand osteoarthritis susceptibility: The Framingham Study**. *Arthritis and rheumatism* 2004, **50**(8):2489-2496.
25. Valdes AM, Spector TD: **The genetic epidemiology of osteoarthritis**. *Curr Opin Rheumatol* 2010, **22**(2):139-143.
26. Valdes AM, Spector TD: **Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis**. *Nat Rev Rheumatol* 2011, **7**(1):23-32.
27. Snelling SJ, Hulley PA, Loughlin J: **BMP5 activates multiple signaling pathways and promotes chondrogenic differentiation in the ATDC5 growth plate model**. *Growth Factors* 2010, **28**(4):268-279.
28. Brachvogel B, Zaucke F, Dave K *et al*: **Comparative proteomic analysis of normal and collagen IX null mouse cartilage reveals altered extracellular matrix composition and novel components of the collagen IX interactome**. *J Biol Chem* 2013, **288**(19):13481-13492.
29. Forster T, Chapman K, Marcelline L *et al*: **Finer linkage mapping of primary osteoarthritis susceptibility loci on chromosomes 4 and 16 in families with affected women**. *Arthritis and rheumatism* 2004, **50**(1):98-102.
30. Kalichman L, Kobylansky E, Malkin I *et al*: **Search for linkage between hand osteoarthritis and 11q 12-13 chromosomal segment**. *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11**(8):561-568.

31. Salter DM, Millward-Sadler SJ, Nuki G *et al*: **Integrin-interleukin-4 mechanotransduction pathways in human chondrocytes**. *Clin Orthop Relat Res* 2001(391 Suppl):S49-60.
32. Loughlin J: **Polymorphism in signal transduction is a major route through which osteoarthritis susceptibility is acting**. *Curr Opin Rheumatol* 2005, **17**(5):629-633.
33. Kizawa H, Kou I, Iida A *et al*: **An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis**. *Nat Genet* 2005, **37**(2):138-144.
34. Mototani H, Mabuchi A, Saito S *et al*: **A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of CALM1 is associated with hip osteoarthritis in Japanese**. *Hum Mol Genet* 2005, **14**(8):1009-1017.
35. Kaliakatsos M, Tzetzis M, Kanavakis E *et al*: **Asporin and knee osteoarthritis in patients of Greek origin**. *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**(6):609-611.
36. Nakamura T, Shi D, Tzetzis M *et al*: **Meta-analysis of association between the ASPN D-repeat and osteoarthritis**. *Hum Mol Genet* 2007, **16**(14):1676-1681.
37. Poulou M, Kaliakatsos M, Tsezou A *et al*: **Association of the CALM1 core promoter polymorphism with knee osteoarthritis in patients of Greek origin**. *Genet Test* 2008, **12**(2):263-265.
38. Chapman K, Takahashi A, Meulenbelt I *et al*: **A meta-analysis of European and Asian cohorts reveals a global role of a functional SNP in the 5' UTR of GDF5 with osteoarthritis susceptibility**. *Hum Mol Genet* 2008, **17**(10):1497-1504.
39. Egli RJ, Southam L, Wilkins JM *et al*: **Functional analysis of the osteoarthritis susceptibility-associated GDF5 regulatory polymorphism**. *Arthritis and rheumatism* 2009, **60**(7):2055-2064.
40. Evangelou E, Chapman K, Meulenbelt I *et al*: **Large-scale analysis of association between GDF5 and FRZB variants and osteoarthritis of the hip, knee, and hand**. *Arthritis and rheumatism* 2009, **60**(6):1710-1721.
41. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D *et al*: **A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis**. *Nat Genet* 2007, **39**(4):529-533.
42. Southam L, Rodriguez-Lopez J, Wilkins JM *et al*: **An SNP in the 5'-UTR of GDF5 is associated with osteoarthritis susceptibility in Europeans and with in vivo differences in all-elic expression in articular cartilage**. *Hum Mol Genet* 2007, **16**(18):2226-2232.
43. Tsezou A, Satra M, Oikonomou P *et al*: **The growth differentiation factor 5 (GDF5) core promoter polymorphism is not associated with knee osteoarthritis in the Greek population**. *J Orthop Res* 2008, **26**(1):136-140.
44. Valdes AM, Evangelou E, Kerkhof HJ *et al*: **The GDF5 rs143383 polymorphism is associated with osteoarthritis of the knee with genome-wide statistical significance**. *Ann Rheum Dis* 2011, **70**(5):873-875.
45. Valdes AM, Spector TD, Tamm A *et al*: **Genetic variation in the SMAD3 gene is associated with hip and knee osteoarthritis**. *Arthritis and rheumatism* 2010, **62**(8):2347-2352.



46. Yang X, Chen L, Xu X *et al*: **TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage**. *J Cell Biol* 2001, **153**(1):35-46.
47. Meulenbelt I, Min JL, Bos S *et al*: **Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis**. *Hum Mol Genet* 2008, **17**(12):1867-1875.
48. Meulenbelt I, Bos SD, Chapman K *et al*: **Meta-analyses of genes modulating intracellular T3 bio-availability reveal a possible role for the DIO3 gene in osteoarthritis susceptibility**. *Ann Rheum Dis* 2011, **70**(1):164-167.
49. Reynard LN, Loughlin J: **The genetics and functional analysis of primary osteoarthritis susceptibility**. *Expert reviews in molecular medicine* 2013, **15**:e2.
50. Evangelou E, Kerkhof HJ, Styrkarsdottir U *et al*: **A meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel variants associated with osteoarthritis of the hip**. *Ann Rheum Dis* 2013.
51. Panoutsopoulou K, Zeggini E: **Advances in osteoarthritis genetics**. *J Med Genet* 2013, **50**(11):715-724.
52. Kerkhof HJ, Lories RJ, Meulenbelt I *et al*: **A genome-wide association study identifies an osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 7q22**. *Arthritis and rheumatism* 2010, **62**(2):499-510.
53. Nakajima M, Takahashi A, Kou I *et al*: **New sequence variants in HLA class II/III region associated with susceptibility to knee osteoarthritis identified by genome-wide association study**. *PLoS One* 2010, **5**(3):e9723.
54. Panoutsopoulou K, Southam L, Elliott KS *et al*: **Insights into the genetic architecture of osteoarthritis from stage 1 of the arcOGEN study**. *Ann Rheum Dis* 2011, **70**(5):864-867.
55. Zeggini E, Panoutsopoulou K, Southam L *et al*: **Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study**. *Lancet* 2012, **380**(9844):815-823.
56. Rodriguez-Fontenla C, Calaza M, Evangelou E *et al*: **Assessment of osteoarthritis candidate genes in a meta-analysis of nine genome-wide association studies**. *Arthritis Rheumatol* 2014, **66**(4):940-949.
57. Troeberg L, Nagase H: **Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis**. *Biochim Biophys Acta* 2012, **1824**(1):133-145.
58. Iliopoulos D, Malizos KN, Oikonomou P *et al*: **Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks**. *PLoS One* 2008, **3**(11):e3740.
59. Gelse K, Ekici AB, Cipa F *et al*: **Molecular differentiation between osteophytic and articular cartilage--clues for a transient and permanent chondrocyte phenotype**. *Osteoarthritis Cartilage* 2012, **20**(2):162-171.

60. Lambert C, Dubuc JE, Montell E *et al*: **Gene expression pattern of synovial cells from inflammatory and normal areas of osteoarthritis synovial membrane**. *Arthritis and rheumatism* 2013.
61. Schelbergen RF, Blom AB, van den Bosch MH *et al*: **Alarmins S100A8 and S100A9 elicit a catabolic effect in human osteoarthritic chondrocytes that is dependent on Toll-like receptor 4**. *Arthritis and rheumatism* 2012, **64**(5):1477-1487.
62. Chou CH, Wu CC, Song IW *et al*: **Genome-wide expression profiles of subchondral bone in osteoarthritis**. *Arthritis Res Ther* 2013, **15**(6):R190.
63. Amin AR, Islam AB: **Genomic Analysis and Differential Expression of HMG and S100A Family in Human Arthritis: Upregulated Expression of Chemokines, IL-8 and Nitric Oxide by HMGB1**. *DNA Cell Biol* 2014.
64. Peach CA, Carr AJ, Loughlin J: **Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis**. *Trends Mol Med* 2005, **11**(4):186-191.
65. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM *et al*: **Articular cartilage biology**. *J Am Acad Orthop Surg* 2003, **11**(6):421-430.
66. Moskowitz RW AR, Hochederg MC **Osteoarthritis (fourth edition)**. *Lippincott Williams and Wilkins Press* 2007.
67. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP *et al*: **Cartilage in normal and osteoarthritis conditions**. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008, **22**(2):351-384.
68. Buckwalter JA, Mankin HJ: **Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions**. *Instr Course Lect* 1998, **47**:477-486.
69. Hoemann CD, Lafantaisie-Favreau CH, Lascau-Coman V *et al*: **The cartilage-bone interface**. *J Knee Surg* 2012, **25**(2):85-97.
70. Onyekwelu I, Goldring MB, Hidaka C: **Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration**. *J Cell Biochem* 2009, **107**(3):383-392.
71. Jackson DW, Scheer MJ, Simon TM: **Cartilage substitutes: overview of basic science and treatment options**. *J Am Acad Orthop Surg* 2001, **9**(1):37-52.
72. Luria A, Chu CR: **Articular cartilage changes in maturing athletes: new targets for joint rejuvenation**. *Sports Health* 2014, **6**(1):18-30.
73. Poole AR GF, Abramson SB.: **Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management. 4th edition**. *Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins* 2007:27-49.
74. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA *et al*: **Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging**. *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**(1):13-29.
75. Gouttenoire J, Valcourt U, Ronziere MC *et al*: **Modulation of collagen synthesis in normal and osteoarthritic cartilage**. *Biorheology* 2004, **41**(3-4):535-542.
76. Sun MM, Beier F: **Chondrocyte hypertrophy in skeletal development, growth, and disease**. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2014, **102**(1):74-82.

77. Sandell LJ, Aigner T: **Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis.** *Arthritis Res* 2001, **3**(2):107-113.
78. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB: **Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets.** *Arthritis and rheumatism* 2001, **44**(6):1237-1247.
79. Loeser RF: **Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide.** *Arthritis and rheumatism* 2006, **54**(5):1357-1360.
80. Wojdasiewicz P, Poniatoski LA, Szukiewicz D: **The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis.** *Mediators Inflamm* 2014, **2014**:561459.
81. Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE: **Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes.** *Arthritis and rheumatism* 2001, **44**(3):585-594.
82. Goldring MB, Otero M, Plumb DA *et al*: **Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis.** *Eur Cell Mater* 2011, **21**:202-220.
83. Goldring MB, Berenbaum F: **The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide.** *Clin Orthop Relat Res* 2004(427 Suppl):S37-46.
84. Goldring SR, Goldring MB: **The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis.** *Clin Orthop Relat Res* 2004(427 Suppl):S27-36.
85. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE: **Matrix metalloproteinases: role in arthritis.** *Front Biosci* 2006, **11**:529-543.
86. Sassi N, Laadhar L, Allouche M *et al*: **WNT signaling and chondrocytes: from cell fate determination to osteoarthritis physiopathology.** *J Recept Signal Transduct Res* 2014, **34**(2):73-80.
87. Sassi N, Laadhar L, Allouche M *et al*: **The roles of canonical and non-canonical Wnt signaling in human de-differentiated articular chondrocytes.** *Biotech Histochem* 2014, **89**(1):53-65.
88. Heinegard D, Saxne T: **The role of the cartilage matrix in osteoarthritis.** *Nat Rev Rheumatol* 2011, **7**(1):50-56.
89. Cawston TE, Young DA: **Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown.** *Cell Tissue Res* 2010, **339**(1):221-235.
90. Rengel Y, Ospelt C, Gay S: **Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction.** *Arthritis Res Ther* 2007, **9**(5):221.
91. Bau B, Gebhard PM, Haag J *et al*: **Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro.** *Arthritis and rheumatism* 2002, **46**(10):2648-2657.

92. Kevorkian L, Young DA, Darrah C *et al*: **Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage**. *Arthritis and rheumatism* 2004, **50**(1):131-141.
93. Nagase H, Kashiwagi M: **Aggrecanases and cartilage matrix degradation**. *Arthritis Res Ther* 2003, **5**(2):94-103.
94. Little CB, Meeker CT, Golub SB *et al*: **Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair**. *J Clin Invest* 2007, **117**(6):1627-1636.
95. Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C *et al*: **The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation**. *Osteoarthritis Cartilage* 2001, **9**(6):539-552.
96. Glasson SS, Askew R, Sheppard B *et al*: **Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis**. *Nature* 2005, **434**(7033):644-648.
97. Song RH, Tortorella MD, Malfait AM *et al*: **Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5**. *Arthritis and rheumatism* 2007, **56**(2):575-585.
98. Naito S, Shiomi T, Okada A *et al*: **Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage**. *Pathol Int* 2007, **57**(11):703-711.
99. Pratta MA, Scherle PA, Yang G *et al*: **Induction of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein**. *Arthritis and rheumatism* 2003, **48**(1):119-133.
100. Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M *et al*: **Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta**. *J Immunol* 2002, **168**(3):1405-1412.
101. Koshy PJ, Lundy CJ, Rowan AD *et al*: **The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction**. *Arthritis and rheumatism* 2002, **46**(4):961-967.
102. Zwerina J, Redlich K, Polzer K *et al*: **TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(28):11742-11747.
103. Schulze-Tanzil G: **Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair**. *Ann Anat* 2009, **191**(4):325-338.
104. Hwang SG, Yu SS, Poo H *et al*: **c-Jun/activator protein-1 mediates interleukin-1beta-induced dedifferentiation but not cyclooxygenase-2 expression in articular chondrocytes**. *J Biol Chem* 2005, **280**(33):29780-29787.
105. Kim SJ, Ju JW, Oh CD *et al*: **ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status**. *J Biol Chem* 2002, **277**(2):1332-1339.
106. Huh YH, Kim SH, Kim SJ *et al*: **Differentiation status-dependent regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production by epidermal growth factor via**

- mitogen-activated protein kinase in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2003, **278**(11):9691-9697.**
107. Hwang SG, Ryu JH, Kim IC *et al*: **Wnt-7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits apoptosis of articular chondrocytes via different mechanisms.** *J Biol Chem* 2004, **279**(25):26597-26604.
108. Sassi N, Gadgadi N, Laadhar L *et al*: **Notch signaling is involved in human articular chondrocytes de-differentiation during osteoarthritis.** *J Recept Signal Transduct Res* 2014, **34**(1):48-57.
109. Sassi N, Laadhar L, Allouche M *et al*: **Wnt signaling is involved in human articular chondrocyte de-differentiation in vitro.** *Biotech Histochem* 2014, **89**(1):29-40.
110. Li D, Xie G, Wang W: **Reactive oxygen species: the 2-edged sword of osteoarthritis.** *Am J Med Sci* 2012, **344**(6):486-490.
111. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T: **Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**(8):643-654.
112. Abramson SB: **Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10 Suppl 2**:S2.
113. Abramson SB: **Osteoarthritis and nitric oxide.** *Osteoarthritis Cartilage* 2008, **16 Suppl 2**:S15-20.
114. Yudoh K, Nguyen v T, Nakamura H *et al*: **Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**(2):R380-391.
115. Brandl A, Hartmann A, Bechmann V *et al*: **Oxidative stress induces senescence in chondrocytes.** *J Orthop Res* 2011, **29**(7):1114-1120.
116. Vuolteenaho K, Moilanen T, Knowles RG *et al*: **The role of nitric oxide in osteoarthritis.** *Scand J Rheumatol* 2007, **36**(4):247-258.
117. de Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR *et al*: **Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation.** *Matrix Biol* 2000, **19**(5):389-394.
118. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K: **The control of chondrogenesis.** *J Cell Biochem* 2006, **97**(1):33-44.
119. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS: **Cellular interactions and signaling in cartilage development.** *Osteoarthritis Cartilage* 2000, **8**(5):309-334.
120. Shum L, Nuckolls G: **The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton.** *Arthritis Res* 2002, **4**(2):94-106.
121. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L *et al*: **Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008, **40**(1):46-62.

122. Provot S, Schipani E: **Molecular mechanisms of endochondral bone development.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **328**(3):658-665.
123. Kronenberg HM: **Developmental regulation of the growth plate.** *Nature* 2003, **423**(6937):332-336.
124. Burdan F, Szumilo J, Korobowicz A *et al*: **Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate.** *Folia Histochem Cytobiol* 2009, **47**(1):5-16.
125. Yamane S, Cheng E, You Z *et al*: **Gene expression profiling of mouse articular and growth plate cartilage.** *Tissue Eng* 2007, **13**(9):2163-2173.
126. Rentsendorj O, Nagy A, Sinko I *et al*: **Highly conserved proximal promoter element harbouring paired Sox9-binding sites contributes to the tissue- and developmental stage-specific activity of the matrilin-1 gene.** *Biochem J* 2005, **389**(Pt 3):705-716.
127. Wuelling M, Vortkamp A: **Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification.** *Pediatr Nephrol* 2010, **25**(4):625-631.
128. Hojo H, Ohba S, Yano F *et al*: **Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development.** *J Bone Miner Metab* 2010, **28**(5):489-502.
129. Lefebvre V, Smits P: **Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation.** *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005, **75**(3):200-212.
130. Solomon LA, Berube NG, Beier F: **Transcriptional regulators of chondrocyte hypertrophy.** *Birth Defects Res C Embryo Today* 2008, **84**(2):123-130.
131. McAnulty RJ LG: **In vivo measurement of collagen metabolism in cartilage and bone.** In: **Maroudas A, Kuettner K (eds) Methods in cartilage research.** . *Academic Press Inc* 1990:140–142.
132. Tchetina EV: **Developmental mechanisms in articular cartilage degradation in osteoarthritis.** *Arthritis* 2011, **2011**:683970.
133. Dreier R: **Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders.** *Arthritis Res Ther* 2010, **12**(5):216.
134. Bertrand J, Cromme C, Umlauf D *et al*: **Molecular mechanisms of cartilage remodelling in osteoarthritis.** *Int J Biochem Cell Biol* 2010, **42**(10):1594-1601.
135. Kirsch T, Swoboda B, Nah H: **Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2000, **8**(4):294-302.
136. Pfander D, Cramer T, Schipani E *et al*: **HIF-1alpha controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes.** *J Cell Sci* 2003, **116**(Pt 9):1819-1826.
137. Pullig O, Weseloh G, Ronneberger D *et al*: **Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone.** *Calcif Tissue Int* 2000, **67**(3):230-240.

138. Murata M, Yudoh K, Masuko K: **The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis?** *Osteoarthritis Cartilage* 2008, **16**(3):279-286.
139. Chang H, Brown CW, Matzuk MM: **Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily.** *Endocr Rev* 2002, **23**(6):787-823.
140. Van der Zee M, da Fonseca RN, Roth S: **TGFbeta signaling in Tribolium: vertebrate-like components in a beetle.** *Dev Genes Evol* 2008, **218**(3-4):203-213.
141. Zeng S, Chen J, Shen H: **Controlling of bone morphogenetic protein signaling.** *Cell Signal* 2010, **22**(6):888-893.
142. Yu PB, Beppu H, Kawai N *et al*: **Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells.** *J Biol Chem* 2005, **280**(26):24443-24450.
143. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M: **Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction.** *J Biochem* 2010, **147**(1):35-51.
144. Massague J, Seoane J, Wotton D: **Smad transcription factors.** *Genes Dev* 2005, **19**(23):2783-2810.
145. Balemans W, Van Hul W: **Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators.** *Dev Biol* 2002, **250**(2):231-250.
146. Ali IH, Brazil DP: **Bone Morphogenetic Proteins and their Antagonists: Current and Emerging Clinical Uses.** *Br J Pharmacol* 2014.
147. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S *et al*: **Bone morphogenetic proteins: a critical review.** *Cell Signal* 2010, **23**(4):609-620.
148. Song B, Estrada KD, Lyons KM: **Smad signaling in skeletal development and regeneration.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2009, **20**(5-6):379-388.
149. Zhang Y, Chang C, Gehling DJ *et al*: **Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(3):974-979.
150. Murakami G, Watabe T, Takaoka K *et al*: **Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads.** *Mol Biol Cell* 2003, **14**(7):2809-2817.
151. van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, van den Berg WB: **Bone morphogenetic proteins and articular cartilage: To serve and protect or a wolf in sheep clothing's?** *Osteoarthritis Cartilage* 2010, **18**(6):735-741.
152. Dudaric L, Cvek SZ, Cvijanovic O *et al*: **Expression of the BMP-2, -4 and -7 and their antagonists gremlin, chordin, noggin and follistatin during ectopic osteogenesis.** *Coll An-tropol* 2013, **37**(4):1291-1298.
153. Capdevila J, Johnson RL: **Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning.** *Dev Biol* 1998, **197**(2):205-217.

154. Denker AE, Haas AR, Nicoll SB *et al*: **Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures.** *Differentiation* 1999, **64**(2):67-76.
155. Haas AR, Tuan RS: **Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function.** *Differentiation* 1999, **64**(2):77-89.
156. Pizette S, Niswander L: **BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes.** *Dev Biol* 2000, **219**(2):237-249.
157. Shukunami C, Akiyama H, Nakamura T *et al*: **Requirement of autocrine signaling by bone morphogenetic protein-4 for chondrogenic differentiation of ATDC5 cells.** *FEBS Lett* 2000, **469**(1):83-87.
158. Shukunami C, Ohta Y, Sakuda M *et al*: **Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5.** *Exp Cell Res* 1998, **241**(1):1-11.
159. Ito H, Akiyama H, Shigeno C *et al*: **Noggin and bone morphogenetic protein-4 coordinately regulate the progression of chondrogenic differentiation in mouse clonal EC cells, ATDC5.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **260**(1):240-244.
160. Pogue R, Lyons K: **BMP signaling in the cartilage growth plate.** *Curr Top Dev Biol* 2006, **76**:1-48.
161. Caron MM, Emans PJ, Cremers A *et al*: **Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7.** *Osteoarthritis Cartilage* 2013, **21**(4):604-613.
162. Minina E, Schneider S, Rosowski M *et al*: **Expression of Fgf and Tgfbeta signaling related genes during embryonic endochondral ossification.** *Gene Expr Patterns* 2005, **6**(1):102-109.
163. Minina E, Wenzel HM, Kreschel C *et al*: **BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation.** *Development* 2001, **128**(22):4523-4534.
164. Haaijman A, D'Souza RN, Bronckers AL *et al*: **OP-1 (BMP-7) affects mRNA expression of type I, II, X collagen, and matrix Gla protein in ossifying long bones in vitro.** *J Bone Miner Res* 1997, **12**(11):1815-1823.
165. Zou H, Wieser R, Massague J *et al*: **Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage.** *Genes Dev* 1997, **11**(17):2191-2203.
166. De Luca F, Barnes KM, Uyeda JA *et al*: **Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2.** *Endocrinology* 2001, **142**(1):430-436.
167. Pathi S, Rutenberg JB, Johnson RL *et al*: **Interaction of Ihh and BMP/Noggin signaling during cartilage differentiation.** *Dev Biol* 1999, **209**(2):239-253.



168. Pan Q, Wu Y, Lin T *et al*: **Bone morphogenetic protein-2 induces chromatin remodeling and modification at the proximal promoter of Sox9 gene.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **379**(2):356-361.
169. Zhao L, Li G, Zhou GQ: **SOX9 directly binds CREB as a novel synergism with the PKA pathway in BMP-2-induced osteochondrogenic differentiation.** *J Bone Miner Res* 2009, **24**(5):826-836.
170. Uusitalo H, Hiltunen A, Ahonen M *et al*: **Accelerated up-regulation of L-Sox5, Sox6, and Sox9 by BMP-2 gene transfer during murine fracture healing.** *J Bone Miner Res* 2001, **16**(10):1837-1845.
171. Pan Q, Yu Y, Chen Q *et al*: **Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter.** *Journal of cellular physiology* 2008, **217**(1):228-241.
172. Retting KN, Song B, Yoon BS *et al*: **BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation.** *Development* 2009, **136**(7):1093-1104.
173. Leboy P, Grasso-Knight G, D'Angelo M *et al*: **Smad-Runx interactions during chondrocyte maturation.** *J Bone Joint Surg Am* 2001, **83-A Suppl 1**(Pt 1):S15-22.
174. Leboy PS: **Regulating bone growth and development with bone morphogenetic proteins.** *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1068**:14-18.
175. Chen AL, Fang C, Liu C *et al*: **Expression of bone morphogenetic proteins, receptors, and tissue inhibitors in human fetal, adult, and osteoarthritic articular cartilage.** *J Orthop Res* 2004, **22**(6):1188-1192.
176. Bandyopadhyay A, Yadav PS, Prashar P: **BMP signaling in development and diseases: a pharmacological perspective.** *Biochem Pharmacol* 2013, **85**(7):857-864.
177. Haversath M, Catelas I, Li X *et al*: **PGE(2) and BMP-2 in bone and cartilage metabolism: 2 intertwining pathways.** *Can J Physiol Pharmacol* 2012, **90**(11):1434-1445.
178. Nakase T, Miyaji T, Tomita T *et al*: **Localization of bone morphogenetic protein-2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte.** *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11**(4):278-284.
179. Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ *et al*: **Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes.** *J Bone Joint Surg Am* 2003, **85-A Suppl 3**:59-66.
180. Dell'Accio F, De Bari C, El Tawil NM *et al*: **Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury.** *Arthritis Res Ther* 2006, **8**(5):R139.
181. Tardif G, Hum D, Pelletier JP *et al*: **Differential gene expression and regulation of the bone morphogenetic protein antagonists follistatin and gremlin in normal and osteoarthritic human chondrocytes and synovial fibroblasts.** *Arthritis and rheumatism* 2004, **50**(8):2521-2530.

182. Tardif G, Pelletier JP, Boileau C *et al*: **The BMP antagonists follistatin and gremlin in normal and early osteoarthritic cartilage: an immunohistochemical study.** *Osteoarthritis Cartilage* 2009, **17**(2):263-270.
183. Kaiser M, Haag J, Soder S *et al*: **Bone morphogenetic protein and transforming growth factor beta inhibitory Smads 6 and 7 are expressed in human adult normal and osteoarthritic cartilage in vivo and are differentially regulated in vitro by interleukin-1beta.** *Arthritis and rheumatism* 2004, **50**(11):3535-3540.
184. Reddi AH: **Interplay between bone morphogenetic proteins and cognate binding proteins in bone and cartilage development: noggin, chordin and DAN.** *Arthritis Res* 2001, **3**(1):1-5.
185. Lories RJ, Daans M, Derese I *et al*: **Noggin haploinsufficiency differentially affects tissue responses in destructive and remodeling arthritis.** *Arthritis and rheumatism* 2006, **54**(6):1736-1746.
186. Blaney Davidson EN, Vitters EL, van Lent PL *et al*: **Elevated extracellular matrix production and degradation upon bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) stimulation point toward a role for BMP-2 in cartilage repair and remodeling.** *Arthritis Res Ther* 2007, **9**(5):R102.
187. Tchetina EV, Squires G, Poole AR: **Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions.** *The Journal of rheumatology* 2005, **32**(5):876-886.
188. Majumdar MK, Chockalingam PS, Bhat RA *et al*: **Immortalized mouse articular cartilage cell lines retain chondrocyte phenotype and respond to both anabolic factor BMP-2 and pro-inflammatory factor IL-1.** *Journal of cellular physiology* 2008, **215**(1):68-76.
189. Hou CH, Hsiao YC, Fong YC *et al*: **Bone morphogenetic protein-2 enhances the motility of chondrosarcoma cells via activation of matrix metalloproteinase-13.** *Bone* 2009, **44**(2):233-242.
190. Fan Z, Chubinskaya S, Rueger DC *et al*: **Regulation of anabolic and catabolic gene expression in normal and osteoarthritic adult human articular chondrocytes by osteogenic protein-1.** *Clinical and experimental rheumatology* 2004, **22**(1):103-106.
191. Moon RT, Shah K: **Developmental biology: signalling polarity.** *Nature* 2002, **417**(6886):239-240.
192. Clevers H: **Wnt/beta-catenin signaling in development and disease.** *Cell* 2006, **127**(3):469-480.
193. Holmen SL, Salic A, Zylstra CR *et al*: **A novel set of Wnt-Frizzled fusion proteins identifies receptor components that activate beta -catenin-dependent signaling.** *J Biol Chem* 2002, **277**(38):34727-34735.
194. Holmen SL, Robertson SA, Zylstra CR *et al*: **Wnt-independent activation of beta-catenin mediated by a Dkk1-Fz5 fusion protein.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **328**(2):533-539.

195. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV *et al*: **WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies**. *Nat Rev Genet* 2004, **5**(9):691-701.
196. Miller JR: **The Wnts**. *Genome Biol* 2002, **3**(1):REVIEWS3001.
197. Jones SE, Jomary C: **Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns**. *Bioessays* 2002, **24**(9):811-820.
198. Zorn AM: **Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs**. *Curr Biol* 2001, **11**(15):R592-595.
199. Mao B, Wu W, Davidson G *et al*: **Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling**. *Nature* 2002, **417**(6889):664-667.
200. Yates KE, Shortkroff S, Reish RG: **Wnt influence on chondrocyte differentiation and cartilage function**. *DNA Cell Biol* 2005, **24**(7):446-457.
201. Church V, Nohno T, Linker C *et al*: **Wnt regulation of chondrocyte differentiation**. *J Cell Sci* 2002, **115**(Pt 24):4809-4818.
202. Yeung Tsang K, Wa Tsang S, Chan D *et al*: **The chondrocytic journey in endochondral bone growth and skeletal dysplasia**. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2014, **102**(1):52-73.
203. Las Heras F, Gahunia HK, Pritzker KP: **Articular cartilage development: a molecular perspective**. *Orthop Clin North Am* 2012, **43**(2):155-171, v.
204. Yano F, Kugimiya F, Ohba S *et al*: **The canonical Wnt signaling pathway promotes chondrocyte differentiation in a Sox9-dependent manner**. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **333**(4):1300-1308.
205. Wang L, Shao YY, Ballock RT: **Thyroid hormone interacts with the Wnt/beta-catenin signaling pathway in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes**. *J Bone Miner Res* 2007, **22**(12):1988-1995.
206. Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y *et al*: **Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation**. *Genes Dev* 2004, **18**(9):1072-1087.
207. Chun JS, Oh H, Yang S *et al*: **Wnt signaling in cartilage development and degeneration**. *BMB Rep* 2008, **41**(7):485-494.
208. Reinhold MI, Kapadia RM, Liao Z *et al*: **The Wnt-inducible transcription factor Twist1 inhibits chondrogenesis**. *J Biol Chem* 2006, **281**(3):1381-1388.
209. Ryu JH, Kim SJ, Kim SH *et al*: **Regulation of the chondrocyte phenotype by beta-catenin**. *Development* 2002, **129**(23):5541-5550.
210. Hwang SG, Yu SS, Lee SW *et al*: **Wnt-3a regulates chondrocyte differentiation via c-Jun/AP-1 pathway**. *FEBS Lett* 2005, **579**(21):4837-4842.
211. Yang Y, Topol L, Lee H *et al*: **Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation**. *Development* 2003, **130**(5):1003-1015.

212. Dao DY, Jonason JH, Zhang Y *et al*: **Cartilage-specific beta-catenin signaling regulates chondrocyte maturation, generation of ossification centers, and perichondrial bone formation during skeletal development.** *J Bone Miner Res* 2012, **27**(8):1680-1694.
213. Tamamura Y, Otani T, Kanatani N *et al*: **Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification.** *J Biol Chem* 2005, **280**(19):19185-19195.
214. Dong Y, Drissi H, Chen M *et al*: **Wnt-mediated regulation of chondrocyte maturation: modulation by TGF-beta.** *J Cell Biochem* 2005, **95**(5):1057-1068.
215. Dong YF, Soung do Y, Schwarz EM *et al*: **Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor.** *Journal of cellular physiology* 2006, **208**(1):77-86.
216. Daumer KM, Tufan AC, Tuan RS: **Long-term in vitro analysis of limb cartilage development: involvement of Wnt signaling.** *J Cell Biochem* 2004, **93**(3):526-541.
217. Hartmann C, Tabin CJ: **Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb.** *Development* 2000, **127**(14):3141-3159.
218. Staines KA, Macrae VE, Farquharson C: **Cartilage development and degeneration: a Wnt Wnt situation.** *Cell Biochem Funct* 2012, **30**(8):633-642.
219. Wu Q, Zhu M, Rosier RN *et al*: **Beta-catenin, cartilage, and osteoarthritis.** *Ann N Y Acad Sci* 2010, **1192**:344-350.
220. Kawaguchi H: **Regulation of osteoarthritis development by Wnt-beta-catenin signaling through the endochondral ossification process.** *J Bone Miner Res* 2009, **24**(1):8-11.
221. Zhu S, Liu H, Wu Y *et al*: **Wnt and Rho GTPase signaling in osteoarthritis development and intervention: implications for diagnosis and therapy.** *Arthritis Res Ther* 2013, **15**(4):217.
222. Nakamura Y, Nawata M, Wakitani S: **Expression profiles and functional analyses of Wnt-related genes in human joint disorders.** *Am J Pathol* 2005, **167**(1):97-105.
223. Dell'accio F, De Bari C, Eltawil NM *et al*: **Identification of the molecular response of articular cartilage to injury, by microarray screening: Wnt-16 expression and signaling after injury and in osteoarthritis.** *Arthritis and rheumatism* 2008, **58**(5):1410-1421.
224. James IE, Kumar S, Barnes MR *et al*: **FrzB-2: a human secreted frizzled-related protein with a potential role in chondrocyte apoptosis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2000, **8**(6):452-463.
225. Yuasa T, Otani T, Koike T *et al*: **Wnt/beta-catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration.** *Lab Invest* 2008, **88**(3):264-274.
226. Loughlin J, Mustafa Z, Dowling B *et al*: **Finer linkage mapping of a primary hip osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 6.** *Eur J Hum Genet* 2002, **10**(9):562-568.

227. Smith AJ, Gidley J, Sandy JR *et al*: **Haplotypes of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene: are they a risk factor in osteoarthritis?** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**(7):608-613.
228. Balemans W, Van Hul W: **The genetics of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in bone: a story of extremes.** *Endocrinology* 2007, **148**(6):2622-2629.
229. Loughlin J, Dowling B, Chapman K *et al*: **Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(26):9757-9762.
230. Lane NE, Lian K, Nevitt MC *et al*: **Frizzled-related protein variants are risk factors for hip osteoarthritis.** *Arthritis and rheumatism* 2006, **54**(4):1246-1254.
231. Diarra D, Stolina M, Polzer K *et al*: **Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling.** *Nat Med* 2007, **13**(2):156-163.
232. Lories RJ, Peeters J, Bakker A *et al*: **Articular cartilage and biomechanical properties of the long bones in Frzb-knockout mice.** *Arthritis and rheumatism* 2007, **56**(12):4095-4103.
233. Pasold J, Osterberg A, Peters K *et al*: **Reduced expression of Sfrp1 during chondrogenesis and in articular chondrocytes correlates with osteoarthritis in STR/ort mice.** *Exp Cell Res*, **319**(5):649-659.
234. Zhu M, Tang D, Wu Q *et al*: **Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice.** *J Bone Miner Res* 2009, **24**(1):12-21.
235. Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**(2):281-297.
236. Lytle JR, Yario TA, Steitz JA: **Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(23):9667-9672.
237. Friedman RC, Farh KK, Burge CB *et al*: **Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.** *Genome Res* 2009, **19**(1):92-105.
238. Li C, Feng Y, Coukos G *et al*: **Therapeutic microRNA strategies in human cancer.** *Aaps J* 2009, **11**(4):747-757.
239. Lee Y, Jeon K, Lee JT *et al*: **MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization.** *Embo J* 2002, **21**(17):4663-4670.
240. Lee Y, Kim M, Han J *et al*: **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *Embo J* 2004, **23**(20):4051-4060.
241. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR: **Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs.** *Rna* 2004, **10**(12):1957-1966.
242. Han J, Lee Y, Yeom KH *et al*: **The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing.** *Genes Dev* 2004, **18**(24):3016-3027.

243. Lund E, Guttinger S, Calado A *et al*: **Nuclear export of microRNA precursors**. *Science* 2004, **303**(5654):95-98.
244. Winter J, Jung S, Keller S *et al*: **Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation**. *Nat Cell Biol* 2009, **11**(3):228-234.
245. Calin GA, Croce CM: **MicroRNA signatures in human cancers**. *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(11):857-866.
246. Kozomara A, Griffiths-Jones S: **miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data**. *Nucleic Acids Res* 2011, **39**(Database issue):D152-157.
247. Miyaki S, Asahara H: **Macro view of microRNA function in osteoarthritis**. *Nat Rev Rheumatol* 2012, **8**(9):543-552.
248. Le LT, Swingle TE, Clark IM: **Review: the role of microRNAs in osteoarthritis and chondrogenesis**. *Arthritis and rheumatism* 2013, **65**(8):1963-1974.
249. Harfe BD, McManus MT, Mansfield JH *et al*: **The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(31):10898-10903.
250. Kobayashi T, Lu J, Cobb BS *et al*: **Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(6):1949-1954.
251. Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S *et al*: **The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells**. *FEBS Lett* 2006, **580**(17):4214-4217.
252. Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E *et al*: **MicroRNA expression in zebrafish embryonic development**. *Science* 2005, **309**(5732):310-311.
253. Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S *et al*: **MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses**. *Arthritis and rheumatism* 2009, **60**(9):2723-2730.
254. Lin L, Shen Q, Zhang C *et al*: **Assessment of the profiling microRNA expression of differentiated and dedifferentiated human adult articular chondrocytes**. *J Orthop Res* 2011, **29**(10):1578-1584.
255. Yamashita S, Miyaki S, Kato Y *et al*: **L-Sox5 and Sox6 proteins enhance chondrogenic miR-140 microRNA expression by strengthening dimeric Sox9 activity**. *J Biol Chem* 2012, **287**(26):22206-22215.
256. Yang J, Qin S, Yi C *et al*: **MiR-140 is co-expressed with Wwp2-C transcript and activated by Sox9 to target Sp1 in maintaining the chondrocyte proliferation**. *FEBS Lett* 2011, **585**(19):2992-2997.
257. Nakamura Y, He X, Kato H *et al*: **Sox9 is upstream of microRNA-140 in cartilage**. *Appl Biochem Biotechnol* 2012, **166**(1):64-71.
258. Pais H, Nicolas FE, Soond SM *et al*: **Analyzing mRNA expression identifies Smad3 as a microRNA-140 target regulated only at protein level**. *Rna* 2010, **16**(3):489-494.

259. Nakamura Y, Inloes JB, Katagiri T *et al*: **Chondrocyte-specific microRNA-140 regulates endochondral bone development and targets Dnpep to modulate bone morphogenetic protein signaling.** *Mol Cell Biol* 2011, **31**(14):3019-3028.
260. Nicolas FE, Pais H, Schwach F *et al*: **mRNA expression profiling reveals conserved and non-conserved miR-140 targets.** *RNA Biol* 2011, **8**(4):607-615.
261. Tardif G, Hum D, Pelletier JP *et al*: **Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes.** *BMC Musculoskelet Disord* 2009, **10**:148.
262. Miyaki S, Sato T, Inoue A *et al*: **MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis.** *Genes Dev* 2010, **24**(11):1173-1185.
263. Liang ZJ, Zhuang H, Wang GX *et al*: **MiRNA-140 is a negative feedback regulator of MMP-13 in IL-1beta-stimulated human articular chondrocyte C28/I2 cells.** *Inflamm Res* 2012, **61**(5):503-509.
264. Mansell JP, Tarlton JF, Bailey AJ: **Biochemical evidence for altered subchondral bone collagen metabolism in osteoarthritis of the hip.** *British journal of rheumatology* 1997, **36**(1):16-19.
265. Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG *et al*: **Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II.** *Arthritis and rheumatism* 2008, **58**(1):26-35.
266. Wang M, Shen J, Jin H *et al*: **Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis.** *Ann N Y Acad Sci* 2011, **1240**:61-69.
267. Goldring MB, Marcu KB: **Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis.** *Trends Mol Med* 2011, **18**(2):109-118.
268. Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E *et al*: **Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives.** *J Dent Res* 2014, **93**(4):335-345.
269. Long F, Ornitz DM: **Development of the endochondral skeleton.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013, **5**(1):a008334.
270. Rodriguez-Merchan EC: **Regeneration of articular cartilage of the knee.** *Rheumatol Int* 2013, **33**(4):837-845.
271. Bian Q, Wang YJ, Liu SF *et al*: **Osteoarthritis: genetic factors, animal models, mechanisms, and therapies.** *Front Biosci (Elite Ed)* 2012, **4**:74-100.
272. Biver E, Hardouin P, Caverzasio J: **The "bone morphogenetic proteins" pathways in bone and joint diseases: translational perspectives from physiopathology to therapeutic targets.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2013, **24**(1):69-81.
273. Albilal JB, Tenenbaum HC, Clokie CM *et al*: **Serum levels of BMP-2, 4, 7 and AHSG in patients with degenerative joint disease requiring total arthroplasty of the hip and temporomandibular joints.** *J Orthop Res* 2013, **31**(1):44-52.
274. De Biase P, Capanna R: **Clinical applications of BMPs.** *Injury* 2005, **36 Suppl 3**:S43-46.

275. Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter DJ, Sier CF *et al*: **Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing**. *Int Orthop* 2011, **35**(9):1271-1280.
276. Govender S, Csimma C, Genant HK *et al*: **Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients**. *J Bone Joint Surg Am* 2002, **84-A**(12):2123-2134.
277. Blaney Davidson EN, Vitters EL, van Beuningen HM *et al*: **Resemblance of osteophytes in experimental osteoarthritis to transforming growth factor beta-induced osteophytes: limited role of bone morphogenetic protein in early osteoarthritic osteophyte formation**. *Arthritis and rheumatism* 2007, **56**(12):4065-4073.
278. Blaney Davidson EN, Vitters EL, Blom AB *et al*: **A5.18 BMP2 requires TGF-BETA to induce osteophytes during experimental osteoarthritis**. *Ann Rheum Dis* 2014, **73** Suppl 1:A70.
279. Blaney Davidson EN, Vitters EL, Bennink MB *et al*: **Inducible chondrocyte-specific over-expression of BMP2 in young mice results in severe aggravation of osteophyte formation in experimental OA without altering cartilage damage**. *Ann Rheum Dis* 2014.
280. Lodewyckx L, Luyten FP, Lories RJ: **Genetic deletion of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 increases cartilage degradation in instability-induced osteoarthritis**. *Rheumatology (Oxford)* 2012, **51**(11):1973-1978.
281. Shin Y, Huh YH, Kim K *et al*: **Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 governs Wnt-mediated osteoarthritic cartilage destruction**. *Arthritis Res Ther* 2014, **16**(1):R37.
282. Koay MA, Brown MA: **Genetic disorders of the LRP5-Wnt signalling pathway affecting the skeleton**. *Trends Mol Med* 2005, **11**(3):129-137.
283. Sharma AR, Jagga S, Lee SS *et al*: **Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis**. *Int J Mol Sci* 2013, **14**(10):19805-19830.
284. Findlay DM, Atkins GJ: **Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis**. *Curr Osteoporos Rep* 2014, **12**(1):127-134.
285. Funck-Brentano T, Cohen-Solal M: **Crosstalk between cartilage and bone: when bone cytokines matter**. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011, **22**(2):91-97.
286. Nakashima A, Katagiri T, Tamura M: **Cross-talk between Wnt and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) signaling in differentiation pathway of C2C12 myoblasts**. *J Biol Chem* 2005, **280**(45):37660-37668.
287. Mbalaviele G, Sheikh S, Stains JP *et al*: **Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation**. *J Cell Biochem* 2005, **94**(2):403-418.
288. Bain G, Muller T, Wang X *et al*: **Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction**. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **301**(1):84-91.
289. Zhang M, Yan Y, Lim YB *et al*: **BMP-2 modulates beta-catenin signaling through stimulation of Lrp5 expression and inhibition of beta-TrCP expression in osteoblasts**. *J Cell Biochem* 2009, **108**(4):896-905.



290. Chen Y, Whetstone HC, Youn A *et al*: **Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation**. *J Biol Chem* 2007, **282**(1):526-533.
291. Yun K, Im SH: **Transcriptional regulation of MMP13 by Lef1 in chondrocytes**. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **364**(4):1009-1014.
292. Zheng Q, Zhou G, Morello R *et al*: **Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo**. *J Cell Biol* 2003, **162**(5):833-842.
293. Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M *et al*: **Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation**. *J Biol Chem* 2000, **275**(12):8695-8702.
294. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K *et al*: **Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability**. *Arthritis and rheumatism* 2006, **54**(8):2462-2470.
295. Vislovukh A, Vargas TR, Poleskaya A *et al*: **Role of 3'-untranslated region translational control in cancer development, diagnostics and treatment**. *World J Biol Chem* 2014, **5**(1):40-57.
296. McAlinden A, Varghese N, Wirthlin L *et al*: **Differentially expressed microRNAs in chondrocytes from distinct regions of developing human cartilage**. *PLoS One* 2013, **8**(9):e75012.
297. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W: **Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?** *Trends Cell Biol* 2007, **17**(3):118-126.