



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

*Π.Μ.Σ. : «ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»*

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ**  
**ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ**  
**ΤΟΥ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ ΣΤΗΝ ΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΗ**  
**ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ: Η ΟΣΤΕΟΝΕΚΤΙΝΗ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΑΛΙΑΝΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ**

Βιολόγος

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ**

Λάρισα 2012

# ***Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή***

**κ. Γερμενής Αναστάσιος**  
**Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας**



**κ. Μαλίζος Κωνσταντίνος**  
**Καθηγητής Ορθοπαιδικής**



**κα. Τσέζου Ασπασία**  
**Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ  
ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ  
ΤΟΥ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ ΣΤΗΝ ΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΗ  
ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ: Η ΟΣΤΕΟΝΕΚΤΙΝΗ**

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

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

Θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου στη διδάκτορα Τιμόκλεια Ορφανίδου, καθώς και στις υποψήφιους διδάκτορες Παπαθανασίου Ιωάννα, Κωστοπούλου Φωτεινή και Εύη Μουρμούρα για τη συμβουλευτική καθοδήγηση και τη μύησή μου στη μεθοδολογία της εργαστηριακής έρευνας. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους συναδέλφους στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής με τους οποίους συνεργάστηκα αρμονικά καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Παλιανοπούλου Μαρία  
Λάρισα, 10 Ιουλίου 2012

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	v
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	vi
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	1
ABSTRACT .....	3
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	5
A.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	6
A.1.1. Η οστεονεκτίνη .....	7
A.1.1.1.1. Το γονίδιο της οστεονεκτίνης .....	8
A.1.1.1.2. Η πρωτεΐνη της οστεονεκτίνης .....	10
A.1.2. Ο ρόλος της οστεονεκτίνης στην εξωκυττάρια ουσία των ιστών .....	11
A.1.2.1. Ο ρόλος της οστεονεκτίνης στην αναδόμηση της ECM .....	11
A.1.2.1.1. Η αλληλεπίδραση της οστεονεκτίνης με τα δομικά συστατικά της ECM ..	12
A.1.2.1.1α. Η αλληλεπίδραση της οστεονεκτίνης με το κολλαγόνο .....	12
A.1.2.1.1β. Η αλληλεπίδραση της οστεονεκτίνης με άλλα δομικά συστατικά της ECM	13
A.1.2.1.2. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στις MMPs .....	14
A.1.2.2. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στους αυξητικούς παράγοντες .....	14
A.1.2.2.1. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στον TGF-β .....	15
A.1.2.2.2. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στον FGF-2 .....	16
A.1.2.2.3. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στον VEGF .....	17
A.1.2.2.4. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στους αυξητικούς παράγοντες IGF-1 και PDGF .....	18
A.1.2.3. Η πρόσδεση της οστεονεκτίνης σε υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας .....	18
A.1.2.3.1. Οι υποδοχείς ιντεγκρινών .....	28
A.1.2.3.2. Η πρωτεΐνη προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων 1 (VCAM-1) .....	19
A.1.2. 4. Σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγει η οστεονεκτίνη .....	20
A.1.2.4.1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη .....	20
A.1.2.4.2. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια PI3K/Akt και MAPK .....	28
A.1.2.5. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στην επιβίωση των κυττάρων .....	21
A.1.3. Ο ρόλος της οστεονεκτίνης στα οστά .....	22

A.1.4. Ο ρόλος της οστεονεκτίνης στο λιπώδη ιστό .....	23
A.1.5. Σκοπός .....	25
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	26
B.1. Υλικό και μέθοδοι.....	27
B.1.1. Συλλογή δειγμάτων.....	27
B.1.2. Καλλιέργεια χονδροκυττάρων.....	28
B.1.2.1. Απομόνωση χονδροκυττάρων.....	28
B.1.2.2. Ανακαλλιέργεια χονδροκυττάρων .....	30
B.1.2.3. Κατάψυξη και απόψυξη χονδροκυττάρων .....	31
B.1.3. Απομόνωση RNA από χονδροκύτταρα.....	32
B.1.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) .....	34
B.1.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου .....	36
B.1.6. Απομόνωση πρωτεΐνης από χονδροκύτταρα.....	38
B.1.7. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	40
B.1.8. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot) .....	41
B.1.9. Επίδραση με οστεονεκτίνη (rhSPARC) .....	44
B.1.10. Γονιδιακή αποσιώπηση με siRNA .....	44
B.1.10.1. Γονιδιακή αποσιώπηση του RUNX2 με siRNA .....	47
B.1.11. Στατιστική ανάλυση .....	48
B.2. Αποτελέσματα .....	49
B.2.1. Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου <i>SPARC</i> σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά (OA) χονδροκύτταρα καλλιέργειας .....	49
B.2.2. Μελέτη των επιπέδων της ενεργούς μορφής της β-κατενίνης σε OA χονδροκύτταρα καλλιέργειας μετά από εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης.....	49
B.2.3. Μελέτη της έκφρασης του RUNX2 mRNA σε OA χονδροκύτταρα καλλιέργειας μετά από εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης .....	50
B.2.4. Μελέτη της έκφρασης του OC mRNA σε OA χονδροκύτταρα καλλιέργειας μετά από εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης .....	51
B.2.5. Μελέτη της έκφρασης του mRNA των MMP-9 και MMP-13 σε OA χονδροκύτταρα καλλιέργειας μετά από εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης.....	52
B.2.6. Μελέτη της έκφρασης του mRNA της λεπτίνης και του υποδοχέα της, Ob-Rb, σε OA χονδροκύτταρα καλλιέργειας μετά από εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης	

B.2.7. Μελέτη της έκφρασης του mRNA των SREBP-2 και SREBP-1c σε ΟΑ χονδροκύτταρα καλλιέργειας μετά από εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης.....	53
B.2.8. Μελέτη της έκφρασης του mRNA των OC, MMP-9 και MMP-13 σε ΟΑ χονδροκύτταρα καλλιέργειας μετά από επιμόλυνση με siRNA κατά του RUNX2 και παράλληλη εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης.....	54
B.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εκφυλιστική αρθρίτιδα, γνωστή και ως οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ), αποτελεί μία από τις πιο κοινές μορφές χρόνιας μυοσκελετικής νόσου και την κύρια αιτία σωματικής αναπηρίας στην τρίτη ηλικία. Το κύριο χαρακτηριστικό της ΟΑ είναι ο προοδευτικός εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου, του ιστού που καλύπτει τα οστά που έρχονται σε επαφή σε μία άρθρωση. Τα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας του αρθρικού χόνδρου έχει βρεθεί ότι, εκτός από τις μοναδικές εμβιομηχανικές ιδιότητες που παρέχουν στον ιστό, συμβάλλουν και στην πρόοδο και στην εξέλιξη της ΟΑ.

Η οστεονεκτίνη, γνωστή και ως SPARC, είναι μία κυτταροθεμελιακή πρωτεΐνη που συναντάται στην ECM του αρθρικού χόνδρου κι έχει την ικανότητα να διαμεσολαβεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και της ECM, συμμετέχοντας σε διεργασίες που απαιτούν αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις αυτές είτε σε φυσιολογικές είτε σε παθολογικές καταστάσεις. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να ρυθμίζει μέσω του μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -κατενίνης τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε οστεοβλάστες, ενώ αναστέλλει τη διαφοροποίησή τους σε λιποκύτταρα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της πιθανής συμμετοχής της οστεονεκτίνης στην παθοφυσιολογία και στην εξέλιξη της ΟΑ και συγκεκριμένα, στο μηχανισμό της υπερτροφίας που λαμβάνει χώρα στα τελευταία στάδια της νόσου και στη μεταβολική συνιστώσα της ΟΑ.

Για τη διεκπεραίωση της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 28 δείγματα αρθρικού χόνδρου ασθενών που νοσηλεύτηκαν στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Την ομάδα μελέτης αποτέλεσαν δείγματα αρθρικού χόνδρου από ασθενείς που υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική γόνατος λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ (n=20) και την ομάδα ελέγχου δείγματα αρθρικού χόνδρου (n=8) από άτομα που νοσηλεύτηκαν για ακρωτηριασμούς ή σοβαρά κατάγματα. Τα δείγματα του αρθρικού χόνδρου χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και την καλλιέργεια χονδροκυττάρων. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων SPARC, RUNX2, της οστεοκαλσίνης (OC), των μεταλλοπρωτεασών MMP-9 και MMP-13, της λεπτίνης (Ob) και του υποδοχέα της Ob-Rb, των μεταγραφικών παραγόντων SREBP-2 και SREBP-1c και της πρωτεΐνης  $\beta$ -κατενίνης σε επίπεδο μεταγραφής και πρωτεΐνης



προσδιορίστηκαν με τις μεθόδους της real-time PCR και Western Blot, αντίστοιχα. Επίσης, με τη μέθοδο της γονιδιακής αποσιώπησης με siRNA αξιολογήθηκε η συμβολή του μεταγραφικού παράγοντα RUNX2 στην έκφραση του γονιδίου της OC και των ενζύμων MMP-9 και MMP-13.

Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της οστεονεκτίνης αυξάνεται στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά κύτταρα. Τα επίπεδα της ενεργούς μορφής της β-κατενίνης, τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα RUNX2 και του mRNA της οστεοκαλσίνης και των MMPs αυξήθηκαν μετά από την εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης σε OA χονδροκύτταρα. Ωστόσο, η πρωτεΐνη είχε αρνητική δράση στην έκφραση των γονιδίων *Ob*, *Ob-Rb*, *SREBP-2* και *SREBP-1c*, καθώς οδήγησε σε μείωση της έκφρασής τους σε επίπεδο μεταγραφής. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι η αποσιώπηση του γονιδίου *RUNX2* με παράλληλη εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων του mRNA της οστεοκαλσίνης και των MMPs σε OA χονδροκύτταρα.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι η κυτταροθεμελιακή πρωτεΐνη οστεονεκτίνη συμμετέχει στην παθογένεια της OA. Συγκεκριμένα, η οστεονεκτίνη φαίνεται ότι ενισχύει τον υπερτροφικό φαινότυπο του αρθρικού χόνδρου που παρατηρείται στα τελευταία στάδια ανάπτυξης της νόσου μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης και της επαγωγής της έκφρασης γονιδίων που ενέχονται στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά, αλλά αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που ενέχονται στη μεταβολική συνιστώσα της νόσου.

# ABSTRACT

Degenerative arthritis, also known as osteoarthritis (OA), is one of the most common forms of musculoskeletal disease and the leading cause of disability among the elderly. The main characteristic of OA is the progressive degeneration of articular cartilage, the connective tissue that covers the ends of the bones in a joint. Articular cartilage's extracellular matrix molecules, apart from the unique mechanical properties that offer to the tissue, have been found to contribute to the disease's progression.

Osteonectin, also known as SPARC, is a matricellular protein found in articular cartilage's ECM and is able of modulating the interactions between the cells and the ECM, participating in processes that require changes in these interactions under normal or pathological conditions. A recent study has shown that SPARC has the ability to regulate, through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, cells' differentiation into osteoblasts, whereas to inhibit their differentiation into adipocytes. The aim of the present study was to investigate the possible implication of SPARC in the pathophysiology and the progression of OA and particularly, in the mechanism of hypertrophy that takes place at the late stages of the disease as well as in the metabolic aspect of OA.

In the present study, 20 articular cartilage samples have been obtained from patients undergoing knee replacement surgery as well as 8 normal cartilage samples from individuals undergoing injury and fracture repair surgery, with no history of joint disease, in collaboration with the Orthopaedic Department of University Hospital of Larissa. Chondrocytes were isolated from the tissues and were cultured. The gene expression profile of *SPARC*, *RUNX2*, *OC*, *MMP-9*, *MMP-13*, *Ob*, *Ob-Rb*, *SREBP-2* and *SREBP-2* and the levels of the active form of  $\beta$ -catenin were assessed by real-time PCR and Western Blot. Moreover, siRNA-mediated gene silencing was used in order to evaluate the contribution of transcriptional factor RUNX2 to OC expression.

Our results showed that the expression levels of SPARC are upregulated in OA chondrocytes compared to normal cells. Furthermore, SPARC administration in OA chondrocytes led to increased levels of the active form of  $\beta$ -catenin, the expression levels of RUNX2 and the mRNA expression levels of OC, MMP-9 and MMP-13. However, our results showed a significant decrease in the mRNA expression levels of

Ob, Ob-Rb, SREBP-2 and SREBP-1c. Finally, simultaneous siRNA-mediated RUNX2 silencing and SPARC administration led to significant decrease in mRNA expression levels of OC, MMP-9 and MMP-13 in OA chondrocytes.

In conclusion, the results of the present study show, for the first time, that the matrix-cellular protein SPARC is involved in OA pathogenesis. Particularly, SPARC probably enhances the hypertrophic phenotype characterizing the articular cartilage at the late stages of the disease by regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and induces the expression of genes that are involved in hypertrophic chondrocyte differentiation, but it inhibits the expression of genes implicated in the metabolic aspect of OA.

## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## A.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εκφυλιστική αρθρίτιδα, γνωστή και ως οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) ή εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων, αποτελεί μία από τις πιο κοινές μορφές χρόνιας μυοσκελετικής νόσου και την κύρια αιτία σωματικής αναπηρίας στην τρίτη ηλικία παγκοσμίως.<sup>1</sup> Στην Ελλάδα, μελέτη προερχόμενη από το Ελληνικό Ίδρυμα Ρευματολογικών Ερευνών έδειξε ότι περίπου το 13,1% των ενηλίκων πάσχει από ΟΑ.<sup>2</sup> Ο επιπολασμός της νόσου αυξάνεται συνεχώς και σύμφωνα με εκτιμήσεις των Ηνωμένων Εθνών αναμένεται ο αριθμός των ατόμων που πάσχουν από ΟΑ να διπλασιαστεί μέχρι το 2020.<sup>3-4</sup>

Το κύριο χαρακτηριστικό της νόσου είναι ο προοδευτικός εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου, του ιστού που καλύπτει τα οστά που έρχονται σε επαφή σε μία άρθρωση. Αλλοιώσεις, όμως, υφίστανται σταδιακά και οι υπόλοιποι ιστοί της άρθρωσης με αποτέλεσμα την ανάπτυξη φλεγμονής στον αρθρικό υμένα (υμενίτιδα), την υπερτροφία του αρθρικού χόνδρου και το σχηματισμό οστεοφύτων, νέου οστού στις παρυφές της άρθρωσης, τον εκφυλισμό του μηνίσκου, την εμφάνιση βλαβών στο υποχόνδριο οστό, την πάχυνση του αρθρικού θύλακα, το μειωμένο ιξώδες του αρθρικού υγρού και την ατροφία των τενόντων και των μυών.<sup>1,5-6</sup>

Οι τυπικές κλινικές εκδηλώσεις της ΟΑ είναι ο έντονος πόνος, η δυσκαμψία και η πλήρη απώλεια της λειτουργίας της άρθρωσης στα τελευταία στάδια της νόσου. Η νόσος μπορεί να προσβάλλει όλες τις αρθρώσεις, αλλά εντοπίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα γόνατα, στα χέρια, στο ισχίο και στην οσφυϊκή και αυχενική μοίρα της σπονδυλικής στήλης.<sup>7</sup>

Η ΟΑ θεωρείται ένα πολυπαραγοντικό νόσημα, καθώς ένα μεγάλο εύρος παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων της ηλικίας, του φύλου, της παχυσαρκίας, της γενετικής προδιάθεσης και εμβιομηχανικών παραγόντων, όπως η αυξημένη επιβάρυνση της άρθρωσης και οι τραυματισμοί, σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Από αυτούς η ηλικία αποτελεί το μείζονα



**Εικόνα 1.** Οι πιο κοινές αρθρώσεις που προσβάλλει η ΟΑ είναι αυτές του γονάτου και των χεριών.

παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου και η συχνότητα εκδήλωσης της ΟΑ αυξάνεται με το πέρας της ηλικίας. Μάλιστα, μελέτες δείχνουν ότι το 80% του πληθυσμού παγκοσμίως θα εμφανίσει ακτινογραφικές ενδείξεις της νόσου στην ηλικία των 65 ετών.<sup>7</sup> Σημαντικούς παράγοντες κινδύνου αποτελούν, επίσης, το φύλο και ο δείκτης μάζας σώματος (BMI). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι γυναίκες εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΑ γόνατος σε σύγκριση με τους άνδρες, ενώ ισχυρή συσχέτιση έχει αναφερθεί και μεταξύ του BMI και της ΟΑ γόνατος.<sup>8-9</sup> Επιπλέον, μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν μόρια του αρθρικού χόνδρου, συμπεριλαμβανομένων των μορίων της ECM, έχουν συσχετιστεί με περιπτώσεις πρόωμης εκδήλωσης της νόσου.<sup>10</sup>

Παρά τα ανωτέρω επιδημιολογικά δεδομένα και τον συνεχώς αυξανόμενο επιπολασμό της νόσου, δεν υπάρχουν μέθοδοι έγκαιρης διάγνωσης και διαθέσιμη αποτελεσματική θεραπεία κατά της ΟΑ, καθώς η ακριβής αιτιολογία και παθογένειά της δεν είναι πλήρως κατανοητές. Οι υπάρχουσες θεραπείες περιορίζονται κυρίως στην ανακούφιση του ασθενούς από τον πόνο και στη βελτίωση της δυσκαμψίας. Η έλλειψη αποτελεσματικής θεραπείας που να αναστέλλει την πρόοδο της νόσου, καθιστά συχνά ως μόνη επιλογή τη χειρουργική αποκατάσταση της προσβληθείσας άρθρωσης στα τελευταία στάδια της νόσου, υποδεικνύοντας την επιτακτική ανάγκη κατανόησης της παθογένειας της ΟΑ.<sup>6</sup>

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα μόρια της ECM του αρθρικού χόνδρου, εκτός από τις μοναδικές εμβιομηχανικές ιδιότητες που παρέχουν στον ιστό, διαδραματίζουν και κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιοστασίας και του μεταβολισμού του. Στην ΟΑ, υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι τα μόρια της ECM του χόνδρου συμμετέχουν στη ρύθμιση διεργασιών, όπως η φλεγμονή, η υπερτροφία, η απόπτωση των χονδροκυττάρων και η διείσδυση των αιμοφόρων αγγείων, που λαμβάνουν χώρα στα διάφορα στάδια ανάπτυξης της νόσου.<sup>10</sup> Ωστόσο, η λειτουργία πολλών από αυτά τα μόρια είναι άγνωστη. Ένα πολλά υποσχόμενο μόριο που έχει βρεθεί ότι υπερ-εκφράζεται στην ECM του ΟΑ χόνδρου, αλλά ο λειτουργικός του ρόλος στον ιστό δεν είναι γνωστός, αποτελεί η κυτταροθεμελιακή πρωτεΐνη οστεονεκτίνη (SPARC).<sup>11</sup>

### A.1.1. Η οστεονεκτίνη

Η οστεονεκτίνη, γνωστή και ως SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) ή BM-40 ή πρωτεΐνη 43K, είναι μία πλειοτροπική γλυκοπρωτεΐνη 32-kDa που

συναντάται στην ECM των ιστών. Αρχικά, η οστεονεκτίνη περιγράφηκε ως κύριο μη κολλαγόνο συστατικό των οστών του ανθρώπου και των βοοειδών, αλλά σήμερα είναι γνωστό ότι συναντάται στην ECM πολλών ιστών, συμπεριλαμβανομένου του αρθρικού χόνδρου.<sup>12-13</sup>

Η οστεονεκτίνη αποτελεί μέλος της οικογένειας των κυτταροθεμελιακών πρωτεϊνών, οι οποίες αν και συναντώνται στην ECM των ιστών κατέχουν ρυθμιστικό παρά δομικό ρόλο, καθώς διαμεσολαβούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και της ECM, συμμετέχοντας έτσι στη ρύθμιση πληθώρας βιολογικών διεργασιών.<sup>14-15</sup> Οι κυτταροθεμελιακές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της οστεονεκτίνης, έχουν την ικανότητα να ασκούν επιρροή στη λειτουργία των κυττάρων αλληλεπιδρώντας με τους υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας, τους αυξητικούς παράγοντες, τις κυτταροκίνες, τις πρωτεάσες, καθώς και με δομικά στοιχεία της ECM, όπως το κολλαγόνο. Οι πρωτεΐνες αυτές έχει βρεθεί ότι εκφράζονται κυρίως σε ιστούς που υφίστανται διαδικασίες που απαιτούν αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων ή μεταξύ της ECM και των κυττάρων, όπως η ανανέωση και η ανασύσταση των ιστών και η εμβρυονική ανάπτυξη, διαδραματίζοντας έτσι σημαντικούς ρόλους σε διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την ανάπτυξη των ιστών και την παθογένεια των ασθενειών.<sup>15-16</sup>

Η οστεονεκτίνη έχει βρεθεί ότι εκφράζεται κυρίως κατά το σχηματισμό των ιστών στην εμβρυϊκή ανάπτυξη.<sup>17-21</sup> Ωστόσο, έκφραση της πρωτεΐνης εντοπίζεται και σε ενήλικους ιστούς, οι οποίοι υφίστανται διαδικασίες επιδιόρθωσης ή αναδόμησης, όπως σε περιπτώσεις επούλωσης πληγών, ορισμένων νοσημάτων ή της φυσιολογικής διεργασίας ανανέωσης των ιστών. Παθολογικές καταστάσεις, όπως η αρθρίτιδα, ο διαβήτης, τα νοσήματα των νεφρών και η καρκινική μετάσταση, χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα έκφρασης της.<sup>22</sup>

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

Η οστεονεκτίνη αποτελεί προϊόν του γονιδίου *SPARC* ή *ON*, το οποίο στον άνθρωπο εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 5q31-33<sup>23</sup>, ενώ στον ποντικό στο χρωμόσωμα 11<sup>24</sup>. Το γονίδιο της οστεονεκτίνης εμφανίζει υψηλό βαθμό ομολογίας της αλληλουχίας και της οργάνωσής του στα σπονδυλωτά. Για παράδειγμα, η αλληλουχία του γονιδίου του ανθρώπου εμφανίζει 92% ομολογία με την αντίστοιχη του ποντικού.<sup>13</sup>

Στον άνθρωπο, το γονίδιο *SPARC* έχει μέγεθος 25.9 kb και αποτελείται από 10 εξώνια. Το πρώτο εξώνιο του γονιδίου εντοπίζεται στη μη κωδική περιοχή και ακολουθείται από ένα ιντρόνιο μεγάλου μήκους, το οποίο καταλαμβάνει περίπου το μισό μέγεθος του γονιδίου (10.6 kb). Το εξώνιο 10 του *SPARC* περιλαμβάνει ολόκληρη την 3' αμετάφραστη περιοχή, μία περιοχή των γονιδίων που επιδέχεται ρύθμιση και μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην έκφρασή τους.<sup>25</sup>

Ο υποκινητής του γονιδίου της οστεονεκτίνης δε φέρει τυπικό κουτί TATA ή CAAT, αλλά αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από πουρίνες, καθώς περιέχει επαναλαμβανόμενα μοτίβα GGA.<sup>24,26</sup> Συγκεκριμένα, αποτελείται από δύο κουτιά GGA, τα GGA 1 και GGA 2, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται μια αλληλουχία 10bp με χαμηλό περιεχόμενο σε πουρίνες. Τα κουτιά GGA έχουν θετική ρυθμιστική δράση στην ενεργότητα του υποκινητή, ενώ η παρεμβαλλόμενη αλληλουχία αρνητική. Αξιοσημείωτο είναι ότι στο κουτί GGA 1 εντοπίζονται τρεις επάλληλες θέσεις πρόσδεσης του υποδοχέα Ρετινοειδούς Χ/Βιταμίνης D (RXR/VDR) μετά από το οποίο ακολουθεί ένα κουτί E.<sup>27</sup> Έτσι, το *SPARC* φέρει στοιχεία απόκρισης σε cAMP, θερμικό σοκ και γλυκοκορτικοειδή κι έχει δειχθεί *in vitro* ότι η έκφρασή του μπορεί να ρυθμιστεί από το ρετινοϊκό οξύ, τη δεξαμεθαζόνη, το θερμικό σοκ και το βουτυρικό νάτριο.<sup>27-29</sup> Μελέτες έχουν δείξει, επίσης, ότι αυξητικοί παράγοντες και κυτταροκίνες μπορούν να ρυθμίσουν είτε θετικά είτε αρνητικά την έκφραση του *SPARC* (πίνακας 1)<sup>30</sup>. Επιπλέον, ο υποκινητής του γονιδίου έχει δειχθεί ότι φέρει ένα νησίδιο CpG 300bp και επιδέχεται ρύθμιση από μεθυλοτρανσφεράσες.<sup>31-33</sup>

Ενεργοποιητές	Αναστολείς
Ρετινοϊκό οξύ	FGF-2
Δεξαμεθαζόνη	IL-1
Θερμικό σοκ	TNF- $\alpha$
TGF- $\beta$ 1	LPS
Ακτιβίνη	PMA
BMP-2	EGF
IGF-1	PDGF
PDGF	Pb <sup>2+</sup>
Λεπτίνη	Γλυκόζη
Ινσουλίνη	Σταμπιλίνη 1



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

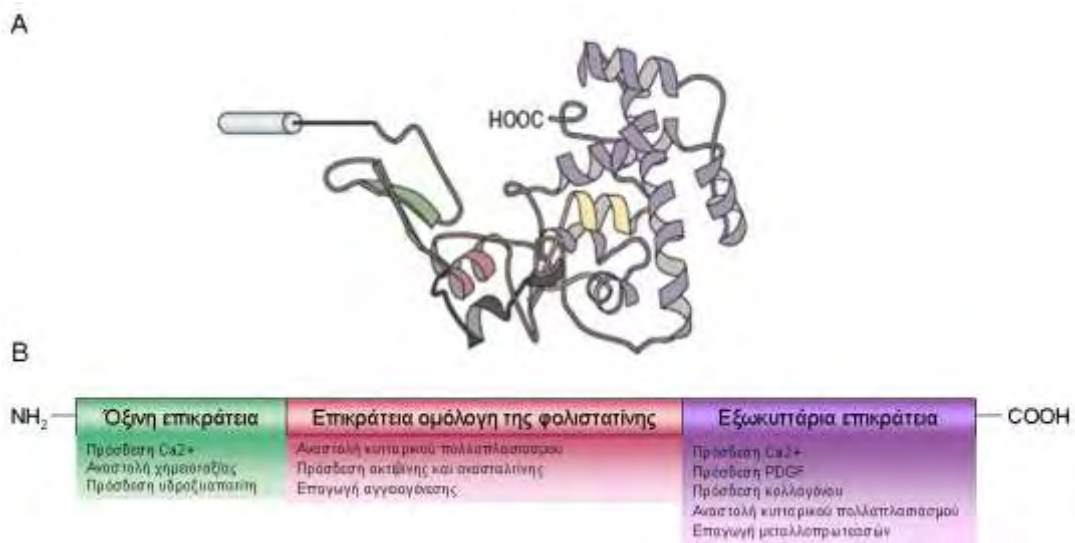
Το γονίδιο *SPARC* στον άνθρωπο, κωδικοποιεί δύο μετάγραφα mRNA, ένα μετάγραφο μεγέθους 2.2 kb και ένα λιγότερο κοινό μετάγραφο που καταλαμβάνει 3.0 kb. Τα δύο αυτά μετάγραφα φέρουν όμοιες κωδικές αλληλουχίες, αλλά η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι το μετάγραφο των 3.0 kb φέρει ένα επιπλέον σήμα πολυαδενυλίωσης.<sup>23</sup> Το mRNA της οστεονεκτίνης είναι πολύ σταθερό με χρόνο ημίσειας ζωής περισσότερο από 24 ώρες, αποτελώντας ιδανικό μόριο-στόχο για τη ρύθμισή του σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο από τα microRNAs.<sup>34</sup> Πράγματι, μελέτη σε οστεοβλάστες έχει δείξει ότι το microRNA miR-29 προσδένεται σε μία υψηλά συντηρημένη θέση στην 3'-αμετάφραστη περιοχή του μεταγράφου της οστεονεκτίνης και επάγει την αποικοδόμησή του.<sup>35</sup>

### A.1.1.2. Η πρωτεΐνη της οστεονεκτίνης

Η αλληλουχία της πρωτεΐνης της οστεονεκτίνης, όπως και το γονίδιό της, εμφανίζει υψηλό βαθμό ομολογίας μεταξύ των ειδών. Η διατήρηση της ακριβούς θέσης των καταλοίπων κυστεΐνης από τον *C. elegans* ως και τον άνθρωπο υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης στη λειτουργία της. Στον άνθρωπο, η ώριμη μορφή της οστεονεκτίνης αποτελείται από 286 κατάλοιπα και έχει μάζα 32kDa. Ωστόσο, σε ορισμένους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του αρθρικού χόνδρου, η πρωτεΐνη επιδέχεται γλυκοζυλίωση και άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με αποτέλεσμα μετά από ηλεκτροφόρησή της σε πηκτή πολυακρυλαμίδης η πρωτεΐνη να μεταναστεύει στα 40-43kDa.<sup>36</sup>

Δομικά, η οστεονεκτίνη αποτελείται από τρεις διακριτές επικράτειες, καθεμία από τις οποίες διαθέτει διαφορετικό λειτουργικό ρόλο. Η N-τελική επικράτεια της πρωτεΐνης είναι όξινη και έχει ικανότητα πρόσδεσης στον υδροξυαπατίτη, ένα φωσφορικό ορυκτό του ασβεστίου πλούσιο σε ιόντα υδροξυλίου, που αποτελεί βασικό δομικό συστατικό των οστών. Η δεύτερη επικράτεια είναι μία επικράτεια ομόλογη της φολιστατίνης και φέρει την ικανότητα πρόσδεσης στην ηπαρίνη και στις πρωτεογλυκάνες και θεωρείται ότι πιθανόν συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η C-τελική επικράτεια της οστεονεκτίνης είναι ικανή να προσδένει ιόντα ασβεστίου, ορισμένους τύπους κολλαγόνου που σχηματίζουν ίνες και τις μεταλλοπρωτεΐνάσες. Η πρόσδεση των ιόντων ασβεστίου σε αυτήν την επικράτεια μπορεί να επηρεάσει την στερεοδιάταξή

της και να προκαλέσει αλλαγές στην ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο κολλαγόνο και στις μεταλλοπρωτεΐνες.<sup>15,30</sup>



**Εικόνα 2.** Η δομή και οι λειτουργικές ιδιότητες της οστεονεκτίνης. **A.** Η δομή της πρωτεΐνης οστεονεκτίνης του ανθρώπου. Η όξινη επικράτεια απεικονίζεται με πράσινο, η επικράτεια ομόλογη της φολλιστατίνης με κόκκινο και η C-τελική επικράτεια με μωβ. **B.** Οι λειτουργικές ιδιότητες των τριών επικρατειών της πρωτεΐνης.

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

Η οστεονεκτίνη, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των κυτταροθεμελιακών πρωτεϊνών, έχει την ικανότητα να συμμετέχει στη ρύθμιση ενός μεγάλου εύρους βιολογικών διεργασιών μέσω της ικανότητάς της να διαμεσολαβεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και της ECM.<sup>16,30</sup> Η οστεονεκτίνη έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στην αναδόμηση της ECM των ιστών, αλληλεπιδρά με αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες και τροποποιεί τη δράση τους, προσδένεται σε υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας κι επάγει ενδοκυττάρια σήματα και ασκεί ρυθμιστική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση.

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

Η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τη συγκρότηση, την οργάνωση και την αναδόμηση της ECM των ιστών, μέσω της ικανότητάς της να αλληλεπιδρά και να ασκεί ρυθμιστική δράση στα δομικά συστατικά και στις πρωτεάσες της ECM.<sup>37</sup>

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

Η οστεονεκτίνη αλληλεπιδρά με μια πληθώρα δομικών συστατικών της ECM, με κύριο εκπρόσωπο το κολλαγόνο, ένα μόριο που αφθονεί στην ECM πολλών ιστών. Στον αρθρικό χόνδρο, το κολλαγόνο καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της ECM του ιστού, καθώς συνιστά το 60% του ξηρού του βάρους, και του παρέχει την ικανότητα να ανταπεξέρχεται σε δυνάμεις εφελκυσμού.<sup>10</sup> Ο κύριος τύπος κολλαγόνου που συναντάται στον αρθρικό χόνδρο είναι το κολλαγόνο II, το οποίο συνιστά το 90-95% του συνολικού κολλαγόνου και αποτελεί το κύριο συστατικό των ιών κολλαγόνου στον ενήλικο ιστό. Ο χόνδρος περιέχει, επίσης, μικρότερες ποσότητες άλλων τύπων κολλαγόνου, όπως οι III, V, VI, IX, XI, XII, XIII, XIV και XVI, το οποίο είναι γνωστό ως «έλασσον κολλαγόνο».<sup>38-39</sup>

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

Η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά τόσο με τύπους του κολλαγόνου που σχηματίζουν ίνες, όπως οι II, III, V, όσο και με τύπους που έχουν άλλες λειτουργικές ιδιότητες, όπως οι I, IV, VIII, τους οποίους προσδένει με διάφορους βαθμούς συγγένειας.<sup>40</sup> Ο βαθμός συγγένειας της οστεονεκτίνης με τους διάφορους τύπους κολλαγόνου επηρεάζεται από τα ιόντα ασβεστίου, την πέψη της πρωτεΐνης από πρωτεάσες και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίσταται.<sup>36,41</sup> Μελέτες έχουν δείξει ότι η διάσπαση της οστεονεκτίνης από τις MMPs και άλλες πρωτεάσες μπορεί να αυξήσει τη συγγενεία της πρωτεΐνης για το κολλαγόνο τύπων I, II, III, IV και V ως και δέκα φορές, καθώς η πέψη σε συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων αποκαλύπτει τη θέση πρόσδεσης της οστεονεκτίνης στο κολλαγόνο η οποία στην άθικτη πρωτεΐνη είναι μερικώς επικαλυπτόμενη.<sup>41</sup> Επιπλέον, η γλυκοζυλίωση που υφίσταται η οστεονεκτίνη σε ορισμένους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων του αρθρικού χόνδρου και του οστού, επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσής της στο κολλαγόνο. Η οστεονεκτίνη που συναντάται στην εξωκυττάρια ουσία του οστού φέρει δομές πλούσιες στο μονοσακχαρίτη μανόζη και εμφανίζει αυξημένη συγγένεια πρόσδεσης στο κολλαγόνο τύπου I συγκριτικά με τη μη γλυκοζυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης που παράγεται από τα αιμοπετάλια.<sup>36</sup>

Μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την οργάνωση του κολλαγόνου σε ίνες και την περαιτέρω εναπόθεση τους στην ECM των ιστών.<sup>40</sup> Μελέτες σε ποντικούς δεν εκφράζουν οστεονεκτίνη έχουν δείξει ότι η έλλειψη της πρωτεΐνης οδηγεί σε αλλαγές στη μορφολογία των ινών κολλαγόνου και σε σημαντική μείωση των επιπέδων του στους ιστούς ενήλικων ζώων. Για παράδειγμα, το δέρμα των ζώων αυτών περιέχει τη μισή ποσότητα κολλαγόνου συγκριτικά με το δέρμα ποντικών αγρίου τύπου.<sup>42-44</sup> Επιπλέον, οι ίνες του κολλαγόνου σε αυτούς τους ποντικούς είναι μικρότερες και περισσότερο ομοιόμορφες σε διάμετρο, υποδεικνύοντας ότι η οστεονεκτίνη επηρεάζει τη διαδικασία συγκρότησης του κολλαγόνου σε ίνες.<sup>45</sup> Ο Giudici και οι συνεργάτες του έδειξαν με *in vitro* μελέτη ότι η ρύθμιση της συγκρότησης του κολλαγόνου σε ίνες από την οστεονεκτίνη λαμβάνει χώρα στα πρώιμα στάδια αυτής της διαδικασίας.<sup>46</sup>

Ωστόσο, ο μηχανισμός μέσω του οποίου η πρωτεΐνη συμμετέχει στην οργάνωση του κολλαγόνου σε ίνες δεν είναι γνωστός. Ορισμένες μελέτες έχουν προτείνει ότι η δράση αυτή της οστεονεκτίνης ασκείται μέσω της ικανότητάς της να ρυθμίζει αρνητικά την αλληλεπίδραση του κολλαγόνου με τους υποδοχείς του, τον υποδοχέα με επικράτεια δισκοϊδίνης 2 (DDR2 – Discoidin Domain Receptor 2) και των υποδοχέων ιντεγκρίνης. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη μπορεί να ρυθμίζει τη συγκρότησή του κολλαγόνου σε ίνες και την εναπόθεσή του στην ECM των ιστών συμμετέχοντας στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίσταται το μόριο, λειτουργώντας ως πρωτεΐνη συνοδός, ή ρυθμίζοντας την ωρίμανση του προκολλαγόνου σε κολλαγόνο.<sup>37</sup>

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

Η οστεονεκτίνη, εκτός από το κολλαγόνο, αλληλεπιδρά και με άλλα δομικά συστατικά της ECM των ιστών, όπως η βιτρονεκτίνη, η ινονεκτίνη, η θρομβοσπονδίνη και η λαμινίνη-1.<sup>47-49</sup> Στην ECM του αρθρικού χόνδρου συναντώνται οι γλυκοπρωτεΐνες θρομβοσπονδίνη και ινονεκτίνη, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οργάνωση της ECM του ιστού σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Στην ΟΑ, τα επίπεδα έκφρασής τους παρατηρούνται αυξημένα και δεδομένα δείχνουν ότι συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου.<sup>10,50-51</sup>

Μελέτες έχουν δείξει ότι η έλλειψη της οστεονεκτίνης οδηγεί σε μείωση της παραγωγής της ινονεκτίνης, ενώ η παρουσία της ευνοεί την αλληλεπίδραση της

ινονεκτίνης και της βιτρονεκτίνης με τους υποδοχείς ιντεγκρίνης στην επιφάνεια των κυττάρων 4T1, μία καρκινική κυτταρική σειρά ποντικού.<sup>48,52</sup> Ωστόσο, φαίνεται ότι η οστεονεκτίνη ασκεί αντίθετη δράση στη λαμινίνη-1, καθώς σε ποντικούς που δεν εκφράζουν την οστεονεκτίνη ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα έκφρασης της λαμινίνης-1 στο επιθήλιο των φακών του οφθαλμού των ζώων.<sup>49</sup>

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

Η οστεονεκτίνη ασκεί, επίσης, ρυθμιστική δράση στην έκφραση και στην ενεργότητα των μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs). Οι MMPs είναι μία οικογένεια πρωτεασών που αποικοδομούν τις πρωτεΐνες της ECM, κατέχοντας έτσι κεντρικό ρόλο στις διεργασίες της αποδόμησης και της ανασύστασης των ιστών που λαμβάνουν χώρα είτε σε φυσιολογικές είτε σε παθολογικές καταστάσεις. Στον αρθρικό χόνδρο εκφράζονται αρκετά μέλη της οικογένειας των MMPs, τα επίπεδα έκφρασης των οποίων αυξάνονται σημαντικά στην ΟΑ και διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στον εκφυλισμό που υφίσταται ο ιστός κατά την ανάπτυξη της νόσου.<sup>53</sup>

Μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη μπορεί να επάγει την ενεργότητα των MMP-1, MMP-3 και MMP-9 σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών αρθρικού υμένα και των μονοκυττάρων περιφερικού αίματος, και των MMP-2 και MMP-14 σε συγκεκριμένους τύπους καρκινικών κυττάρων.<sup>54-55</sup> Ωστόσο, η χορήγηση της πρωτεΐνης σε κύτταρα μελανώματος δεν οδήγησε σε αύξηση της ενεργοποίησης της MMP-2, υποδεικνύοντας πιθανόν ότι η δράση που ασκεί η οστεονεκτίνη στις MMPs διαφέρει από ιστό σε ιστό.<sup>56-58</sup> Οι δράσεις αυτές της πρωτεΐνης στις MMPs έχει δειχθεί ότι διεξάγονται μέσω των μοτίβων EF hand που φέρει στην C-τελική της επικράτεια.<sup>55</sup>

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

Η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την ενεργότητα αυξητικών παραγόντων που έχουν βρεθεί ότι συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της ΟΑ, συμπεριλαμβανομένων των TGF-β, bFGF, VEGF, IGF και PDGF. Η οστεονεκτίνη

μπορεί να ασκεί τη ρυθμιστική της δράση στους αυξητικούς παράγοντες είτε άμεσα, όπως ισχύει για τον VEGF, είτε έμμεσα.

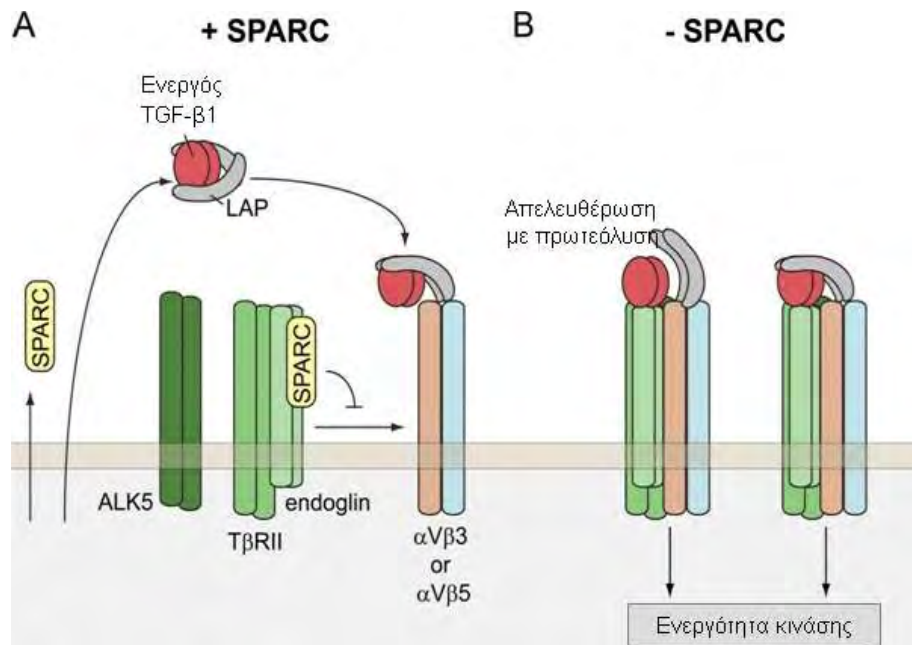
#### A.1.2.2.1. Η ρυθμιστική δράση της οστεονεκτίνης στον TGF-β

Ο αναπτυξιακός παράγοντας μετασχηματισμού β (TGF-β) είναι μία πλειοτροπική κυτταροκίνη που έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση και τη μετανάστευση των κυττάρων, διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην ομοιοστασία των ιστών. Στον αρθρικό χόνδρο, ο TGF-β επάγει τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, αλλά αναστέλλει τη διαφοροποίησή τους σε υπερτροφικά, επάγει την παραγωγή και παράλληλα αναστέλλει την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών της ECM και καταστέλλει τις καταβολικές δράσεις μορίων, όπως η IL-1 και ο TNF-α. Στην OA, ο ρόλος του αυξητικού παράγοντα δεν είναι πλήρως κατανοητός, καθώς ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι ο TGF-β διατηρεί τις αναβολικές του ιδιότητες και στον OA χόνδρο, αλλά άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγησή του σε φυσιολογική άρθρωση μπορεί να επάγει την ανάπτυξη οστεοφύτων, φλεγμονή και ινοπλασία του αρθρικού υμένα.<sup>59-61</sup>

Ο TGF-β, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, έχει δειχθεί ότι μπορεί να επάγει την έκφραση της οστεονεκτίνης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των χονδροκυττάρων.<sup>30</sup> Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι και η οστεονεκτίνη μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση και την ενεργότητα του αυξητικού παράγοντα. Μελέτες σε μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη μπορεί να επάγει την έκφραση και την ενεργότητα του TGF-β, ενώ περαιτέρω μελέτες και σε άλλους κυτταρικούς τύπους έδειξαν ότι μπορεί να επάγει τη φωσφορυλίωση της Smad2, μιας πρωτεΐνης που συμμετέχει στο μονοπάτι που ενεργοποιεί ο αυξητικός παράγοντας.<sup>62-64</sup> Ωστόσο, μελέτες σε εμβρυονικά κύτταρα νεφρού προερχόμενα από άνθρωπο (HEK293) και περικύτταρα έδειξαν ότι η οστεονεκτίνη ασκεί αρνητική δράση στον TGF-β.<sup>65</sup> Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η οστεονεκτίνη ασκεί τη δράση της στον TGF-β δεν είναι γνωστός, αλλά πρόσφατη μελέτη σε περικύτταρα έδειξε ότι η γλυκοπρωτεΐνη έχει την ικανότητα να προσδένεται στην ενδογλίνη, μία μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που συναντάται στην

κυτταρική επιφάνεια κι αποτελεί μέρος του συμπλόκου του υποδοχέα του TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ R), και να ρυθμίζει την ενεργότητα της ιντεγκρίνης  $\alpha_v$ .<sup>66</sup>

Τα αντικρουόμενα αυτά δεδομένα σχετικά με τη δράση της οστεονεκτίνης στον αυξητικό παράγοντα TGF- $\beta$  πιθανόν να οφείλονται στα διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγει ο TGF- $\beta$  στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, το μικροπεριβάλλον του κάθε ιστού και/ή την πηγή της οστεονεκτίνης που χρησιμοποιήθηκε σε καθέναν από τους παραπάνω πειραματικούς χειρισμούς. Επιπλέον, είναι πιθανόν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοζυλίωση, που υφίσταται η γλυκοπρωτεΐνη σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους να τροποποιούν τις δράσεις της.<sup>36</sup>



**Εικόνα 3.** Το μοντέλο που έχει προταθεί για τη ρύθμιση της ενεργότητας του TGF- $\beta$  από την οστεονεκτίνη. (A) Η οστεονεκτίνη προσδένεται στην ενδογλίνη κι εμποδίζει την αλληλεπίδρασή της με την υπομονάδα  $\alpha_v$  της ιντεγκρίνης. (B) Απουσία οστεονεκτίνης, η ενδογλίνη φέρνει σε επαφή το σύμπλοκο TβRII/ALK5 με τον TGF- $\beta$ 1 που είναι συνδεδεμένος με την υπομονάδα  $\alpha_v$  κι επάγει ενδοκυττάρια σηματοδότηση.

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

Ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών 2 (FGF-2), γνωστός και ως βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (bFGF), είναι μέλος μιας οικογένειας αυξητικών παραγόντων που έχουν μιτογόνο, αγγειογόνο και νευροτροφική δράση και συμμετέχουν σε πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών διαδικασιών, όπως η

ανάπτυξη των άκρων, η αγγειογένεση, η επούλωση των πληγών και η ανάπτυξη των όγκων.<sup>67</sup> Στην ΟΑ, ο FGF-2 θεωρείται ότι ασκεί μιτογόνο δράση στα χονδροκύτταρα και αναστέλλει την ενεργότητα αναβολικών παραγόντων, όπως οι IGF-1 και BMP-7.<sup>61</sup> Οι FGFs ασκούν τη δράση τους μέσω πρόσδεσης σε μέλη της οικογένειας των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης FGFR.

Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι η οστεονεκτίνη ασκεί αρνητική δράση στην ενεργότητα του αυξητικού παράγοντα FGF-2. Μελέτες χορήγησης οστεονεκτίνης σε κύτταρα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη οδηγεί σε αναστολή της φωσφορυλίωσης του FGFR-1, του υποδοχέα μέσω του οποίου ο FGF-2 ασκεί τις δράσεις του, και της περαιτέρω ενεργοποίησης της MAPK και της σύνθεσης του DNA που φυσιολογικά επάγει ο αυξητικός παράγοντας.<sup>68</sup> Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η οστεονεκτίνη ασκεί τη ρυθμιστική της δράση στον FGF-2 δεν είναι γνωστός, καθώς μελέτες απέτυχαν να δείξουν άμεση πρόσδεση της οστεονεκτίνης στον αυξητικό παράγοντα.<sup>68-69</sup> Ωστόσο, μελέτη έχει δείξει ότι η ανασταλτική δράση της οστεονεκτίνης στον FGF-2 και στον VEGF-A, έναν άλλο αυξητικό παράγοντα, ασκείται από την ίδια περιοχή της πρωτεΐνης, προτείνοντας ότι η δράση της στον FGF-2 πιθανόν να ασκείται έμμεσα μέσω της αρνητικής ρύθμισης που ασκεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ των VEGF-A και VEGFR1, προϋποθέτοντας συνεργιστική δράση μεταξύ των δύο αυξητικών παραγόντων.<sup>70</sup>

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

Ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) ασκεί τη δράση του μέσω των υποδοχέων VEGFR κι είναι γνωστός για τον κεντρικό ρόλο που κατέχει στη διαδικασία της αγγειογένεσης. Η αγγειογένεση λαμβάνει χώρα σε ένα μεγάλο εύρος φυσιολογικών και παθολογικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένων των τελευταίων σταδίων ανάπτυξης της ΟΑ. Στον αρθρικό χόνδρο παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα έκφρασης του VEGF κατά την ανάπτυξη της νόσου και θεωρείται ότι ο αυξητικός παράγοντας συμβάλλει στην παθογένεια και στην πρόοδό της.<sup>71</sup>

Η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τη δράση του VEGF-A. Ο VEGF-A ασκεί τη δράση του μέσω πρόσδεσης στους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2. Ο υποδοχέας VEGFR-2 είναι ο κύριος υποδοχέας μέσω του οποίου ο αυξητικός παράγοντας επάγει τις δράσεις του, ενώ η λειτουργία του VEGFR-1 θεωρείται ότι είναι επικουρική, έχοντας την ικανότητα να τροποποιεί τα σηματοδοτικά γεγονότα



που επάγει ο πρώτος.<sup>72</sup> Μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη προσδένεται άμεσα στον VEGF-A παρεμποδίζοντας την πρόσδεσή του στον VEGFR-1 και αναστέλλοντας την επακόλουθη φωσφορυλίωσή του.<sup>73-74</sup> Η δράση αυτή της οστεονεκτίνη έχειδειχθεί ότι ενισχύει τη σηματοδότηση που επάγει αυξητικός παράγοντας μέσω του VEGFR-2 πιθανόν μέσω αναστολής της στρατολόγησης της φωσφατάσης SHP-1 στον υποδοχέα και επακόλουθης ενεργοποίησής του μέσω φωσφορυλίωσης.<sup>70,75</sup>

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

Ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1) είναι γνωστός για τις αναβολικές του δράσεις στους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του αρθρικού χόνδρου. Τα επίπεδα έκφρασης του αυξητικού παράγοντα και του υποδοχέα του στην ΟΑ παρατηρούνται αυξημένα, αλλά οι αναβολικές τους δράσεις καταστέλλονται από άλλα μόρια που, επίσης, εκφράζονται σε αυξημένα επίπεδα στην ΟΑ.<sup>61</sup> Μελέτες έχουν δείξει, επίσης, ότι η οστεονεκτίνη ασκεί ρυθμιστική δράση στον IGF. Μεσαγγειακά κύτταρα ποντικών που δεν εκφράζουν την οστεονεκτίνη εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα του αυξητικού παράγοντα. Επίσης, η χορήγηση της οστεονεκτίνης οδήγησε σε μείωση της μεταγραφής των γονιδίων των IGFs και IGFR1, της επακόλουθης φωσφορυλίωσης της ERK1/2, της έκφρασης της κυκλίνης D1, ενώ οδήγησε σε αύξηση του αναστολέα των κυκλινοεξαρτούμενων κινασών p27. Μελέτες απέτυχαν να ανιχνεύσουν άμεση πρόσδεσης της πρωτεΐνης στον IGF.<sup>76</sup>

Η οστεονεκτίνη έχειδειχθεί, επίσης, ότι μπορεί να προσδεθεί στον PDGF και να μειώσει την ικανότητα πρόσδεσής του στον υποδοχέα του.<sup>70</sup> Στον αρθρικό χόνδρο, ο PDGF ασκεί θετική ρυθμιστική δράση στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων και επάγει την παραγωγή των πρωτεογλυκανών.<sup>77-78</sup>

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

Μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να προσδένεται άμεσα σε υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας και να επάγει ενδοκυττάρια σήματα. Η οστεονεκτίνη έχειδειχθεί ότι είναι ικανή να προσδένεται σε υποδοχείς ιντεγκρινών,

στη σταμπιλίνη-1 και στην πρωτεΐνη προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων 1 (VCAM-1).<sup>70,79</sup> Στον αρθρικό χόνδρο έχει βρεθεί ότι εκφράζονται οι υποδοχείς ιντεγκρινών, οι οποίοι μεσολαβούν τη δράση πολλών μορίων που συμμετέχουν στην παθογένεια της ΟΑ, και η VCAM-1.

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

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να προσδένεται σε υποδοχείς ιντεγκρινών και να επάγει ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια.<sup>80</sup> Οι ιντεγκρίνες είναι υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας που μετάγουν σήματα από την ECM στα κύτταρα, συμμετέχοντας έτσι στη ρύθμιση του κυτταρικού τους κύκλου, το σχήμα και την κινητικότητα.

Οι ιντεγκρίνες σχηματίζουν ετεροδιμερή που αποτελούνται από υπομονάδες α και β σε διάφορους συνδυασμούς. Η ενδοκυττάρια επικράτεια της β υπομονάδας των ιντεγκρινών αλληλεπιδρά με την ILK, η οποία ενεργοποιεί καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Η ILK έχει την ικανότητα να φωσφορυλιώνει μόρια-στόχους, όπως τις Akt, GSK3β και τη β υπομονάδα των ιντεγκρινών.<sup>81</sup> Μελέτη έχει δείξει ότι η οστεονεκτίνη αλληλεπιδρά με την υπομονάδα β1 και ακολούθως ενισχύει την ενεργοποίηση της ILK σε επιθηλιακά κύτταρα του φακού των οφθαλμών.<sup>80</sup>

Μελέτες σε προλιποκύτταρα έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη προσδένεται στο σύμπλοκο ιντεγκρινών α5β1.<sup>82</sup> Ωστόσο, άλλες μελέτες σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη και κύτταρα προερχόμενα από οδοντικό πολφό ανθρώπου έδειξαν ότι η γλυκοπρωτεΐνη ασκεί τη δράση της μέσω των υποδοχέων ιντεγκρίνης ανβ5 και ανβ3 και όχι μέσω των α5β1 ή α2β1, υποδεικνύοντας ότι το ακριβές σύμπλοκο των υποδοχέων ιντεγκρίνης στο οποίο προσδένεται η οστεονεκτίνη και ασκεί τις δράσεις ποικίλει μεταξύ των κυτταρικών τύπων.<sup>83-84</sup>

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

Η VCAM-1 είναι μία σιαλογλυκοπρωτεΐνη κυτταρικής επιφανείας που προσδένεται σε υποδοχείς ιντεγκρίνης και επάγει τη συσσώρευση των κυττάρων.<sup>85</sup> Η VCAM-1 αρχικά βρέθηκε ότι εκφράζεται στο ενδοθήλιο των αγγείων που εκτίθεται σε κυτταροκίνες, όπου προωθεί την προσκόλληση των λευκοκυττάρων και τα προσελκύει σε περιοχές φλεγμονής. Στον αρθρικό χόνδρο, η VCAM-1 εκφράζεται

στα ενδοθηλιακά κύτταρα των μικροαγγείων, στους ινοβλάστες του αρθρικού υμένα και στα χονδροκύτταρα.<sup>86</sup> Στα χονδροκύτταρα, η έκφρασή της επάγεται από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ο TNF-α και η IL-1, και το υαλουρονικό οξύ, κύριο συστατικό της ECM του αρθρικού χόνδρου. Αυξημένα επίπεδα της VCAM-1 πιθανόν αντανακλούν βλάβες στον ιστό ή την ύπαρξη φλεγμονής. Επιπλέον, η VCAM-1 έχειδειχθεί ότι επάγει την αλληλεπίδραση των χονδροκυττάρων με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, συνεισφέροντας στον περαιτέρω εκφυλισμό του ιστού.<sup>87-88</sup> Μελέτες *in vitro* και *in vivo* έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη προσδένει τη VCAM-1 και ενισχύει την ενεργότητά της.<sup>89</sup>

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

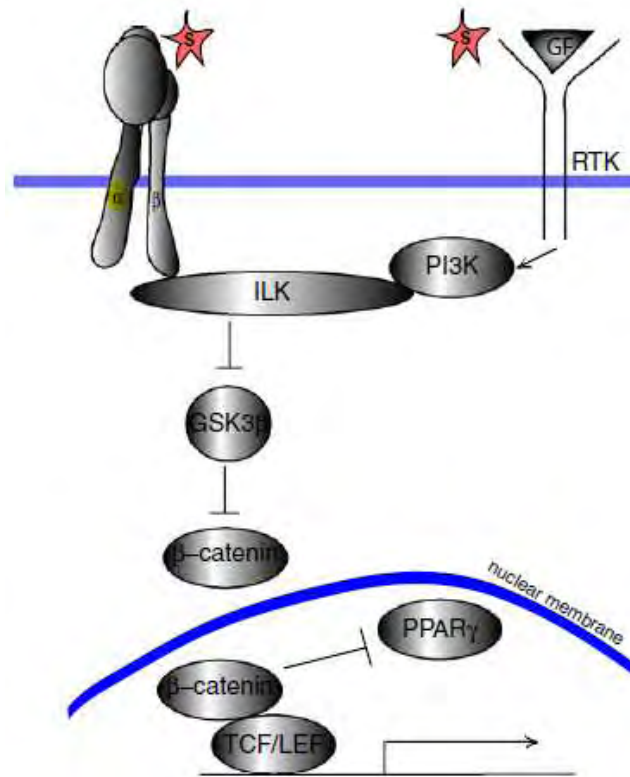
Η οστεονεκτίνη μέσω της ικανότητάς της να αλληλεπιδρά με μόρια της ECM, να ρυθμίζει τη δράση αυξητικών παραγόντων και να προσδένεται σε υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας έχει την ικανότητα να συμμετέχει σε διάφορα κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των μονοπατιών Wnt/β-κατενίνη, PI3K/Akt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

##### **A.1.2.4.1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη**

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη είναι ένα μονοπάτι που παίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη του σκελετικού συστήματος κατά την εμβρυογένεση, καθώς ρυθμίζει την τελική διαφοροποίηση των προγονικών μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες και χονδροκύτταρα. Στα χονδροκύτταρα, το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη έχει την ικανότητα να καταστέλλει τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε χονδροκύτταρα, αλλά απαιτείται για τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά.<sup>90</sup> Μελέτες έχουν δείξει ότι το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη εμπλέκεται και στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά, μία διαδικασία που λαμβάνει χώρα στα τελευταία στάδια ανάπτυξης της ΟΑ.<sup>91</sup>

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να επάγει την ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνη. Ο Nie και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η οστεονεκτίνη μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση της ILK, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την ενεργότητα της GSK3β και οδηγεί σε συσσώρευση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των κυττάρων. Η β-κατενίνη σχηματίζει σύμπλοκο με τους μεταγραφικούς παράγοντες TCF/LEF κι

επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που προάγουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε οστεοβλάστες.<sup>92</sup>



**Εικόνα 4.** Η οστεονεκτίνη (*S*, κόκκινο αστέρι) μπορεί να ενισχύσει τα σηματοδοτικά γεγονότα που επάγονται από τη β-κατενίνη. Η οστεονεκτίνη ενεργοποιεί την ILK, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την GSK-3β και αναστέλλει την ενεργότητά της. Η ενεργότητα της GSK-3β απαιτείται για την αποικοδόμηση της β-κατενίνης στο πρωτεόσωμα. Η αναστολή της ενεργότητάς της οδηγεί σε συσσώρευση της β-κατενίνης, η οποία δημιουργεί σύμπλοκο με τους μεταγραφικούς παράγοντες TCF και LEF και ρυθμίζει τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων. Η οστεονεκτίνη θεωρείται ότι μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση της ILK μέσω της αλληλεπίδρασης με ιντεγκρίνες ή υποδοχείς κινασών τυροσίνης (υποδοχείς αυξητικών παραγόντων).

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

Μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη μπορεί να επάγει ή να αναστείλει την ενεργοποίηση των μονοπατιών PI3K/Akt και MAPK σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, τα οποία μπορεί να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή/και με το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη που επάγει η πρωτεΐνη.<sup>79</sup>

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

Η οστεονεκτίνη είναι ικανή να συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης των κυττάρων. Μελέτες σε διάφορους κυτταρικούς τύπους έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο και κατ'επέκταση τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.<sup>93</sup> Ωστόσο, έχειδειχθεί ότι η πρωτεΐνη μπορεί να ενισχύσει τη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων όταν αυτά υποβάλλονται σε στρες.<sup>94</sup> Τα δεδομένα για τη δράση της οστεονεκτίνης στην απόπτωση είναι αντικρουόμενα, καθώς ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι ασκεί προστατευτική δράση στα κύτταρα από την απόπτωση, ενώ άλλες ότι μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση κασπασών, οδηγώντας τα κύτταρα σε θάνατο. Οπότε, είναι πιθανό η δράση της οστεονεκτίνης στην κυτταρική απόπτωση να διαφέρει από κυτταρικό τύπο σε κυτταρικό τύπο και πιθανόν να επηρεάζεται από άλλους παράγοντες της ECM και/ή τους τύπους των υποδοχέων που φέρει ο εκάστοτε κυτταρικός τύπος.<sup>93,95</sup>

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

Η οστεονεκτίνη αποτελεί μία από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες που συναντώνται στην εξωκυττάρια ουσία του οστού, καταλαμβάνοντας το 25% των μη κολλαγόνων πρωτεϊνών.<sup>96</sup> Ωστόσο, ο ρόλος της οστεονεκτίνης στο σκελετικό σύστημα δεν είναι πλήρως κατανοητός.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες αναδόμησης του οστού και διατήρησης της οστικής μάζας, καθώς ποντικοί που δεν εκφράζουν την οστεονεκτίνη αναπτύσσουν οστεοπενία χαμηλής δραστηριότητας (low-turnover), μία μορφή της νόσου που χαρακτηρίζεται από διαταραχή της οστικής αναδόμησης. Επίσης, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι στα ζώα αυτά παρατηρούνται μειωμένες εμβιομηχανικές ιδιότητες και μειωμένη ποιότητα της ECM του συμπαγούς οστού και αυξημένη λιπογένεση στο μυελό των οστών. Η οστεοπενία που εμφανίζουν οι ποντικοί αυτοί θεωρείται ότι οφείλεται σε μείωση του αριθμού των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, της οστικής μάζας και των ρυθμών αναδόμησης του οστού λόγω έλλειψης της πρωτεΐνης. Η αυξημένη λιπογένεση που παρατηρείται έχειδειχθεί με *in vitro* και *in vivo* μελέτες ότι οφείλεται στην ικανότητα της οστεονεκτίνης να προωθεί τη διαφοροποίηση των μεσεγγυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες παρά σε λιποκύτταρα και να συμβάλλει στην επιβίωση των πρώτων.<sup>97-99</sup> Τις παραπάνω απόψεις ενισχύουν και δεδομένα από διάφορες μορφές οστεοπενίας, όπως η ατελής

οστεογένεση και το σύνδρομο του εύθραυστου οστού, σε ζωικά μοντέλα, στις οποίες παρατηρείται μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης.<sup>100</sup>

Μελέτες έχουν δείξει, επίσης, ότι η οστεονεκτίνη συμβάλλει σημαντικά και στη διαδικασία σχηματισμού του καινούριου οστού που λαμβάνει χώρα μετά από τραυματισμό, καθώς τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυξάνονται άμεσα μετά από τραυματισμό του οστού, καθώς τα κύτταρα του περιόστεου αρχίζουν διαδικασίες πολλαπλασιασμού και εναπόθεσης εξωκυττάριας ουσίας. Η άποψη αυτή ενισχύεται από μελέτες σε ζωικά μοντέλα διατακτικής οστεογένεσης, όπου παρατηρήθηκε ότι η οστεονεκτίνη εκφράζεται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα και τους οστεοβλάστες, κατά τη διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, τη διαδικασία σχηματισμού των μακρών οστών από προσχηματισμένο χόνδρο κατά την εμβρυογένεση.<sup>97-99</sup>

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

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

Η οστεονεκτίνη, εκτός από το οστό, παράγεται από διάφορους άλλους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του λιπώδους ιστού, ο οποίος αποτελεί σημαντική παραγωγή της πρωτεΐνης στον οργανισμό. Η οστεονεκτίνη παράγεται από τα λιποκύτταρα του ιστού και στη συνέχεια εκκρίνεται στην κυκλοφορία. Μάλιστα, τα επίπεδά της στην κυκλοφορία σχετίζονται θετικά με το BMI των ατόμων, υποδεικνύοντας ότι η πλειοψηφία της πρωτεΐνης που συναντάται στην κυκλοφορία προέρχεται από το λιπώδη ιστό.<sup>101-102</sup> Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης mRNA της πρωτεΐνης είναι αυξημένα στο λιπώδη ιστό παχύσαρκων ατόμων και μπορούν να αυξηθούν με την περαιτέρω πρόσληψη βάρους και να μειωθούν με την απώλειά του.<sup>101</sup> Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι η λεπτίνη, μία λιποκίνη που παίζει σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην ομοιοστασία του λιπώδους ιστού, αλλά και γενικότερα του οργανισμού, αυξάνει τα επίπεδα της οστεονεκτίνης, συμβάλλοντας πιθανόν στα αυξημένα επίπεδα της

πρωτεΐνης που παρατηρούνται στο λιπώδη ιστό παχύσαρκων ατόμων, ενώ αντίθετα η οστεονεκτίνη οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της λεπτίνης.<sup>101,103</sup> Η λεπτίνη έχει δειχθεί ότι συμμετέχει και στην παθολογία της ΟΑ.<sup>104</sup>

Στο λιπώδη ιστό η οστεονεκτίνη έχει, επίσης, την ικανότητα να ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη αναστέλλει τη διαφοροποίηση των πρόδρομων λιποκυττάρων σε ώριμα κύτταρα πιθανόν μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -κατενίνης και της περαιτέρω αναστολής της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της λιπογένεσης.<sup>103</sup>

### A.1.5. Σκοπός

Η οστεονεκτίνη, μία πλειοτροπική κυτταροθεμελιακή πρωτεΐνη της ECM του αρθρικού χόνδρου, έχει βρεθεί ότι υπερ-εκφράζεται στην ΟΑ, αλλά ο ρόλος της στη φυσιολογία του ιστού και στην παθολογία της νόσου παραμένει άγνωστος. Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση του ρόλου της οστεονεκτίνης στην παθοφυσιολογία της ΟΑ μέσω του μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -κατενίνης και συγκεκριμένα στον υπερτροφικό φαινότυπο του αρθρικού χόνδρου που χαρακτηρίζει τα τελευταία στάδια ανάπτυξης της νόσου, καθώς και στη μεταβολική συνιστώσα της ΟΑ.

Πιο αναλυτικά, μελετήθηκαν:

- Η έκφραση των επιπέδων του mRNA και της πρωτεΐνης της οστεονεκτίνης σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα καλλιέργειας
- Η δράση που ασκεί η οστεονεκτίνη στην πρωτεΐνη  $\beta$ -κατενίνη σε ΟΑ χονδροκύτταρα καλλιέργειας
- Η δράση που ασκεί η οστεονεκτίνη στην έκφραση των γονιδίων *RUNX2*, *OC*, *MMP-9*, *MMP-13*, *Ob*, *Ob-Rb*, *SREBP-2* και *SREBP-1c* σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης σε ΟΑ χονδροκύτταρα καλλιέργειας
- Η επίδραση της γονιδιακής αποσιώπησης του μεταγραφικού παράγοντα *RUNX2* και της παράλληλης εξωκυττάριας χορήγησης οστεονεκτίνης στην έκφραση των γονιδίων *OC*, *MMP-9* και *MMP-13* σε επίπεδο μεταγραφής.



## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## B.1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### B.1.1. Συλλογή δειγμάτων

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αρθρικού χόνδρου, τα οποία ελήφθησαν από ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Στη διαδικασία συλλογής δειγμάτων συμπεριλήφθησαν ασθενείς που υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική γόνατος λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ και ασθενείς - χωρίς ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων – με σοβαρά κατάγματα ή ακρωτηριασμούς που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

Συγκεκριμένα, στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 20 δείγματα ΟΑ χόνδρου γόνατος (2 άνδρες/18 γυναίκες) και 8 δείγματα φυσιολογικού αρθρικού χόνδρου γόνατος (6 άνδρες/2 γυναίκες). Ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, χονδροδυσπλασία, ΟΑ μετά από σηπτική αρθρίτιδα και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Το εύρος ηλικίας, το βάρος και ο BMI\* της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου παρατίθενται λεπτομερώς στους πίνακες 2 και 3, αντίστοιχα.

Επιπλέον, για κάθε ασθενή ελήφθησαν κλινικά δεδομένα σχετικά με το βαθμό της φυσικής του κατάστασης, την παρουσία πόνου, δυσκαμψίας, διόγκωσης της άρθρωσης, καθώς και άλλων νοσημάτων. Πριν την υποβολή των ασθενών σε ολική αρθροπλαστική, έγινε ακτινογραφικός έλεγχος και αξιολόγηση των ακτινολογικών ευρημάτων με βάση την κλίμακα Kellgren-Lawrence, μία κλίμακα που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της εξέλιξης της ΟΑ.<sup>105</sup> Όλοι οι ασθενείς που αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης βαθμολογήθηκαν με 4 στην κλίμακα Kellgren-Lawrence.

Στοιχεία ομάδας μελέτης	Ηλικία	Βάρος	BMI
Μέσος όρος	72	80	30,12
Μέγιστος	82	120	39,18

\* Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) καθορίζεται ότι άτομα με BMI  $\geq 25\text{kg/m}^2$  είναι υπέρβαρα και άτομα με BMI  $\geq 30\text{kg/m}^2$  είναι παχύσαρκα.

Τυπική απόκλιση	6	14	4,03
Ελάχιστος	56	60	23,44

**Πίνακας 2.** Αναλυτικά στοιχεία για την ηλικία, το βάρος και το BMI των 20 ασθενών που αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης.

Στοιχεία ομάδας ελέγχου	Ηλικία	Βάρος	BMI
Μέσος όρος	51	73	24,10
Μέγιστος	70	88	28,41
Τυπική απόκλιση	7	11	2,47
Ελάχιστος	37	49	19,88

**Πίνακας 3.** Αναλυτικά στοιχεία για την ηλικία, το βάρος και το BMI των 8 ασθενών που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

## B.1.2. Καλλιέργεια χονδροκυττάρων

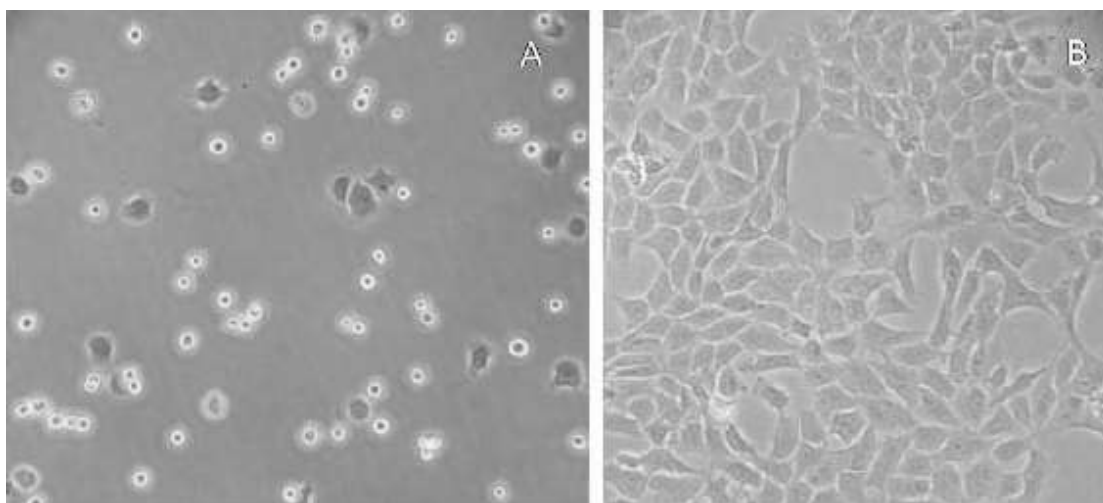
Τα δείγματα αρθρικού χόνδρου που ελήφθησαν άσηπτα κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και την καλλιέργεια χονδροκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά διατέθηκαν για περαιτέρω πειραματικούς χειρισμούς.

### B.1.2.1. Απομόνωση χονδροκυττάρων

Η απομόνωση χονδροκυττάρων από δείγματα αρθρικού χόνδρου περιλαμβάνει ενζυμική κατεργασία των δειγμάτων, προκειμένου τα κύτταρα να απελευθερωθούν από την ECM που τα περιβάλλει, κι επακόλουθη μεταφορά των χονδροκυττάρων σε επωαστικό κλίβανο.

Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα του αρθρικού χόνδρου μετά την παραλαβή τους από το χειρουργείο υπεβλήθησαν αρχικά σε έκπλυση με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ανεπιθύμητα υπολείμματα και να διατηρηθεί η σταθερότητα του pH τους. Στη συνέχεια, οι αρθρικοί ιστοί – εντός 24 ωρών από τη λήψη τους - τεμαχίστηκαν με τη βοήθεια αποστειρωμένων νυστεριών σε μικρά κομμάτια και ακολούθησε επώασή τους με τα πρωτεολυτικά ένζυμα προνάση και κολλαγενάση. Η προνάση έχει την ικανότητα να διασπά τις πρωτεογλυκάνες της ECM του ιστού, συμβάλλοντας στην απελευθέρωση των κολλαγόνων ινών, τις οποίες στη συνέχεια διασπά η κολλαγενάση, οδηγώντας τελικά στην απελευθέρωση των

χονδροκυττάρων από την ECM του αρθρικού χόνδρου. Τα κύτταρα μετά την απομόνωσή τους τοποθετούνται σε φλάσκες και επωάζονται σε κλίβανο σε σταθερές συνθήκες, όπου τους επιτρέπεται να προσκολληθούν στην επιφάνεια της φλάσκας και να αναπτυχθούν. Τα χονδροκύτταρα αμέσως μετά την απομόνωσή τους αιωρούνται στο θρεπτικό υλικό και έχουν σχήμα στρογγυλό, ενώ μετά το πέρας 48 ωρών τα κύτταρα προσκολλώνται και αποκτούν σχήμα πεπλατυσμένο και πολυγωνικό (εικόνα 5).



**Εικόνα 5.** Πρωτογενής καλλιέργεια χονδροκυττάρων. (A) Τα χονδροκύτταρα όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο 1 ώρα μετά την απομόνωσή τους από τον αρθρικό ιστό. (B) Τα χονδροκύτταρα μετά από καλλιέργεια 3 ημερών. (100x μεγέθυνση)

Για την καλλιέργεια των χονδροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12 (DMEM/F-12, Gibco, Paisley, Scotland, UK) εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco, Paisley, Scotland, UK) και 1% αντιβιοτικά 100U/ml πενικιλίνη και 100mg/ml στρεπτομυκίνη (Penicillin-Streptomycin, P/S, Gibco, Paisley, Scotland, UK). Το πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM/F-12 διατηρείται στους 4°C. Επιπλέον, κατά τους περαιτέρω πειραματικούς χειρισμούς των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν το ρυθμιστικό διάλυμα PBS w/o Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> (Phosphate-Buffered Saline, Gibco, Paisley, Scotland, UK) και το ένζυμο θρυψίνη (Biochrom). Η θρυψίνη πριν από κάθε χρήση της θερμαίνεται στους 37°C με επώαση σε υδατόλουτρο, προκειμένου να ενεργοποιηθεί η δράση της.

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Heraus Instrumanets) με σταθερή θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub>. Όλοι οι χειρισμοί των

κυττάρων έγιναν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής προς αποφυγή εξωτερικών μολύνσεων.

Αναλυτική διαδικασία:

- Τοποθέτηση του φρέσκου ιστού σε τριβλίο Petri και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος PBS w/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT)
- Ξέπλυμα του ιστού 2-3 φορές με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων του χειρουργείου και τη διατήρηση της σταθερότητας του pH
- Τεμαχισμός του ιστού σε μικρά κομμάτια με αποστειρωμένο νυστέρι
- Μεταφορά των τεμαχίων σε πλάκα των 6 πηγαδιών και προσθήκη 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού
- Προσθήκη προνάσης (Pronase, Roche, Mannheim, Germany) 5mg/ml με 2 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) για 30 λεπτά
- Αφαίρεση του υπερκειμένου με αποστειρωμένη πλαστική πιπέτα Pasteur μιας χρήσης.
- Προσθήκη κολλαγενάσης (Collagenase P, Roche, Mannheim, Germany) 5mg/ml με 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) για 90 λεπτά (ανάδευση ανά 15 λεπτά)
- Μηχανική υποβοήθηση στην απελευθέρωση των χονδροκυττάρων από το δίκτυο των κολλαγόνων ινών με γυάλινη αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε πλαστικό σωληνάριο των 15ml (falcon), φυγοκέντρηση του υπερκειμένου στις 2000rpm για 7min σε RT, απομάκρυνση του υπερκειμένου, αναδιάλυση του ιζήματος με 2ml θρεπτικού υλικού και επανάληψη της διαδικασίας άλλες δύο φορές

Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα των 25ml με 5ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).

### **B.1.2.2. Ανακαλλιέργεια χονδροκυττάρων**

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται κάθε φορά που τα κύτταρα καλύπτουν το 80-90% της επιφάνειας της φλάσκας. Η ανακαλλιέργεια των χονδροκυττάρων γινόταν περίπου ανά 7 ημέρες, ανάλογα κάθε φορά με το μέγεθος του αρχικού ιστού και τον αριθμό των κυττάρων που απελευθερώνονταν από αυτόν.

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, γίνεται αρχικά έκπλυσή τους με 5ml PBS και επακόλουθη αποκόλλησή τους από την επιφάνεια της φλάσκας με την προσθήκη 1ml θρυψίνης, ενός ενζύμου που έχει την ικανότητα να διασπά τις συνδέσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των κυττάρων και της επιφάνειας της φλάσκας. Μετά την επώαση των κυττάρων για 5 λεπτά (μέγιστη χρονική διάρκεια 10 λεπτά) με θρυψίνη στον κλίβανο, η αποκόλλησή τους παρατηρείται στο μικροσκόπιο κι ακολουθεί προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού σε τριπλάσια τουλάχιστον ποσότητα του όγκου του ενζύμου προκειμένου να διακοπεί η δράση του τελευταίου.

### **B.1.2.3. Κατάψυξη και απόψυξη χονδροκυττάρων**

Τα χονδροκύτταρα που έχουν απομονωθεί από τα δείγματα του αρθρικού χόνδρου, έχουν αναπτυχθεί στις φλάσκες και δεν προορίζονται για άμεσους περαιτέρω πειραματικούς χειρισμούς μπορούν να καταψυχθούν στους  $-150^{\circ}\text{C}$  και να αποψυχθούν όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν.

Για την κατάψυξη των χονδροκυττάρων, τα κύτταρα αποκολλούνται με την προσθήκη θρυψίνης, επαναδιαλύονται σε θρεπτικό υλικό παγώματος και τοποθετούνται σε ειδικό κρυοφιαλίδιο σε συγκέντρωση  $4-5 \times 10^6$  ml. Το θρεπτικό υλικό παγώματος αποτελείται από 60% θρεπτικό υλικό, 30% ορό εμβρύου βοός και 10% διμέθυλο-σουλφοξείδιο (Dimethyl Sulfoxide, DMSO, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Το DMSO συμβάλλει στη σταδιακή ψύξη του θρεπτικού υλικού και κατά συνέπεια των κυττάρων, παρεμποδίζοντας το σχηματισμό κρυστάλλων που θα μπορούσαν να προκαλέσουν βλάβες στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων. Για τον ίδιο λόγο, η κατάψυξη των κυττάρων γίνεται σταδιακά και κατά συνέπεια τα κρυοφιαλίδια τοποθετούνται αρχικά στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 4 ώρες, κατόπιν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες και τελικά στους  $-150^{\circ}\text{C}$ , όπου αποθηκεύονται επ'άπειρον.

Σε αντίθεση με τη σταδιακή κατάψυξη των κυττάρων, η απόψυξή τους γίνεται ταχέως με τη μεταφορά του κρυοφιαλιδίου από τους  $-150^{\circ}\text{C}$  απευθείας στους  $37^{\circ}\text{C}$  σε υδατόλουτρο, την άμεση επαναδιάλυσή τους σε 5ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τη μεταφορά τους σε σωληνάριο των 15ml. Στη συνέχεια, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 2000 στροφές, προκειμένου να καθιζάνουν. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 7-8ml πλήρους θρεπτικού υλικού, τα χονδροκύτταρα μεταφέρονται σε φλάσκα των 25ml και επωάζονται στον κλίβανο.

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

Ολικό RNA απομονώθηκε από τα χονδροκύτταρα προκειμένου να ακολουθήσει μελέτη έκφρασης των γονιδίων του ενδιαφέροντός μας σε επίπεδο μεταγραφής. Συγκεκριμένα, η απομόνωση ολικού RNA εφαρμόστηκε σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα προκειμένου να αξιολογηθούν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γονιδίου *SPARC* και στα πειράματα χορήγησης rhSPARC ή/και siRNA-RUNX2 για την αξιολόγηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *RUNX2*, *OC*, *MMP-9*, *MMP-13*, *OB*, *OB-R*, *SREBP-2* και *SREBP-1c* σε επίπεδο μεταγραφής.

Για την απομόνωση RNA από χονδροκύτταρα καλλιέργειας αφαιρούμε αρχικά το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα αντιδραστηρίου Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK), το οποίο έχει την ικανότητα να διαλύει τις κυτταρικές μεμβράνες, συμβάλλοντας στην απελευθέρωση του RNA από τα κύτταρα, ενώ παράλληλα συνεισφέρει στη διατήρηση της ακεραιότητας του μορίου. Η απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα αποτελείται από τα παρακάτω επιμέρους βήματα:

#### I. Ομογενοποίηση.

Προσθήκη 1-3ml Trizol και επώαση στους 15-30°C για 5 λεπτά ή φύλαξη στους -80°C. Για κάθε ml αντιδραστηρίου Trizol προστίθενται 200μl χλωροφόρμιο κι ακολουθεί ήπια ανάδευση με vortex με στόχο την λύση των κυττάρων.

#### II. Διαχωρισμός φάσεων.

Μετά την ομογενοποίηση, κάθε δείγμα επωάζεται στους 15-30°C για 2-3 λεπτά κι ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 12000 στροφές στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης σε κάθε σωληνάριο σχηματίζονται τρεις φάσεις: η υποκείμενη φάση που περιέχει φαινόλη/χλωροφόρμιο, όπου βρίσκονται διαλυμένες οι πρωτεΐνες, η ενδιάμεση φάση και η ανώτερη υδατική φάση, στην οποία εντοπίζεται κυρίως το RNA.

#### III. Κατακρήμνιση

Η ανώτερη υδατική φάση που περιέχει το RNA μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο των 2 ml, όπου πραγματοποιείται η κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης. Ακολουθεί επώαση στους 15-30°C για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά στις 12000 στροφές στους 4°C. Η ισοπροπυλική αλκοόλη συμβάλλει στην κατακρήμνιση του RNA, το οποίο με το πέρας της φυγοκέντρησης ιζηματοποιείται.

#### IV. Έκπλυση

Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης ακολουθεί αφαίρεση του υπερκειμένου και έκπλυση του ιζήματος του RNA με προσθήκη 1ml κρύας αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10000 στροφές στους 4°C.

#### V. Επαναδιάλυση

Τέλος, αφαιρούμε το υπερκείμενο και επιτρέπουμε στο ίζημα να στεγνώσει πολύ καλά, αφήνοντάς το σωληνάριο για λίγη ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η διάλυση του RNA γίνεται με προσθήκη 20-30μl ddH<sub>2</sub>O κι επώαση στους 55-60 °C για 10 λεπτά.

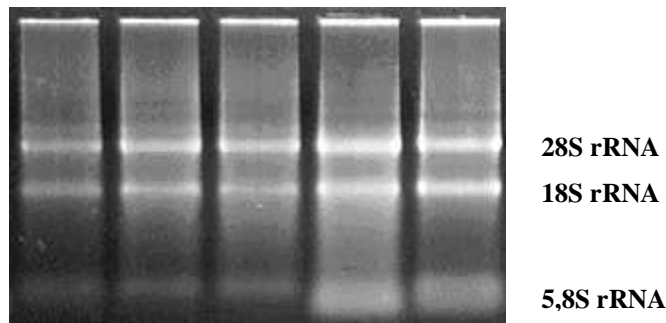
#### VI. Φωτομέτρηση – Έλεγχος ποσότητας

Προκειμένου να ελεγχθεί η ποσότητα του RNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση. Για το σκοπό αυτό, κάθε δείγμα αραιώθηκε 1:100 και υπολογίστηκε η απορρόφησή του στα μήκη κύματος 260nm και 280nm, καθώς και ο μεταξύ τους λόγος (ratio). Η συγκέντρωση του κάθε δείγματος υπολογίστηκε σύμφωνα με τον εξής τύπο: συγκέντρωση RNA = συντελεστής αραιώσης x OD<sub>260</sub> x 40 (μg/ml). Η φωτομέτρηση δίνει, επιπλέον, και μία ένδειξη της ποιότητας του RNA, καθώς το ratio αποτελεί δείκτη της καθαρότητάς του (1,8-2).

#### VII. Ηλεκτροφόρηση – Έλεγχος ποιότητας

Για τον έλεγχο της ποιότητας των δειγμάτων RNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% (εικόνα ).





**Εικόνα 6.** Οι ζώνες που περιμένουμε να δούμε με την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων RNA είναι τρεις. Στην πραγματικότητα, όμως, εμφανίζονται δύο ζώνες, διότι η τρίτη (5,8S rRNA) εκπροσωπεί πολύ μικρό κομμάτι RNA και δεν είναι ορατή.

#### **B.1.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR)**

Το ολικό RNA που απομονώθηκε από τα χονδροκύτταρα χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR). Στην RT-PCR, μία παραλλαγή της κλασικής μεθόδου PCR, η αλυσίδα του μονόκλωνου RNA αρχικά μεταγράφεται αντίστροφα σε συμπληρωματικό DNA από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση και ακολούθως το παραγόμενο μόριο cDNA ενισχύεται όπως σε μία κλασική αντίδραση PCR.

Συγκεκριμένα, για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers, 500μg/ml), η αντίστροφη μεταγραφάση MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 200U/μl) και 1μg RNA από κάθε δείγμα. Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για κάθε δείγμα περιέχει:

- |   |                          |
|---|--------------------------|
| ➤ RNA                                       | → x μl (1 μgr)           |
| ➤ Ρυθμιστικό διάλυμα 5x                     | → 4 μl                   |
| ➤ Τυχαία εξανουκλεοτίδια (500μg/ml)         | → 3 μl                   |
| ➤ Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)             | → 2 μl                   |
| ➤ MMLV RT (200U/μl)                         | → 1 μl                   |
| ➤ δις απεσταγμένο νερό (ddH <sub>2</sub> O) | → μέχρι τελικό όγκο 20μl |

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- Αρχικά, το RNA διαλύθηκε σε ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα RNA με τα τυχαία εξανουκλεοτίδια θερμάνθηκε στους 65°C επί 5 min για την αποδιάταξη τυχόν δευτεροταγών δομών του RNA.
- Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 5 λεπτά για τη σταθεροποίηση της αποδιάταξης των δευτεροταγών δομών του RNA.
- Προσθήκη των υπολοίπων αντιδραστηρίων και τοποθέτηση των δειγμάτων σε συσκευή PCR στις ακόλουθες συνθήκες:
  - 37°C για 60 λεπτά
  - 65°C για 10 λεπτά
  - τελική θερμοκρασία: 4°C

Η αδυναμία ενίσχυσης του RNA σε αυτό το στάδιο μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα στους περαιτέρω πειραματικούς χειρισμούς. Γι'αυτό, κάθε φορά μετά τη σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται PCR για την ενίσχυση των αλληλουχιών μεταγράφων γονιδίων, τα οποία εκφράζονται στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφο «αναφοράς»). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε ως μετάγραφο «αναφοράς» το mRNA του γονιδίου της 3-φωσφορικής δεϋδρογονάσης της γλυκεραλδεϋδης (GAPDH), ενός ενζύμου που συμμετέχει στο βιοχημικό μονοπάτι της γλυκόλυσης. Έτσι, το cDNA κάθε δείγματος ενισχύεται με τη μέθοδο της PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για το GAPDH cDNA. Οι αλληλουχίες των εκκινητών για το GAPDH cDNA που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι:

**GAPDH F:** 5' GAGTCAAGGATTTGGTCGT 3'

**GAPDH R:** 5' GACAAGCTTCCCGTTCTCAG 3'

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την αντίδραση του cDNA του γονιδίου *GAPDH* περιείχε:

- |   |   |       |
|---|---|-------|
| ➤ cDNA                                      | → | 3 μl  |
| ➤ BioMix                                    | → | 10 μl |
| ➤ Εκκινητής GAPDH F (50pmol/μl)             | → | 1 μl  |
| ➤ Εκκινητής GAPDH R (50pmol/μl)             | → | 1 μl  |
| ➤ δις απεσταγμένο νερό (ddH <sub>2</sub> O) | → | 5 μl  |

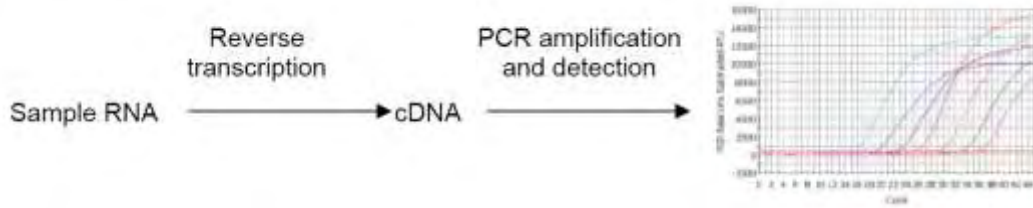
Το BioMix είναι ένα έτοιμο διάλυμα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια που είναι απαραίτητα για τη διεξαγωγή μίας αντίδρασης PCR, όπως το ρυθμιστικό διάλυμα, τα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), τη DNA πολυμεράση και το  $MgCl_2$ , που είναι απαραίτητο για τη δράση του ενζύμου. Η χρήση του έτοιμου διαλύματος στη μέθοδο της PCR περιορίζει τον κίνδυνο επιμόλυνσης και αυξάνει την επαναληψιμότητα του πειράματος.

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- αρχική αποδιάταξη στους  $95^{\circ}C$  για 15 λεπτά
- 36 κύκλοι, στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία επιμέρους στάδια:
  - αποδιάταξη στους  $94^{\circ}C$  για 1 λεπτό
  - υβριδοποίηση-πρόσδεση των εκκινητών στους  $62^{\circ}C$  για 1 λεπτό
  - επιμήκυνση στους  $72^{\circ}C$  για 0,5 λεπτό
- τελική επιμήκυνση στους  $72^{\circ}C$  για 10 λεπτά

### **B.1.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR), γνωστή και ως ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR), είναι μία παραλλαγή της κλασικής PCR που επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου μορίου DNA. Η Real-Time PCR βασίζεται στις γενικές αρχές της κλασικής μεθόδου PCR. Ωστόσο, το κύριο χαρακτηριστικό της είναι ότι το μόριο DNA που ενισχύεται, ποσοτικοποιείται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η ποσοτικοποίηση μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών που παρεμβάλλονται στη διπλή έλικα του DNA. Τα επίπεδα του φθορισμού που μετρούνται από έναν ειδικό ανιχνευτή αντανakλούν τα επίπεδα έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου, καθώς η χρωστική φθορίζει μόνο όταν προσδέεται σε δίκλωνο DNA. Συχνά, η Real-Time PCR συνδυάζεται με την PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) για την ποσοτικοποίηση του mRNA σε κύτταρα ή ιστούς.



**Εικόνα 7.** Η real-time PCR συνδυάζεται συχνά με την PCR αντίστροφης μεταγραφής για την ποσοτικοποίηση του mRNA σε κύτταρα ή ιστούς. Τα αποτελέσματα της real-time PCR αναλύονται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος της real-time PCR χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων *SPARC*, *RUNX2*, *OC*, *MMP-9*, *MMP-13*, *OB*, *OB-R*, *SREBP-2* και *SREBP-1c*. Για την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και η φθορίζουσα ουσία SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Η SYBR Green προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε πραγματικό χρόνο, καθώς μπορεί να συνδεθεί σε όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA, αλλά μόνο σε μια συγκεκριμένη περιοχή κάθε φορά, αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου.

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μετά από σύγκριση των μεταγράφων του εκάστοτε υπό μελέτη γονιδίου με αυτών του γονιδίου αναφοράς (σχετική ποσοτικοποίηση) με τη συγκριτική μέθοδο CT (comparative CT method). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί μαθηματικούς τύπους, όπως ο  $\Delta\Delta C_t$ , προκειμένου να υπολογιστεί ο σχετικός λόγος έκφρασης (R) του υπό μελέτη γονιδίου βάσει της διαφοράς των κύκλων του PCR μεταξύ του γονιδίου αυτού και του γονιδίου αναφοράς. Στην παρούσα εργασία η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του εξής μαθηματικού τύπου:  $R = 2^{-(\Delta C_t \text{ δείγματος} - \Delta C_t \text{ control})}$

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Κάθε δείγμα ελέγχθηκε τόσο για το υπό μελέτη γονίδιο όσο και για το γονίδιο αναφοράς. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο *GAPDH*. Επιπλέον, για κάθε δείγμα η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές. Τα cDNA που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις αντιδράσεις ήταν αραιωμένα 1:2.

Το διάλυμα αντίδρασης για τον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε ενός από τα γονίδια που περιγράφονται παρακάτω περιείχε:

➤ cDNA → 2 μl

- SYBR Green → 12 μl
  - Εκκινητής Forward (20p/mol) → 1 μl
  - Εκκινητής Reverse (20p/mol) → 1 μl
  - δις απεσταγμένο νερό → 4 μl
- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν 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 30 δευτερόλεπτα
      - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στη θερμοκρασία του σημείου τήξεως (melting temperature, T<sub>m</sub>) του κάθε εκκινητή για 30 δευτερόλεπτα
      - επιμήκυνση στους 72°C για 15 δευτερόλεπτα
    - τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<b>SPARC</b>	F: 5'-AAGATCCATGAGAATGAGAAG-3' R: 5'-AAAAGCGGGTGGTGCAATG-3'	217
<b>RUNX2</b>	F: 5'-GATGACACTGCCACCTCTGAC-3' R: 5'-GGGATGAAATGCTTGGGAAC-3'	121
<b>OC</b>	F: 5'-AGAGTCCAGCAAAGGTGCAG-3' R: 5'-TCAFCCAACCTCGTCACAGTC-3'	171
<b>MMP-9</b>	F: 5'-TTGACAGCGACAAGAAGTGG -3' R: 5'-GCCATTCACGTCGTCCTTAT-3'	120
<b>MMP-13</b>	F: 5'-TGGCATTGCTGACATCATGA-3' R: 5'-GCCAGAGGGCCCATCAA-3'	75
<b>OB</b>	F: 5'-AAAGGTGCAGGCAGAGACA-3' R: 5'-TCAGCGGAACGTCACAGTC-3'	168
<b>OB-R</b>	F: 5'-AGGCCAGGCCCAAAGGCAG-3' R: 5'-TGGACAATCATCGATCCGTG-3'	125
<b>SREBP-2</b>	F: 5'-AAGTCTGGCGTTCTGAGGAA-3' R: 5'-AGGTCCACCTCATTGTCCAC-3'	183
<b>SREBP-1c</b>	F: 5'-AGTCGTGCTAGATGTAGCTA-3'	134

	R: 5'-TACTCTACTTCCCAACAGTC-3'	
GAPDH	F: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'	185
	R: 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'	

**Πίνακας 4.** Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων του ενδιαφέροντος σε επίπεδο μεταγραφής με τη μέθοδο της real-time PCR, καθώς και τα μεγέθη των προϊόντων PCR μετά την ενίσχυση της αλληλουχία-στόχου.

### B.1.6. Απομόνωση πρωτεΐνης από χονδροκύτταρα

Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα απομονώθηκε από τα χονδροκύτταρα προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο και τη μέτρηση της έκφρασης των γονιδίων του ενδιαφέροντος σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Για το σκοπό αυτό, το ίζημα χονδροκυττάρων διαλύθηκε σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος λύσης (lysis buffer), το οποίο περιείχε:

- 1M Tris-HCl, pH=8
- 0,5M EDTA
- 1M NaCl
- 100% γλυκερόλη
- 100% Triton X-100
- δις απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O)

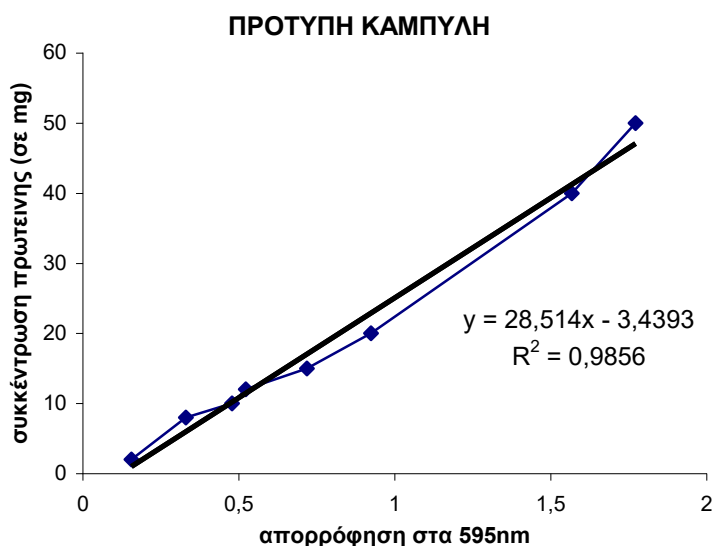
Στο κυτταρικό ίζημα πριν από το διάλυμα λύσης προστίθονταν κάθε φορά αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitor cocktail tablets EDTA-free, Roche, Mannheim, Germany), προκειμένου να αποφευχθεί η διάσπαση των κυτταρικών πρωτεϊνών από τις πρωτεάσες που απελευθερώνονται από τα κυτταρικά οργανίδια κατά τη διάλυση των κυττάρων.

Πιο αναλυτικά, τα στάδια της απομόνωσης πρωτεΐνης είναι ως εξής:

- Συλλογή των χονδροκυττάρων από τις φλάσκες, όπως περιγράφεται σε προηγούμενη ενότητα
- Προσθήκη 10-30μl αναστολέων πρωτεασών ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων κι επαναδιάλυση του ιζήματος.
- Προσθήκη 100-300μl διαλύματος λύσης ανάλογα πάλι με τον αριθμό των κυττάρων κι επαναδιάλυση του ιζήματος.
- Μηχανική ανάδευση σε vortex κι ακόλουθη επώαση των δειγμάτων σε πάγο για 10 λεπτά. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται 3 φορές.

- Φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C.
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο.
- Αποθήκευση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στους -80°C.

Την απομόνωση πρωτεΐνης από χονδροκύτταρα ακολουθεί φωτομέτρηση προκειμένου να γίνει ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του εκάστοτε δείγματος. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από τα κύτταρα έγινε με την μέθοδο Bradford και την χρήση του πακέτου της Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay). Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant G-250 να αλλάζει το μέγιστο της απορρόφησής της από τα 460nm στα 595nm όταν δεσμευτεί σε μια πρωτεΐνη. Για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών στα δείγματα δημιουργήθηκε, αρχικά, μια πρότυπη καμπύλη συσχέτισης απορρόφησης και πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, με την χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, ποσότητες που κυμαίνονται από 1μg έως 20μg αλβουμίνης ορού βοός (Bovine Serum Albumine-BSA) διαλύθηκαν σε 800μl dH<sub>2</sub>O. Κατόπιν ακολούθησε προσθήκη 200μl χρωστικής σε κάθε δείγμα πρωτεΐνης, επώαση του μίγματος για 5min σε θερμοκρασία δωματίου, ήπια ανάδευση των δειγμάτων αρκετές φορές, μεταφορά σε κυβέττα και φωτομέτρηση στα 595nm. Από τις τιμές απορρόφησης των διαφόρων συγκεντρώσεων κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη.



**Εικόνα 8.** Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών.

Για την ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης προστέθηκαν 5μl από κάθε δείγμα διαλύματος πρωτεΐνης σε 495μl διαλύματος Brad-

ford και ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία. Με βάση την πρότυπη καμπύλη προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνικών δειγμάτων.

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

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους. Η διάλυση των πρωτεϊνών σε διάλυμα δωδεκακυλο-θειϊκού νατρίου (SDS) είναι αυτή που επιτρέπει το διαχωρισμό τους κυρίως βάσει της μάζας τους. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά 2 αμινοξέα, προσδίδοντας έτσι στην αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη φορτίο ανάλογο της μάζας της. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο από το φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης, καθιστώντας το αρχικό φορτίο αμελητέο. Τα σύμπλοκα SDS-αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται σε μια λεπτή κατακόρυφη πλάκα πολυακρυλαμιδίου με κατεύθυνση ροής από επάνω προς τα κάτω.

#### B.1.7.1. Αποδιάταξη των πρωτεϊνών

Πριν την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 35μg. Το διάλυμα αποδιάταξης περιείχε :

- x μl (20μg) πρωτεϊνικό δείγμα
- 5 μl Sample Buffer
- 2 μl Reducing Buffer
- y μl ddH<sub>2</sub>O (μέχρι τελικό όγκο 20μl)

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

#### B.1.7.2. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφορητική συσκευή Xcell Surelock (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) και η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής :



- Στήσιμο της ηλεκτροφορητικής συσκευής
- Προσθήκη 600ml Running Buffer στο μπροστά και πίσω μέρος της συσκευής. Στο μεσαίο μέρος της συσκευής προστίθενται 200ml Running Buffer και 500μl Antioxidant
- Φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Στο πρώτο πηγάδι της πηκτής από αριστερά φορτώνεται ο μάρτυρας.
- Ηλεκτροφόρηση στα 200V και 120mA για 50min
- Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης προετοιμάζονται τα διαλύματα και τα υλικά που θα χρησιμοποιηθούν στην ανοσοαποτύπωση.

### **B.1.8. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot)**

Η ανοσοαποτύπωση ή αποτύπωση Western επιτρέπει την ανίχνευση μιας μικρής ποσότητας πρωτεΐνης μέσα από ένα πλήθος άλλων πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρει σε ένα κύτταρο ή κυτταρικό υγρό. Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνικών δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου ακολουθεί η μεταφορά τους (με αποτύπωση, κυρίως ηλεκτροαποτύπωση) σε μια επιφάνεια, συνήθως μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, που τις κάνει να αντιδρούν πιο εύκολα με το αντίσωμα που προστίθεται μετά και είναι ειδικό για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν. Το σύμπλοκο αντισώματος – αντιγόνου στην επιφάνεια μπορεί να ανιχνευθεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο. Σήμανση του δεύτερου αντισώματος με ραδιενέργεια ή με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (Horseradish Peroxidase, HRP) δημιουργεί μια σκοτεινή γραμμή σε φιλμ ακτίνων X (αυτοραδιογραφία), που αντιπροσωπεύει τα επίπεδα της υπό μελέτης πρωτεΐνης.

Για την μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ηλεκτροαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Xcell Surelock. Πριν την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών επωάζονται σε Transfer Buffer τα εξής υλικά :

- 1 μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (5cm x 8cm)
- 6 σφουγγαράκια
- 2 χαρτιά Whitman (5cm x 8cm)
- Πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών κατασκευάζεται το sandwich:

- 3 σφουγγαράκια
- 1 χαρτί Whitman
- Πηκτή πολυακρυλαμιδίου
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης
- 1 χαρτί Whitman
- 3 σφουγγαράκια

Ακολούθως, το sandwich μεταφέρεται στο κουτί Xcell Blot Module και τοποθετείται στη συσκευή Xcell Surelock. Προστίθενται 600ml ddH<sub>2</sub>O στο μπροστά και πίσω τμήμα της συσκευής, ενώ στο μεσαίο προστίθενται 200ml Transfer Buffer. Η ηλεκτροαποτύπωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται σε 30V και 200mA για 1h και 40min.

Μετά το πέρας της μεταφοράς ακολουθεί βήσιμο της μεμβράνης με Ponceau μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών. Ακολουθούν διαδοχικά ξεπλύματα της μεμβράνης με TBS-T (1 φοράx15min και 3 φορέςx5min). Η μεμβράνη μεταφέρεται σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% (Blotting Grade Blocker, BioRad) για 1,5-2h για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος, ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη και κατόπιν έκπλυση 3 φορές με TBS-T για 10min.

- Αμέσως μετά η μεμβράνη επώαζεται ολονύκτια στους 4°C με το εκάστοτε αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση σε PBS-0,1% Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C
- Απομάκρυνση του πρώτου αντισώματος και έκπλυση της μεμβράνης με TBS 3 φορές για 10min, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρώτου αντισώματος
- Επώαση της μεμβράνης με δεύτερο αντίσωμα, συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα, στην κατάλληλη αραίωση σε PBS-0,1% Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομάκρυνση του δεύτερου αντισώματος και έκπλυση 3 φορές με TBS για 10min.
- Η ανίχνευση γίνεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

Πρωταρχικά	Εταιρεία	Είδη	Μοριακό	Αραίωση
------------	----------	------	---------	---------

Αντισώματα			βάρος, MW (kDa)	
β-catenin	Cell signaling (6B3)	Rabbit	92	1:1000
RUNX2	Santa Cruz (sc-8566)	Goat	48	1:1000
GAPDH	Santa Cruz (sc-166545)	Mouse	38	1:500
Actin	Santa Cruz (sc-1616)	Goat	43	1:1000
Δεύτερα Αντισώματα	Εταιρεία	Σύζευξη	Μοριακό βάρος, MW (kDa)	Αραίωση
Mouse-anti-goat	Santa Cruz (sc-2354)	HRP	-	1:5000
Goat-anti-rabbit	Zymed (65-6120)	HRP	-	1:5000
Goat-anti-mouse	Zymed (81-6520)	HRP	-	1:5000
Goat-anti-rabbit	Santa Cruz (sc-2012)	FITC	-	1:150

**Πίνακας 5.** Αναλυτικά στοιχεία των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση με τη μέθοδο Western Blot των πρωτεϊνών β-κατενίνη, RUNX2, GAPDH και β-ακτίνη.

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-αμινο-φθαλικό, 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.

### B.1.9. Επίδραση με οστεονεκτίνη (SPARC)

Η επίδραση με οστεονεκτίνη χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της δράσης της πρωτεΐνης στα φυσιολογικά και στα OA χονδροκύτταρα. Για το σκοπό αυτό, τα χονδροκύτταρα μεταφέρθηκαν σε πλάκες των 6 πηγαδιών (six-well plates) κι όταν

κάλυψαν το 90-95% της επιφάνειας των πηγαδιών τους χορηγήθηκε ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη SPARC ανθρώπου (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) διαλυμένη σε θρεπτικό υλικό DMEM/F-12 χωρίς FBS σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml για το χρονικό διάστημα των 48 ωρών. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος των 48 ωρών ακολούθησε απομόνωση RNA και πρωτεΐνης από τα κύτταρα. Αξιοσημείωτο είναι ότι μία ημέρα πριν την προσθήκη της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης τα κύτταρα επωάζονται σε θρεπτικό υλικό DMEM/F-12 χωρίς FBS. Επιπλέον, κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν προκειμένου να διαπιστωθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου.

### **B.1.10. Γονιδιακή αποσιώπηση με siRNA**

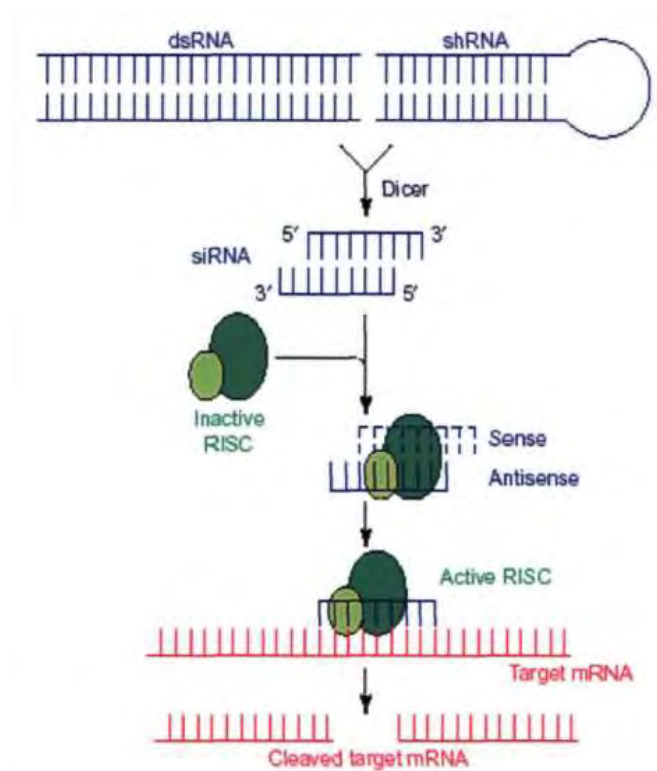
Η εξειδικευμένη αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στη σύγχρονη έρευνα. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πειραματικές μέθοδοι που επιτρέπουν την επιλεκτική καταστολή της έκφρασης γονιδίων του ενδιαφέροντός μας. Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο αποτελεί η γονιδιακή αποσιώπηση με χρήση siRNA, η οποία επιτρέπει την καταστολή της έκφρασης γονιδίων σε κύτταρα καλλιέργειας.

Η μέθοδος της γονιδιακής αποσιώπησης με τη χρήση siRNA εκμεταλλεύεται ένα φυσικό, αρχέγονο μηχανισμό με τον οποίο τα φυτά και τα κατώτερα σπονδυλωτά καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων, όταν απαντώνται στο κύτταρο δίκλιωνα μόρια RNA της ίδιας αλληλουχίας. Ο μηχανισμός αυτός είναι γνωστός ως μηχανισμός παρεμβολής του RNA (RNA interference – RNAi). Η παρεμβολή του RNA προκαλεί τη μετα-μεταγραφική αποσιώπηση ενός γονιδίου (PostTranscriptional Gene Silencing – PTGS) μετά από ενδογενή παραγωγή ή εισαγωγή στο κύτταρο ενός μικρού παρεμβατικού μορίου RNA (small interfering RNA – siRNA) με αλληλουχία συμπληρωματική με αυτή του γονιδίου.

Η γονιδιακή αποσιώπηση μέσω της οδού του RNAi ενεργοποιείται από την ύπαρξη ενός δίκλωνου μορίου RNA. Το ένζυμο Dicer το οποίο ανήκει στην οικογένεια των RNAσών III κόβει το δίκλινο RNA σε τμήματα μήκους 22 περίπου νουκλεοτιδίων, τα αποκαλούμενα siRNAs. Τα siRNAs ζευτλιγονται και η μία από τις δύο έλικες ενσωματώνεται σε ένα σύμπλεγμα μορίων που συνιστούν την νουκλεάση RISC (RNA-Induced Silencing Complex – RNA-σύμπλοκο που επάγει τη γονιδιακή αποσιώπηση). Η έλικα του δίκλωνου RNA που ενσωματώνεται στο RISC υβριδίζεται

με το συμπληρωματικό RNA-στόχο ενεργοποιώντας την νουκλεάση μέσα στο σύμπλοκο RISC, η οποία κατακεραματίζει το στόχο. Το RISC έχει τη δυνατότητα να ανακυκλωθεί και να αποικοδομήσει πολλά mRNA-στόχους. Έτσι, από την εισαγωγή μιας αλληλουχίας σε ένα κύτταρο σε περιορισμένη ποσότητα καθίσταται δυνατή η αποσιώπηση ενός σχετικά μεγάλου αριθμού μορίων mRNA.

Για να επιτευχθεί η γονιδιακή αποσιώπηση μέσω της οδού RNAi έχουν συντεθεί τεχνητά μόρια siRNAs, τα οποία δρουν έναντι επιλεγμένων μορίων στόχων. Η εισαγωγή των εξωγενών μορίων siRNA στα κύτταρα επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλων φορέων, όπως τα πλασμίδια, ή λιποσωμάτων, όπως η λιποφεκταμίνη. Η λιποφεκταμίνη, μία λιπιδιακή κατιονική δομή με υψηλή αποτελεσματικότητα εισαγωγής του siRNA στα κύτταρα, συνδέεται με το μόριο siRNA, εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων με ενδοκυττάρωση και το απελευθερώνει.



**Εικόνα 9.** Ο μηχανισμός της παρεμβολής του RNA. Τα δίκλινα μόρια του RNA (dsRNAs) μετατρέπονται από το ένζυμο DICER σε μικρά παρεμβατικά RNAs (siRNAs) 21-23 νουκλεοτιδίων σε μήκος με δύο νουκλεοτίδια να υπερεκτείνονται σε κάθε άκρο. Το ξεδίπλωμα του RNA από μια ελικάση οδηγεί στην ένωση του ενός κλώνου του RNA (antisense κλώνου) με το ανενεργό σύμπλοκο RISC. Με τον τρόπο αυτό ενεργοποιείται το RISC και κόβει το mRNA που φέρει την ομόλογη αλληλουχία.



**Εικόνα 10.** Σχηματική δράση της λιποφεκταμίνης. Η λιποφεκταμίνη είναι κατιονικά λιπίδια που σχηματίζουν λιποσώματα με θετικά φορτισμένη επιφάνεια, τα οποία διευκολύνουν την είσοδο των νουκλεϊκών οξέων στο ευκαρυωτικό κύτταρο. Τα θετικά φορτισμένα λιποσώματα αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες του σκελετού των νουκλεϊκών οξέων και σχηματίζεται σύμπλοκο. Στη συνέχεια, αλληλεπιδρούν με την αρνητικά φορτισμένη κυτταροπλασματική μεμβράνη, επιτρέποντας την τήξη του συμπλόκου με αυτή. Το σύμπλοκο ενδοκυτταρώνεται, διαφεύγει από το ενδόσωμα και απελευθερώνεται το νουκλεϊκό οξύ.

### B.1.10.1. Γονιδιακή αποσιώπηση του RUNX2 με siRNA

Μία ημέρα πριν γίνει η επιμόλυνση με το siRNA κατά του RUNX2 τα χονδροκύτταρα μεταφέρονται σε πλάκα των 6 πηγαδίων και επωάζονται σε 1ml θρεπτικού υλικού DMEM/F-12 χωρίς αντιβιοτικά/πηγάδι για 24h στους 37°C στον κλίβανο. Για την ανάπτυξη των κυττάρων στα πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης με siRNA χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υλικά Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) και DMEM/F-12 χωρίς αντιβιοτικά. Για την εισαγωγή του siRNA (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε η λιποφεκταμίνη.

Η αλληλουχία του siRNA RUNX2 που χρησιμοποιήθηκε είναι:

**sense** : 5' CCUCGAAUGGCAGCACGCUAUUAAA 3'

**antisense:** 5' UUUAAUAGCGUGCUGCCAUUCGAGG 3'

Αναλυτικά, η διαδικασία που ακολούθηθηκε:

- Προσθήκη 5μl λιποφεκταμίνης σε 495μl Opti-MEM I Reduced Serum Medium χωρίς FBS. Καλή ανάδευση και επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 5μl siRNA Leptin σε 495μl Opti-MEM I Reduced Serum Medium χωρίς FBS. Καλή ανάδευση.
- Ανάμειξη του διαλύματος του siRNA RUNX2 με το διάλυμα της λιποφεκταμίνης.

Καλή ανάδευση και επώαση για 20min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα πηγάδια της πλάκας.
- Προσθήκη 500μl μίγματος siRNA/Lipofectamin σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας.
- Προσθήκη 500μl Opti-MEM επιπλέον σε κάθε πηγαδάκι.
- Επώαση για 4-6h στους 37°C στον κλίβανο.
- Αφαίρεση του Opti-MEM – siRNA/Lipofectamin.
- Προσθήκη 1ml θρεπτικού υλικού DMEM/F-12 χωρίς αντιβιοτικά ανά πηγάδι.
- Επώαση των κυττάρων για 48h στον κλίβανο.

Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα στα οποία χορηγήθηκε θρεπτικό υλικό Opti-MEM χωρίς FBS και ως αρνητικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα στα οποία χορηγήθηκε Stealth RNAi με τη διαδικασία επιμόλυνσης που περιγράφηκε παραπάνω. Το RNA αυτό είναι σχεδιασμένο, έτσι ώστε να έχει παρόμοιο περιεχόμενο σε βάσεις GC με το siRNA που χρησιμοποιείται. Η οποιαδήποτε μείωση σε ποσοστά έκφρασης mRNA και πρωτεϊνών, καθώς και οι siRNA, μελετώνται σε σύγκριση με το αρνητικό δείγμα ελέγχου, το οποίο με τη σειρά του δεν θα πρέπει να έχει μεγάλες έως και καθόλου διαφορές στα επίπεδα έκφρασης και βιωσιμότητας σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Υπό αυτές τις συνθήκες και εφόσον τα ποσοστά αποσιώπησης των υπό μελέτη γονιδίων είναι υψηλά μετά από την χορήγηση συγκεκριμένης δόσης siRNA, η μέθοδος θεωρείται επιτυχής.

### **B.1.11. Στατιστική ανάλυση**

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα στατιστικής SPSS Statistics 11. Συγκεκριμένα εφαρμόστηκαν οι δοκιμασίες unpaired t test και paired t test και σε κάθε περίπτωση στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές με  $p < 0.05$ .

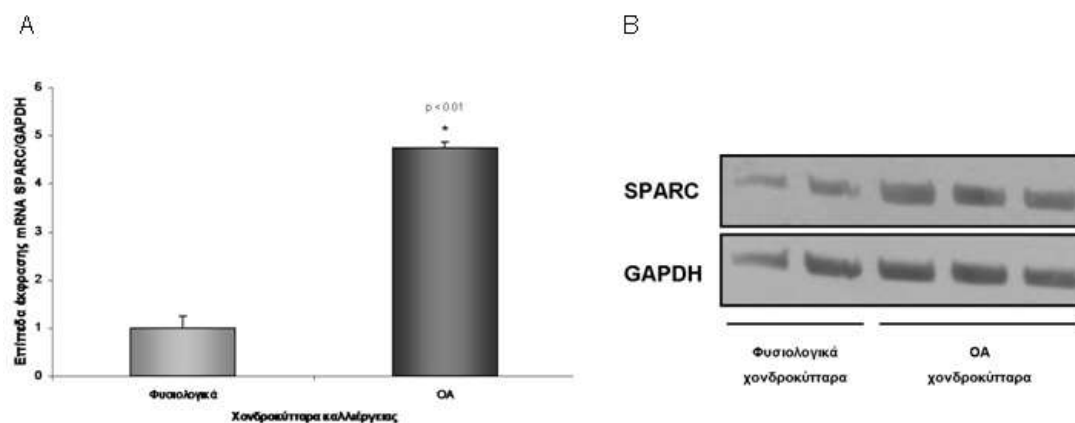




## B.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### B.2.1. Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *SPARC* σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά (OA) χονδροκύτταρα καλλιέργειας

Στη σειρά των πειραμάτων που διεξήχθησαν στην παρούσα εργασία, αρχικά αξιολογήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *SPARC* σε επίπεδο μεταγραφής και πρωτεΐνης σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα καλλιέργειας. Η μελέτη των επιπέδων του *SPARC* mRNA με τη μέθοδο της real-time PCR έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά κύτταρα που αποτελούν την ομάδα ελέγχου ( $p < 0.01$ ) (εικόνα). Το ίδιο αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και στο επίπεδο της πρωτεΐνης με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (εικόνα 11B).

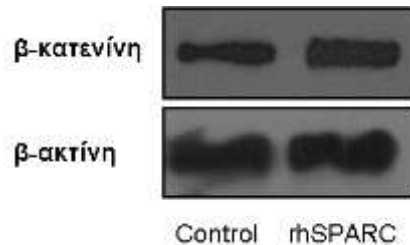


**Εικόνα 11.** Τα επίπεδα έκφρασης του *SPARC* σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα ανθρώπου. **A.** Τα επίπεδα του mRNA ομαλοποιημένα ως προς τα επίπεδα έκφραση του γονιδίου αναφοράς *GAPDH*. **B.** Η πρωτεΐνη *GAPDH* χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

### B.2.2. Μελέτη των επιπέδων της ενεργής μορφής της β-κατενίνης σε OA χονδροκύτταρα καλλιέργειας μετά από εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης

Προκειμένου προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του γονιδίου *SPARC* στην OA μελετήθηκε η δράση που ασκεί η πρωτεΐνη στην ενεργοποίηση της β-κατενίνης, κεντρικό μόριο του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνη, στα χονδροκύτταρα. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίσαμε τα επίπεδα της μη φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης μετά από εξωκυττάρια χορήγηση 1μg/ml ανασυνδυασμένης ανθρώπινης

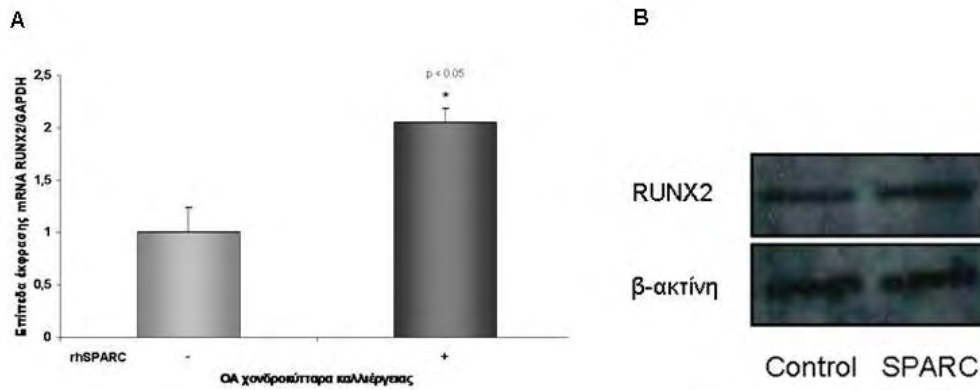
οστεονεκτίνης (rhSPARC) για 48 ώρες σε OA χονδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western έδειξαν ότι τα OA χονδροκύτταρα στα οποία χορηγήθηκε οστεονεκτίνη εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα της ενεργής μορφής της β-κατενίνης.



**Εικόνα 12.** Τα επίπεδα της ενεργούς μορφής της πρωτεΐνης β-κατενίνης σε OA χονδροκύτταρα πριν και μετά την εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης (SPARC). Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

### B.2.3. Μελέτη της έκφρασης του *RUNX2* mRNA σε OA χονδροκύτταρα καλλιέργειας μετά από εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης

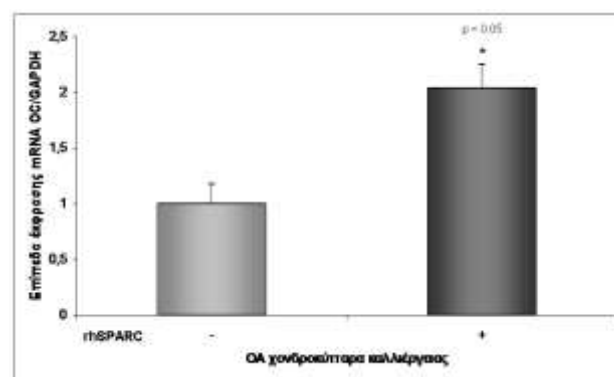
Στη συνέχεια, μελετήσαμε τη δράση που ασκεί η οστεονεκτίνη στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *RUNX2*, ενός γονιδίου-στόχου του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνη. Το γονίδιο *RUNX2* κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που ενέχονται στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά και τα επίπεδα έκφρασής του είναι γνωστό ότι αυξάνονται στα OA χονδροκύτταρα. Για το σκοπό αυτό, χορηγήθηκε σε OA χονδροκύτταρα καλλιέργειας 1μg/ml ανασυνδυασμένης ανθρώπινης οστεονεκτίνης (rhSPARC) για 48 ώρες και ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA του γονιδίου *RUNX2*. Τα αποτελέσματα της real-time PCR έδειξαν ότι η οστεονεκτίνη οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του *RUNX2* σε επίπεδο μεταγραφής ( $p < 0.05$ ). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και στο επίπεδο της πρωτεΐνης.



**Εικόνα 13.** Η οστεονεκτίνη προάγει την έκφραση του *RUNX2* σε επίπεδο μεταγραφής και πρωτεΐνης στα OA χονδροκύτταρα. **A.** Τα επίπεδα έκφρασης του *RUNX2* mRNA μετά από ομαλοποίηση με το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*. **B.** Στην ανάλυση κατά Western Blot, η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

#### B.2.4. Μελέτη της έκφρασης του OC mRNA σε OA χονδροκύτταρα καλλιέργειας μετά από εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης

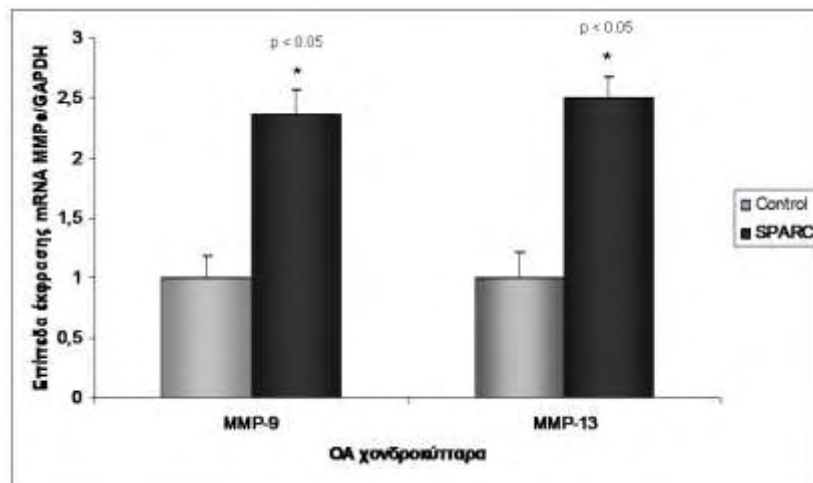
Η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του mRNA του μεταγραφικού παράγοντα *RUNX2* που προκάλεσε η οστεονεκτίνη μας οδήγησε στη μελέτη έκφρασης ενός γονιδίου-στόχου του *RUNX2*. Για το σκοπό αυτό, 1μg/ml ανασυνδυασμένης ανθρώπινης πρωτεΐνης οστεονεκτίνης (rhSPARC) χορηγήθηκε εξωκυττάρια σε OA χονδροκύτταρα και τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γονιδίου *OC* αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο της real-time PCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η οστεονεκτίνη οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της οστεοκαλσίνης σε επίπεδο μεταγραφής ( $p < 0.05$ ).



**Εικόνα 14.** Τα επίπεδα του mRNA της οστεοκαλσίνης (*OC*) ομαλοποιημένα ως προς τα επίπεδα έκφραση του γονιδίου αναφοράς *GAPDH*.

### B.2.5. Μελέτη της έκφρασης του mRNA των MMP-9 και MMP-13 σε OA χονδροκύτταρα καλλιέργειας μετά από εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα MMP-9 και MMP-13, που κατέχουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία του εκφυλισμού του αρθρικού χόνδρου στην OA, φέρουν στον υποκινητή τους θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα RUNX2. Οπότε, μετά την εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης στα OA χονδροκύτταρα αξιολογήθηκαν τα επίπεδα έκφρασής τους σε επίπεδο μεταγραφής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η οστεονεκτίνη οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης και των δύο γονιδίων ( $p < 0.05$ ).

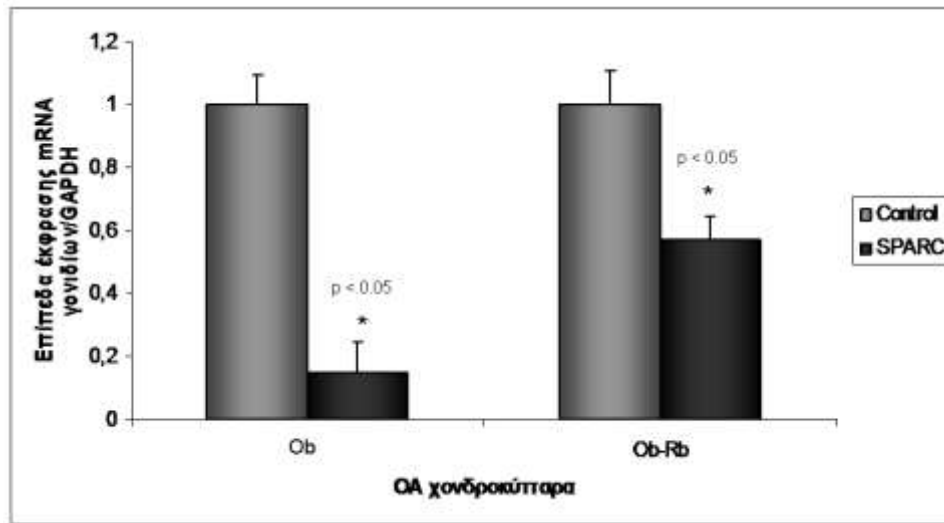


**Εικόνα 15.** Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των MMP-9 και MMP-13 ομαλοποιημένα ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς GAPDH σε OA χονδροκύτταρα πριν και μετά τη χορήγηση οστεονεκτίνης.

### B.2.6. Μελέτη της έκφρασης του mRNA της λεπτίνης και του υποδοχέα της Ob-Rb σε OA χονδροκύτταρα καλλιέργειας μετά από εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης

Η λιποκίνη λεπτίνη και ο υποδοχέας της, Ob-Rb, έχουν βρεθεί ότι υπερεκφράζονται στον OA χόνδρο, προωθούν τον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου και συμβάλλουν στη μεταβολική συνιστώσα της νόσου. Γι'αυτό, εξετάσαμε τη δράση της οστεονεκτίνης στη ρύθμιση της έκφρασής του σε OA χονδροκύτταρα μετά από εξωκυττάρια χορήγηση της πρωτεΐνης στα κύτταρα και αξιολογήσαμε τα επίπεδα έκφρασής τους σε επίπεδο μεταγραφής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η οστεονεκτίνη

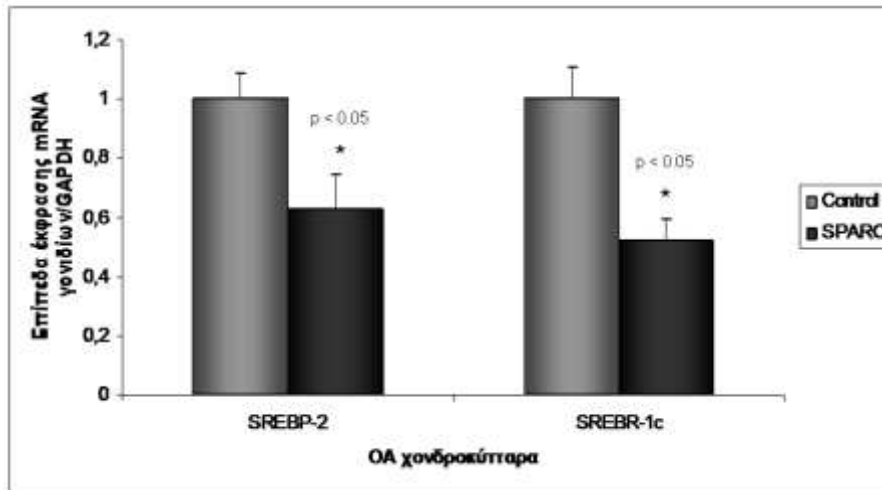
οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης και των δύο γονιδίων ( $p < 0.05$ ).



**Εικόνα 16.** Τα επίπεδα έκφρασης mRNA της λεπτίνης και του υποδοχέα της, Ob-Rb, ομαλοποιημένα ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* σε OA χονδροκύτταρα πριν και μετά τη χορήγηση οστεονεκτίνης.

### B.2.7. Μελέτη της έκφρασης του mRNA των *SREBP-2* και *SREBP-1c* σε OA χονδροκύτταρα καλλιέργειας μετά από εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης

Τα γονίδια *SREBP-2* και *SREBP-1c* κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων που ενέχονται στη σύνθεση της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων, αντίστοιχα. Τα επίπεδα έκφρασής τους ανιχνεύονται αυξημένα στην OA και θεωρείται ότι μπορούν να συμβάλλουν στην ενδοκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων που παρατηρείται στα OA χονδροκύτταρα κατά την εξέλιξη της νόσου. Λαμβάνοντας υπόψη το ρόλο της οστεονεκτίνης στο λιπώδη ιστό, εξετάσαμε τη δράση της οστεονεκτίνης στη ρύθμιση της έκφρασης των *SREBP-2* και *SREBP-1c* σε OA χονδροκύτταρα μετά από εξωκυττάρια χορήγηση της πρωτεΐνης στα κύτταρα και αξιολογήσαμε τα επίπεδα έκφρασής τους σε επίπεδο μεταγραφής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η οστεονεκτίνη οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης και των δύο γονιδίων ( $p < 0.05$ ).

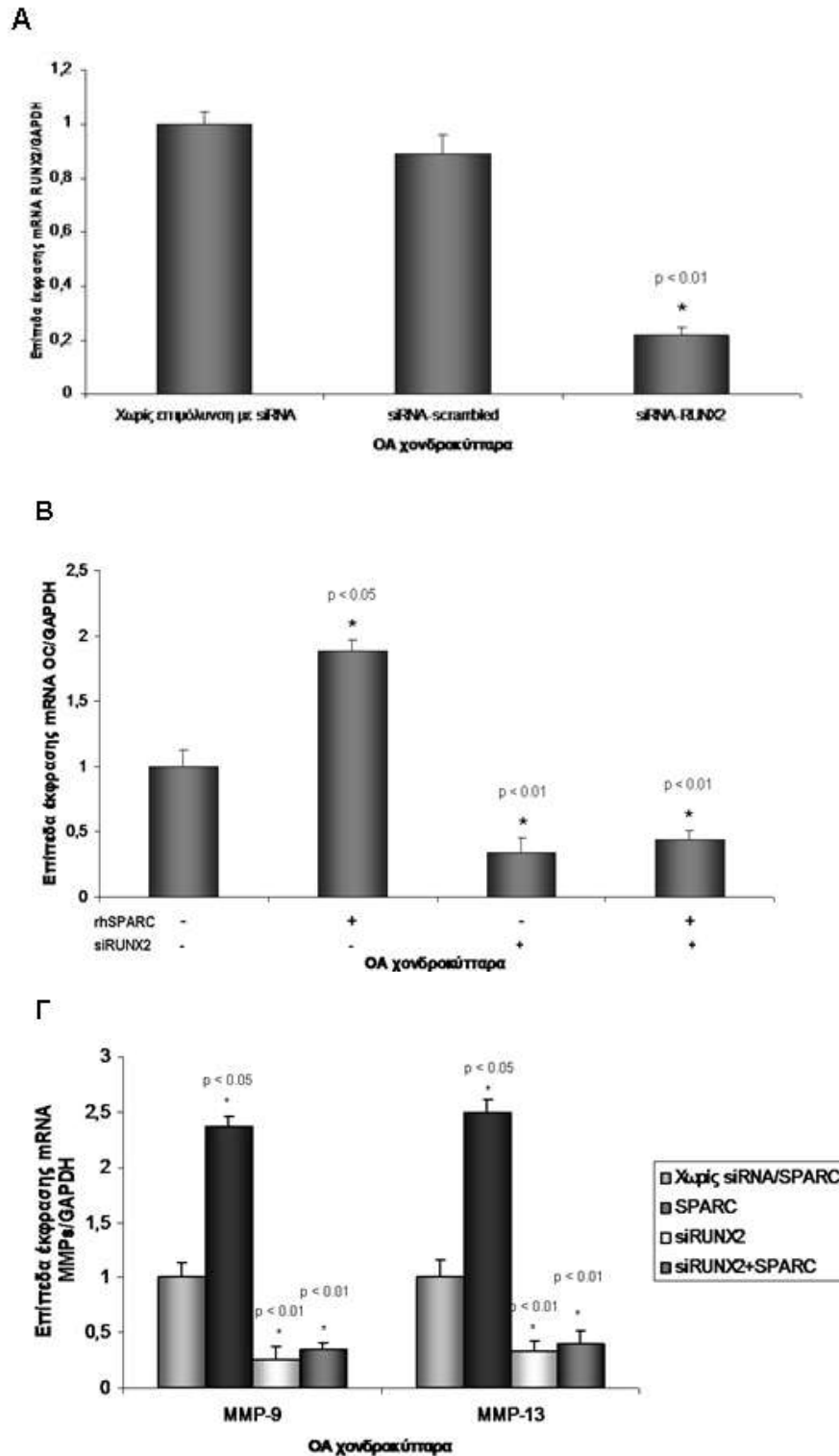


**Εικόνα 17.** Τα επίπεδα έκφρασης mRNA των *SREBP-2* και *SREBP-1c* ομαλοποιημένα ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* σε OA χονδροκύτταρα πριν και μετά τη χορήγηση οστεονεκτίνης.

### **B.2.8. Μελέτη της έκφρασης του mRNA των OC, MMP-9 και MMP-13 σε OA χονδροκύτταρα καλλιέργειας μετά από επιμόλυνση με siRNA κατά του RUNX2 και εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης**

Στη συνέχεια, αξιολογήσαμε εάν η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του mRNA των γονιδίων *OC*, *MMP-9* και *MMP-13* που προκάλεσε η οστεονεκτίνη οφείλεται στη δράση του μεταγραφικού παράγοντα RUNX2. Για το σκοπό αυτό, έγινε γονιδιακή αποσιώπηση του RUNX2 με επιμόλυνση OA χονδροκυττάρων με siRNA κατά του μεταγραφικού παράγοντα και ταυτόχρονη χορήγηση 1μg/ml ανασυνδυασμένης ανθρώπινης οστεονεκτίνης (rhSPARC). Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με μελέτη των επιπέδων έκφρασης mRNA και πρωτεΐνης του RUNX2 με τις μεθόδους της real-time PCR και ανοσοαποτύπωσης κατά Western, αντίστοιχα.

Ακολούθως, αξιολογήσαμε τα επίπεδα έκφρασης των *OC*, *MMP-9* και *MMP-13* mRNA μετά την αποσιώπηση της έκφρασης του RUNX2 και μετά από ταυτόχρονη χορήγηση rhSPARC. Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι η αναστολή του RUNX2 οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης mRNA των *OC*, *MMP-9* και *MMP-13*, η οποία διατηρήθηκε και μετά τη χορήγηση της οστεονεκτίνης, υποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη επάγει την έκφραση των γονιδίων αυτών στα OA χονδροκύτταρα μέσω της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα RUNX2.



**Εικόνα 18.** Επίπεδα έκφρασης mRNA γονιδίων μετά από γονιδιακή αποσιώπηση του RUNX2 με χρήση siRNA και παράλληλη χορήγηση εξωκυττάριας οστεονεκτίνης. **A.** Μέτρηση των επιπέδων mRNA του *RUNX2* για την αξιολόγηση της επιτυχίας της επιμόλυνσης με siRNA-RUNX2. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες στις οποίες δεν έγινε αναστολή (untransfected) και καλλιέργειες στις οποίες προστέθηκε siRNA-scrambled. **B.** Τα επίπεδα έκφρασης mRNA της οστεοκαλσίνης μετά τη γονιδιακή αποσιώπηση του RUNX2 και παράλληλη χορήγηση

εξωκυττάριας οστεονεκτίνης. Γ. Τα επίπεδα έκφρασης mRNA των MMP-9 και MMP-13 μετά τη γονιδιακή αποσιώπηση του RUNX2 και παράλληλη χορήγηση εξωκυττάριας οστεονεκτίνης.



## B.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (OA) αποτελεί μία από τις πιο κοινές μορφές χρόνιας μυοσκελετικής νόσου με σημαντικές κοινωνικο-οικονομικές επιπτώσεις παγκοσμίως. Ωστόσο, η παθογένεια της νόσου δεν είναι πλήρως κατανοητή. Το κύριο χαρακτηριστικό της OA είναι ο προοδευτικός εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου, μία διαδικασία στην οποία συμβάλλει μία πληθώρα μορίων που συναντώνται στην ECM του ιστού. Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε το ρόλο της κυτταροθεμελιακής πρωτεΐνης οστεονεκτίνης της ECM του αρθρικού χόνδρου στις αλλαγές που υφίσταται ο ιστός κατά την ανάπτυξη της OA, καθώς και τις δράσεις που ασκεί σε αυτόν μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -κατενίνη.

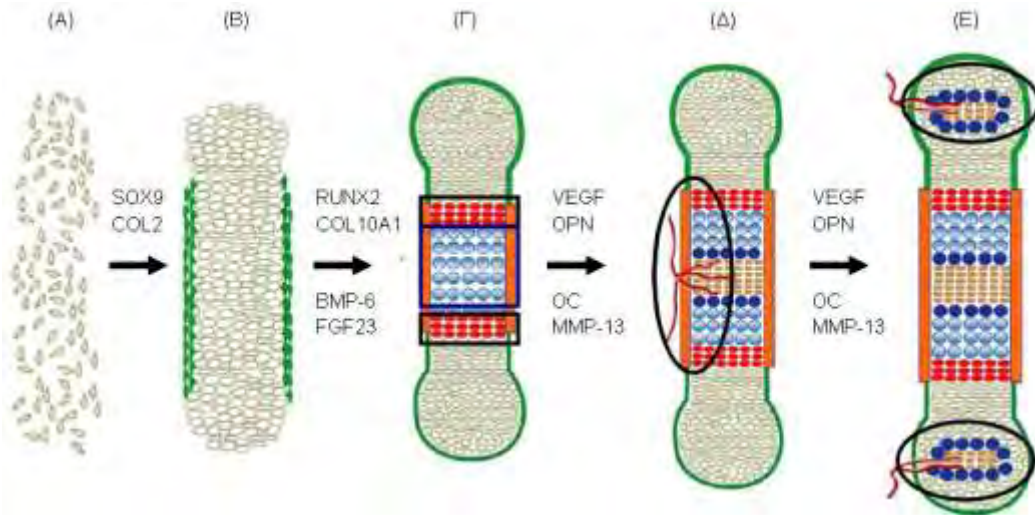
Η οστεονεκτίνη ταυτοποιήθηκε αρχικά ως μία πρωτεΐνη που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στην ECM των οστών. Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται και σε άλλους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του αρθρικού χόνδρου. Ο Chandrasekhar και οι συνεργάτες του έδειξαν για πρώτη φορά το 1994 ότι η οστεονεκτίνη εκφράζεται στον αρθρικό χόνδρο κουνελιών.<sup>12</sup> Επίσης, χαμηλά επίπεδα έκφρασης της οστεονεκτίνης ανιχνεύθηκαν και στην εν τω βάθει στιβάδα του αρθρικού χόνδρου ανθρώπου από τον Nakamura και τους συνεργάτες του δύο χρόνια αργότερα.<sup>11</sup> Στην παρούσα μελέτη, η αξιολόγηση των επιπέδων της πρωτεΐνης σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα καλλιέργειας έδειξε, επίσης, χαμηλά επίπεδα έκφρασής της.<sup>11</sup>

Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα χονδροκύτταρα καλλιέργειας προερχόμενα από τον αρθρικό ιστό ασθενών που εμφάνιζαν OA παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης της οστεονεκτίνης, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση της πρωτεΐνης αυξάνεται κατά την ανάπτυξη της νόσου. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του Nakamura και των συνεργατών του, οι οποίοι ανίχνευσαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης στο αρθρικό υγρό και στην επιφανειακή και στην ενδιάμεση στιβάδα αρθρικού χόνδρου προερχόμενων από ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA) και OA.<sup>11</sup> Παρά την ύπαρξη, όμως, δεδομένων για τη διαφοροποιημένη έκφραση της οστεονεκτίνης στην OA και την πιθανή συμμετοχή της κυτταροθεμελιακής πρωτεΐνης στην παθοφυσιολογία της νόσου, δεν διεξήχθησαν περαιτέρω μελέτες για την αξιολόγηση του ρόλου της.

Οπότε, στην παρούσα εργασία, λαμβάνοντας υπόψη το ρόλο της οστεονεκτίνης στα οστά και το λιπώδη ιστό, συνεχίσαμε τη μελέτη για τη διερεύνηση της πιθανής συμμετοχής της οστεονεκτίνης στο μηχανισμούς της υπερτροφίας που ενέχεται στην παθολογία της ΟΑ, καθώς και στη μεταβολική συνιστώσα της νόσου.

Στην ΟΑ, ο αρθρικός χόνδρος εκτός από τον εκφυλισμό που υφίσταται και αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό της νόσου, σταδιακά κατά την εξέλιξή της εμφανίζει και άλλες αλλοιώσεις, συμπεριλαμβανομένων της διαφοροποίησης του φαινοτύπου του σε υπερτροφικό και της ανάπτυξης οστεοφύτων. Συγκεκριμένα, τα ΟΑ χονδροκύτταρα του ιστού υιοθετούν χαρακτηριστικά των υπερτροφικών χονδροκυττάρων, μία διαδικασία που φυσιολογικά λαμβάνει χώρα κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση (ΕΟ), τη διαδικασία σχηματισμού των μακρών οστών από προσχηματισμένο χόνδρο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του σκελετικού συστήματος των θηλαστικών.<sup>106-107</sup> Κατά τα διάφορα στάδια της ΕΟ, τα χονδροκύτταρα πολλαπλασιάζονται, ωριμάζουν, διαφοροποιούνται σε υπερτροφικά και τελικά αποπίπτουν λόγω της εισβολής αιμοφόρων αγγείων με αποτέλεσμα τη σταδιακή αντικατάσταση του αρθρικού χόνδρου από σπογγώδες οστό.<sup>108</sup> (εικ. 19) Τα χαρακτηριστικά αυτά υιοθετούν και τα ΟΑ χονδροκύτταρα, συμβάλλοντας στον περαιτέρω εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου και στην επασβέστωση που υφίσταται ο ιστός στα τελευταία στάδια της νόσου.<sup>109</sup>

Κατά την ανάπτυξη του σκελετικού συστήματος, στην τελική διαφοροποίηση των προγονικών μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες και χονδροκύτταρα συμμετέχουν πληθώρα μεταγραφικών και αυξητικών παραγόντων και ενδοκυττάρων μονοπατιών σηματοδότησης, όπως το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη. Το μονοπάτι αυτό έχει διττό ρόλο στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, καθώς έχει την ικανότητα να καταστέλλει τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε χονδροκύτταρα, αλλά παράλληλα απαιτείται για τη μετατροπή των τελευταίων σε υπερτροφικά.<sup>90,110</sup> Μελέτες έχουν δείξει ότι το μονοπάτι συμμετέχει και στην παθοφυσιολογία και στην εξέλιξη της ΟΑ.<sup>91</sup> Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει, επίσης, ότι η οστεονεκτίνη μπορεί να επάγει το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης σε πρόδρομα λιποκύτταρα και να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων του μονοπατιού.<sup>103</sup> Γι' αυτό, μελετήσαμε εάν η οστεονεκτίνη μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση του μονοπατιού και στα χονδροκύτταρα. Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι η πρωτεΐνη μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση της ενεργής μορφής της β-κατενίνης στα ΟΑ χονδροκύτταρα.



**Εικόνα 19.** Τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα και οι παράγοντες που δρουν κατά τη διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης. (Α) Πυρήνας μεσεγχυματικών κυττάρων, (Β) Χονδροκύτταρα που πολλαπλασιάζονται, (Γ) Προ-υπερτροφικά και υπερτροφικά χονδροκύτταρα, (Δ) Οστεοποίηση εξωκυττάριου στρώματος, είσοδος αγγείων και αντικατάσταση των χονδροκυττάρων σε οστεοβλάστες, (Ε) 2<sup>ο</sup> κέντρο οστεοποίησης, αύξηση οστού.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεονεκτίνη έχει την ικανότητα να ενισχύει τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε οστεοβλάστες.<sup>43,100,103</sup> Στη φυσιολογική διαδικασία της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες κατά την οστεοποίηση συμμετέχουν μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι στη συνέχεια επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων χαρακτηριστικών των οστεοβλαστών. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες των οστεοβλαστών, όπως ο RUNX2, έχουν βρεθεί ότι υπερ-εκφράζονται και στα υπερτροφικά χονδροκύτταρα του ΟΑ χόνδρου κατά τα τελευταία στάδια της νόσου. Επιπλέον, ο μεταγραφικός παράγοντας RUNX2 φέρει στον υποκινητή του σημεία πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων TCF/LEF, οι οποίοι σχηματίζουν σύμπλοκο με τη β-κατενίνη και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων, και αποτελεί γονίδιο-στόχο του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνη. Ο RUNX2 είναι γνωστό ότι διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων χαρακτηριστικών των οστεοβλαστών.<sup>111</sup> Επίσης, συμμετέχει στην ωρίμανση και στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, οδηγώντας τα κύτταρα προς τον υπερτροφικό φαινότυπο και διαταράσσοντας το μεταβολισμό τους, συμβάλλοντας πιθανόν με αυτόν τον τρόπο στην εμφάνιση και την εξέλιξη της ΟΑ.<sup>112</sup> Γι'αυτό, μελετήσαμε την επίδραση που ασκεί η οστεονεκτίνη στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *RUNX2*. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η εξωκυττάρια χορήγηση οστεονεκτίνης σε ΟΑ χονδροκύτταρα

μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση την έκφραση του RUNX2 σε επίπεδο μεταγραφής και πρωτεΐνης. Τα ευρήματά μας αυτά συμφωνούν με την πρόσφατη μελέτη του Nie και των συνεργατών του, οι οποίοι έδειξαν ότι η οστεονεκτίνη οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του RUNX2 σε πρόδρομα λιποκύτταρα προερχόμενα από ποντικό.<sup>103</sup>

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο RUNX2 ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων χαρακτηριστικών των οστεοβλαστών. Οπότε, στην συνέχεια της μελέτης μας αξιολογήσαμε τη δράση της οστεονεκτίνης στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της οστεοκαλσίνης, του πρώτου γονιδίου-στόχου του μεταγραφικού παράγοντα που ταυτοποιήθηκε.<sup>113</sup> Η οστεοκαλσίνη είναι μία πρωτεΐνη που εντοπίζεται κυρίως στην ECM του οστού, εκφράζεται από τους οστεοβλάστες και συμμετέχει στην εναπόθεση των ιόντων ασβεστίου στον ιστό. Ωστόσο, η οστεοκαλσίνη εκφράζεται και από τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα του OA χόνδρου. Άλλα δύο γονίδια-στόχους του μεταγραφικού παράγοντα RUNX2 αποτελούν τα πρωτεολυτικά ένζυμα MMP-9 και MMP-13, τα οποία διασπών τα μόρια της ECM του αρθρικού χόνδρου και κατέχουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της OA.<sup>114</sup> Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η οστεονεκτίνη οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της οστεοκαλσίνης και των MMPs, υποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη μπορεί να συμβάλει στον εκφυλισμό του χόνδρου και στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων του OA ιστού σε υπερτροφικά. Προκειμένου να τεκμηριώσουμε ότι η δράση της οστεονεκτίνης στα γονίδια αυτά επάγεται μέσω της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα RUNX2, επιμολύναμε OA χονδροκύτταρα με siRNA κατά του RUNX2 και παράλληλα χορηγήσαμε εξωκυττάρια οστεονεκτίνη και στη συνέχεια προσδιορίσαμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της οστεοκαλσίνης, της MMP-9 και της MMP-13 παρέμειναν χαμηλά μετά τη γονιδιακή αποσιώπηση του RUNX2 παρά τη χορήγηση της οστεονεκτίνης, υποδεικνύοντας ότι όντως η πρωτεΐνη ασκεί τη ρυθμιστική της δράση στα γονίδια αυτά μέσω του μεταγραφικού παράγοντα RUNX2.

Εν συνεχεία, αξιολογήσαμε και την επίδραση της οστεονεκτίνης στη μεταβολική συνιστώσα της OA. Η OA έχει συσχετισθεί από παλιά με την παχυσαρκία, κυρίως λόγω του αυξημένου μηχανικού φορτίου που δέχονται οι αρθρώσεις. Ωστόσο, πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι παρατηρείται αυξημένη εμφάνιση OA και σε αρθρώσεις παχύσαρκων ατόμων που δεν επιδέχονται μηχανικό φορτίο, όπως αυτές του χεριού, ενισχύοντας την άποψη για μεταβολικό χαρακτήρα της νόσου. Επιπλέον, άλλες πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι λιποκίνες, πρωτεΐνες που παράγονται

κυρίως από το λιπώδη ιστό, κατέχουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου και, επίσης, στα πρώιμα στάδια της νόσου πριν ακόμη την εμφάνιση ιστολογικών αλλοιώσεων έχει ανιχνευθεί ενδοκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων.<sup>115</sup> Έτσι, λαμβάνοντας και υπόψη το ρόλο της οστεονεκτίνης στο λιπώδη ιστό, αξιολογήσαμε τη δράση που ασκεί η πρωτεΐνη στη λιποκίνη λεπτίνη, στον υποδοχέα Ob-Rb μέσω του οποίου ασκεί τη δράση της και στους μεταγραφικούς παράγοντες SREBP-2 και SREBP-1c. Η λεπτίνη, είναι μία πλειοτροπική πρωτεΐνη, η οποία έχει βρεθεί ότι υπερ-εκφράζεται στον ΟΑ χόνδρο, όπως και ο υποδοχέας της, και μελέτη έδειξε ότι μπορεί να ασκήσει φλεγμονογόνο και καταβολική δράση, αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης της κυτταροκίνης IL-1β και των ενζύμων MMP-9 και MMP-13.<sup>104</sup> Οι μεταγραφικοί παράγοντες SREBP-2 και SREBP-1c συμμετέχουν στη ρύθμιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης, και των λιπαρών οξέων και των τριγλυκεριδίων, αντίστοιχα και έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα έκφρασής τους αυξάνονται στην ΟΑ.<sup>116-117</sup> Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η οστεονεκτίνη ασκεί αρνητική δράση στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν, για πρώτη φορά, ότι η κυτταροθεμελιακή πρωτεΐνη οστεονεκτίνη συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της ΟΑ, προωθώντας τον υπερτροφικό φαινότυπο του αρθρικού χόνδρου μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης και συνεισφέροντας στον περαιτέρω εκφυλισμό και επασβέστωση που υφίσταται ο ιστός στα τελευταία στάδια της νόσου. Ωστόσο, τα ευρήματά μας δείχνουν ότι η πρωτεΐνη ασκεί αντίθετη δράση όσον αφορά τη μεταβολική συνιστώσα της νόσου. Επιπρόσθετες μελέτες είναι απαραίτητες για την κατανόηση του ρόλου της πλειοτροπικής πρωτεΐνης οστεονεκτίνης στην παθοφυσιολογία και τη συνεισφορά της στην εξέλιξη της νόσου.

---

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Oliviero, F., Ramonda, R. & Punzi, L. New horizons in osteoarthritis. *Swiss Med Wkly* **140**, w13098 (2010).
2. Andrianakos, A.A. et al. Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study. *J Rheumatol* **33**, 2507-13 (2006).
3. Baker, J.F., Walsh, P. & Mulhall, K.J. Statins: a potential role in the management of osteoarthritis? *Joint Bone Spine* **78**, 31-4 (2011).
4. Felson, D.T. & Zhang, Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* **41**, 1343-55 (1998).
5. Goldring, M.B. & Goldring, S.R. Osteoarthritis. *J Cell Physiol* **213**, 626-34 (2007).
6. Wieland, H.A., Michaelis, M., Kirschbaum, B.J. & Rudolphi, K.A. Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nat Rev Drug Discov* **4**, 331-44 (2005).
7. Felson, D.T. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* **354**, 841-8 (2006).
8. Lawrence, R.C. et al. Estimates of the prevalence of selected arthritic and musculoskeletal diseases in the United States. *J Rheumatol* **16**, 427-41 (1989).
9. Sowers, M.R. & Karvonen-Gutierrez, C.A. The evolving role of obesity in knee osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* **22**, 533-7 (2010).
10. Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J.P. & Roughley, P.J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**, 351-84 (2008).
11. Nakamura, S. et al. Enhancement of SPARC (osteonectin) synthesis in arthritic cartilage. Increased levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and regulation by growth factors and cytokines in chondrocyte cultures. *Arthritis Rheum* **39**, 539-51 (1996).
12. Chandrasekhar, S., Harvey, A.K., Johnson, M.G. & Becker, G.W. Osteonectin/SPARC is a product of articular chondrocytes/cartilage and is regulated by cytokines and growth factors. *Biochim Biophys Acta* **1221**, 7-14 (1994).

13. Lane, T.F. & Sage, E.H. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* **8**, 163-73 (1994).
14. Bornstein, P. Matricellular proteins: an overview. *Matrix Biol* **19**, 555-6 (2000).
15. Yan, Q. & Sage, E.H. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* **47**, 1495-506 (1999).
16. Bornstein, P. Matricellular proteins: an overview. *J Cell Commun Signal* **3**, 163-5 (2009).
17. Damjanovski, S., Huynh, M.H., Motamed, K., Sage, E.H. & Ringuette, M. Regulation of SPARC expression during early *Xenopus* development: evolutionary divergence and conservation of DNA regulatory elements between amphibians and mammals. *Dev Genes Evol* **207**, 453-61 (1998).
18. Holland, P.W., Harper, S.J., McVey, J.H. & Hogan, B.L. In vivo expression of mRNA for the Ca<sup>++</sup>-binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization. *J Cell Biol* **105**, 473-82 (1987).
19. Nomura, S. et al. Evidence for positive and negative regulatory elements in the 5'-flanking sequence of the mouse *sparc* (osteonectin) gene. *J Biol Chem* **264**, 12201-7 (1989).
20. Sage, H., Vernon, R.B., Decker, J., Funk, S. & Iruela-Arispe, M.L. Distribution of the calcium-binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice. *J Histochem Cytochem* **37**, 819-29 (1989).
21. Schwarzbauer, J.E., Musset-Bilal, F. & Ryan, C.S. Extracellular calcium-binding protein SPARC/osteonectin in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Enzymol* **245**, 257-70 (1994).
22. Reed, M.J. & Sage, E.H. SPARC and the extracellular matrix: implications for cancer and wound repair. *Curr Top Microbiol Immunol* **213** ( Pt 1), 81-94 (1996).
23. Swaroop, A., Hogan, B.L. & Francke, U. Molecular analysis of the cDNA for human SPARC/osteonectin/BM-40: sequence, expression, and localization of the gene to chromosome 5q31-q33. *Genomics* **2**, 37-47 (1988).
24. Mason, I.J. et al. Developmental and transformation-sensitive expression of the *Sparc* gene on mouse chromosome 11. *EMBO J* **5**, 1831-7 (1986).

25. Villarreal, X.C., Mann, K.G. & Long, G.L. Structure of human osteonectin based upon analysis of cDNA and genomic sequences. *Biochemistry* **28**, 6483-91 (1989).
26. McVey, J.H., Nomura, S., Kelly, P., Mason, I.J. & Hogan, B.L. Characterization of the mouse SPARC/osteonectin gene. Intron/exon organization and an unusual promoter region. *J Biol Chem* **263**, 11111-6 (1988).
27. Hafner, M., Zimmermann, K., Pottgiesser, J., Krieg, T. & Nischt, R. A purine-rich sequence in the human BM-40 gene promoter region is a prerequisite for maximum transcription. *Matrix Biol* **14**, 733-41 (1995).
28. Mason, I.J., Taylor, A., Williams, J.G., Sage, H. & Hogan, B.L. Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell 'culture shock' glycoprotein of Mr 43,000. *EMBO J* **5**, 1465-72 (1986).
29. Ng, K.W., Manji, S.S., Young, M.F. & Findlay, D.M. Opposing influences of glucocorticoid and retinoic acid on transcriptional control in preosteoblasts. *Mol Endocrinol* **3**, 2079-85 (1989).
30. Brekken, R.A. & Sage, E.H. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol* **19**, 569-80 (2000).
31. Sato, N. et al. SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions. *Oncogene* **22**, 5021-30 (2003).
32. Socha, M.J. et al. Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer. *Neoplasia* **11**, 126-35 (2009).
33. Tai, I.T. & Tang, M.J. SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resist Updat* **11**, 231-46 (2008).
34. Delany, A.M. & Canalis, E. Basic fibroblast growth factor destabilizes osteonectin mRNA in osteoblasts. *Am J Physiol* **274**, C734-40 (1998).
35. Kapinas, K., Kessler, C.B. & Delany, A.M. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *J Cell Biochem* **108**, 216-24 (2009).
36. Kaufmann, B. et al. Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectin glycosylation: implications for collagen affinity. *Glycobiology* **14**, 609-19 (2004).



37. Bradshaw, A.D. The role of SPARC in extracellular matrix assembly. *J Cell Commun Signal* **3**, 239-46 (2009).
38. Aigner, T. & Stove, J. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 1569-93 (2003).
39. Eyre, D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* **4**, 30-5 (2002).
40. Sasaki, T., Hohenester, E., Gohring, W. & Timpl, R. Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *EMBO J* **17**, 1625-34 (1998).
41. Sasaki, T. et al. Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *J Biol Chem* **272**, 9237-43 (1997).
42. Bradshaw, A.D. et al. Pressure overload-induced alterations in fibrillar collagen content and myocardial diastolic function: role of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in post-synthetic procollagen processing. *Circulation* **119**, 269-80 (2009).
43. Bradshaw, A.D., Graves, D.C., Motamed, K. & Sage, E.H. SPARC-null mice exhibit increased adiposity without significant differences in overall body weight. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6045-50 (2003).
44. Bradshaw, A.D. et al. SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength. *J Invest Dermatol* **120**, 949-55 (2003).
45. Rentz, T.J., Poobalarahi, F., Bornstein, P., Sage, E.H. & Bradshaw, A.D. SPARC regulates processing of procollagen I and collagen fibrillogenesis in dermal fibroblasts. *J Biol Chem* **282**, 22062-71 (2007).
46. Giudici, C. et al. Mapping of SPARC/BM-40/osteonectin-binding sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem* **283**, 19551-60 (2008).
47. Clezardin, P. et al. Complex formation of human thrombospondin with osteonectin. *Eur J Biochem* **175**, 275-84 (1988).
48. Sangaletti, S. et al. Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer Res* **68**, 9050-9 (2008).

49. Yan, Q., Perdue, N., Blake, D. & Sage, E.H. Absence of SPARC in murine lens epithelium leads to increased deposition of laminin-1 in lens capsule. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 4652-60 (2005).
50. Lorenzo, P., Bayliss, M.T. & Heinegard, D. Altered patterns and synthesis of extracellular matrix macromolecules in early osteoarthritis. *Matrix Biol* **23**, 381-91 (2004).
51. Sofat, N. Analysing the role of endogenous matrix molecules in the development of osteoarthritis. *Int J Exp Pathol* **90**, 463-79 (2009).
52. Wei, H.Y., Liu, J.L., Lv, B.J., Xing, L. & Fu, S.Y. SPARC modulates expression of extracellular matrix genes in human trabecular meshwork cells. *Acta Ophthalmol* (2011).
53. Takaishi, H., Kimura, T., Dalal, S., Okada, Y. & D'Armiento, J. Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13. *Curr Pharm Biotechnol* **9**, 47-54 (2008).
54. Shankavaram, U.T., DeWitt, D.L., Funk, S.E., Sage, E.H. & Wahl, L.M. Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC. *J Cell Physiol* **173**, 327-34 (1997).
55. Tremble, P.M., Lane, T.F., Sage, E.H. & Werb, Z. SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol* **121**, 1433-44 (1993).
56. Gilles, C. et al. SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* **58**, 5529-36 (1998).
57. McClung, H.M. et al. SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells. *Neurosci Lett* **419**, 172-7 (2007).
58. Nischt, R. et al. BM-40 and MMP-2 expression are not coregulated in human melanoma cell lines. *Cancer Lett* **162**, 223-30 (2001).
59. Blaney Davidson, E.N., van der Kraan, P.M. & van den Berg, W.B. TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **15**, 597-604 (2007).
60. Finsson, K.W., Chi, Y., Bou-Gharios, G., Leask, A. & Philip, A. TGF-b signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Front Biosci (Schol Ed)* **4**, 251-68 (2012).

61. Mueller, M.B. & Tuan, R.S. Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. *PM R* **3**, S3-11 (2011).
62. Francki, A. et al. SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells. *J Biol Chem* **274**, 32145-52 (1999).
63. Francki, A. et al. SPARC regulates TGF-beta1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells. *J Cell Biochem* **91**, 915-25 (2004).
64. Schiemann, B.J., Neil, J.R. & Schiemann, W.P. SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor-beta-signaling system. *Mol Biol Cell* **14**, 3977-88 (2003).
65. Chlenski, A. et al. SPARC enhances tumor stroma formation and prevents fibroblast activation. *Oncogene* **26**, 4513-22 (2007).
66. Rivera, L.B. & Brekken, R.A. SPARC promotes pericyte recruitment via inhibition of endoglin-dependent TGF-beta1 activity. *J Cell Biol* **193**, 1305-19 (2011).
67. Robinson, C.J. & Gaines-Das, R. The international standard for basic fibroblast growth factor (FGF-2); comparison of candidate preparations by in vitro bioassays and immunoassays. *Growth Factors* **11**, 9-16 (1994).
68. Motamed, K. et al. Fibroblast growth factor receptor-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation and the promotion of skeletal myoblast differentiation by SPARC: a role for protein kinase A. *J Cell Biochem* **90**, 408-23 (2003).
69. Hasselaar, P. & Sage, E.H. SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells. *J Cell Biochem* **49**, 272-83 (1992).
70. Rivera, L.B., Bradshaw, A.D. & Brekken, R.A. The regulatory function of SPARC in vascular biology. *Cell Mol Life Sci* **68**, 3165-73 (2011).
71. Lingaraj, K., Poh, C.K. & Wang, W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during articular cartilage growth and re-expressed in osteoarthritis. *Ann Acad Med Singapore* **39**, 399-403 (2010).
72. Sullivan, L.A. et al. r84, a novel therapeutic antibody against mouse and human VEGF with potent anti-tumor activity and limited toxicity induction. *PLoS One* **5**, e12031 (2010).

73. Chandrasekaran, V., Ambati, J., Ambati, B.K. & Taylor, E.W. Molecular docking and analysis of interactions between vascular endothelial growth factor (VEGF) and SPARC protein. *J Mol Graph Model* **26**, 775-82 (2007).
74. Kupprion, C., Motamed, K. & Sage, E.H. SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* **273**, 29635-40 (1998).
75. Nozaki, M. et al. Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A. *J Clin Invest* **116**, 422-9 (2006).
76. Francki, A. et al. SPARC regulates cell cycle progression in mesangial cells via its inhibition of IGF-dependent signaling. *J Cell Biochem* **88**, 802-11 (2003).
77. Kieswetter, K., Schwartz, Z., Alderete, M., Dean, D.D. & Boyan, B.D. Platelet derived growth factor stimulates chondrocyte proliferation but prevents endochondral maturation. *Endocrine* **6**, 257-64 (1997).
78. Schafer, S.J., Luyten, F.P., Yanagishita, M. & Reddi, A.H. Proteoglycan metabolism is age related and modulated by isoforms of platelet-derived growth factor in bovine articular cartilage explant cultures. *Arch Biochem Biophys* **302**, 431-8 (1993).
79. Chlenski, A. & Cohn, S.L. Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 55-65 (2010).
80. Weaver, M.S., Workman, G. & Sage, E.H. The copper binding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin beta1 and activation of integrin-linked kinase. *J Biol Chem* **283**, 22826-37 (2008).
81. Hannigan, G., Troussard, A.A. & Dedhar, S. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer* **5**, 51-63 (2005).
82. Nie, J. et al. IFATS collection: Combinatorial peptides identify alpha5beta1 integrin as a receptor for the matricellular protein SPARC on adipose stromal cells. *Stem Cells* **26**, 2735-45 (2008).
83. De, S. et al. Molecular pathway for cancer metastasis to bone. *J Biol Chem* **278**, 39044-50 (2003).
84. Pavasant, P. & Yongchaitrakul, T. Secreted protein acidic, rich in cysteine induces pulp cell migration via alphavbeta3 integrin and extracellular signal-regulated kinase. *Oral Dis* **14**, 335-40 (2008).

85. Cybulsky, M.I. et al. Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7859-63 (1991).
86. Kriegsmann, J. et al. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 mRNA and protein in rheumatoid synovium demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Lab Invest* **72**, 209-14 (1995).
87. Kienzle, G. & von Kempis, J. Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106) on primary human articular chondrocytes: functional regulation of expression by cytokines and comparison with intercellular adhesion molecule 1 (CD54) and very late activation antigen 2. *Arthritis Rheum* **41**, 1296-305 (1998).
88. Oertli, B., Beck-Schimmer, B., Fan, X. & Wuthrich, R.P. Mechanisms of hyaluronan-induced up-regulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression by murine kidney tubular epithelial cells: hyaluronan triggers cell adhesion molecule expression through a mechanism involving activation of nuclear factor-kappa B and activating protein-1. *J Immunol* **161**, 3431-7 (1998).
89. Kelly, K.A. et al. SPARC is a VCAM-1 counter-ligand that mediates leukocyte transmigration. *J Leukoc Biol* **81**, 748-56 (2007).
90. Day, T.F., Guo, X., Garrett-Beal, L. & Yang, Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* **8**, 739-50 (2005).
91. Wu, Q. et al. Beta-catenin, cartilage, and osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci* **1192**, 344-50 (2010).
92. Nie, J. & Sage, E.H. SPARC functions as an inhibitor of adipogenesis. *J Cell Commun Signal* **3**, 247-54 (2009).
93. Nagaraju, G.P. & Sharma, D. Anti-cancer role of SPARC, an inhibitor of adipogenesis. *Cancer Treat Rev* **37**, 559-66 (2011).
94. Shi, Q. et al. Secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC), mediates cellular survival of gliomas through AKT activation. *J Biol Chem* **279**, 52200-9 (2004).
95. Bradshaw, A.D. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 480-8 (2012).
96. Termine, J.D., Belcourt, A.B., Conn, K.M. & Kleinman, H.K. Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone. *J Biol Chem* **256**, 10403-8 (1981).

97. Alford, A.I. & Hankenson, K.D. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone* **38**, 749-57 (2006).
98. Hopwood, B., Tsykin, A., Findlay, D.M. & Fazzalari, N.L. Gene expression profile of the bone microenvironment in human fragility fracture bone. *Bone* **44**, 87-101 (2009).
99. Delany, A.M. & Hankenson, K.D. Thrombospondin-2 and SPARC/osteonectin are critical regulators of bone remodeling. *J Cell Commun Signal* **3**, 227-38 (2009).
100. Delany, A.M. et al. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest* **105**, 1325 (2000).
101. Kos, K. et al. Regulation of the fibrosis and angiogenesis promoter SPARC/osteonectin in human adipose tissue by weight change, leptin, insulin, and glucose. *Diabetes* **58**, 1780-8 (2009).
102. Takahashi, M. et al. The expression of SPARC in adipose tissue and its increased plasma concentration in patients with coronary artery disease. *Obes Res* **9**, 388-93 (2001).
103. Nie, J. & Sage, E.H. SPARC inhibits adipogenesis by its enhancement of beta-catenin signaling. *J Biol Chem* **284**, 1279-90 (2009).
104. Simopoulou, T. et al. Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthritis Cartilage* **15**, 872-83 (2007).
105. Kellgren, J.H., Lawrence, J.S. & Bier, F. Genetic Factors in Generalized Osteo-Arthrosis. *Ann Rheum Dis* **22**, 237-55 (1963).
106. Brighton, C.T. & Hunt, R.M. Histochemical localization of calcium in the fracture callus with potassium pyroantimonate. Possible role of chondrocyte mitochondrial calcium in callus calcification. *J Bone Joint Surg Am* **68**, 703-15 (1986).
107. Brighton, C.T., Sugioka, Y. & Hunt, R.M. Cytoplasmic structures of epiphyseal plate chondrocytes. Quantitative evaluation using electron micrographs of rat costochondral junctions with special reference to the fate of hypertrophic cells. *J Bone Joint Surg Am* **55**, 771-84 (1973).

108. Cancedda, R., Descalzi Cancedda, F. & Castagnola, P. Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* **159**, 265-358 (1995).
109. Drissi, H., Zuscik, M., Rosier, R. & O'Keefe, R. Transcriptional regulation of chondrocyte maturation: potential involvement of transcription factors in OA pathogenesis. *Mol Aspects Med* **26**, 169-79 (2005).
110. Hill, T.P., Spater, D., Taketo, M.M., Birchmeier, W. & Hartmann, C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* **8**, 727-38 (2005).
111. Lian, J.B. & Stein, G.S. Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. *Curr Pharm Des* **9**, 2677-85 (2003).
112. Solomon, L.A., Berube, N.G. & Beier, F. Transcriptional regulators of chondrocyte hypertrophy. *Birth Defects Res C Embryo Today* **84**, 123-30 (2008).
113. Enomoto, H. et al. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* **275**, 8695-702 (2000).
114. Clark, I.M., Swingler, T.E., Sampieri, C.L. & Edwards, D.R. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1362-78 (2008).
115. Gkretsi, V., Simopoulou, T. & Tsezou, A. Lipid metabolism and osteoarthritis: lessons from atherosclerosis. *Prog Lipid Res* **50**, 133-40 (2011).
116. Horton, J.D., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* **109**, 1125-31 (2002).
117. Kostopoulou, F. et al. Central Role of SREBP-2 in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *PLoS One* **7**, e35753 (2012).