



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



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Ο ρόλος του miR-150 στον οστεοαρθρικό φαινότυπο των  
χονδροκυττάρων»**

**ΔΕΣΤΟΥΝΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΙΩΑΝΝΑ ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ (Επιβλέπουσα):** Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας, Παν/μιου  
Θεσσαλίας

**ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ (Μέλος):** Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Παν/μιου Θεσσαλίας

**ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (Μέλος):** Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Παν/μιου Θεσσαλίας

**ΛΑΡΙΣΑ, 2021**



**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
FACULTY OF MEDICINE**



**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM**

**“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”**

**MASTER’S THESIS**

**« The role of miR-150 in osteoarthritic phenotype of chondrocytes »**

**Destounis Dimitrios**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά τη διάρκεια του Ακαδημαϊκού έτους 2020-2021.

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα την κ. Ιωάννα Παπαθανασίου, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και την πολύτιμη καθοδήγηση και γνώσεις που παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Ασπασία Τσέζου, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής και υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος για την πολύτιμη υποστήριξη που παρείχε καθ' όλη την διάρκεια του προγράμματος σπουδών καθώς και την κ. Τραχανά Βαρβάρα, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, για την συμμετοχή της ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου και συγκεκριμένα την Ασπασία Δεστούνη (Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια), Εύη Μουρμούρα (Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια), Αλίκη Παπαγεωργίου (Υποψήφια Διδάκτορας), Μαρίνα Βαϊοπούλου και Γωγώ Σουμπουρδή για το γεγονός ότι ήταν πάντα πρόθυμες να βοηθήσουν και για το φιλικό περιβάλλον που επικρατούσε στο εργαστήριο.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εκφυλιστική αρθρίτιδα ή οστεοαρθρίτιδα (OA) αποτελεί μία προοδευτικά εξελισσόμενη πάθηση των αρθρώσεων, με κύριο χαρακτηριστικό μιας OA άρθρωσης να είναι η καταστροφή του αρθρικού χόνδρου, λόγω διαταραχής της ισορροπίας των διαδικασιών αναδόμησης και αποδόμησης του. Πληθώρα μελετών έχει δείξει πως η απορρύθμιση της δράσης σηματοδοτικών μονοπατιών όπως το μονοπάτι της Wnt/β-κατενίνης καθώς και επιγενετικών μηχανισμών όπως των microRNAs και lncRNAs συμμετέχουν στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης του lncRNA NEAT-1 με το miR-150-5p και η διερεύνηση του ρόλου του miR-150-5p μέσω της επιγενετικής ρύθμισης της έκφρασης της β-κατενίνης στην καταβολική δράση των OA χονδροκυττάρων. Η ανάλυση της μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκε μέσω των διαδικασιών qRT-PCR και Western Blotting, αντίστοιχα. Η διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υπό μελέτη γονιδίων έγινε μετά από χορήγηση κατάλληλων μορίων/ουσιών (siRNA- NEAT1, mimic miR-150-5p, LiCl) σε OA ή φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Η βιοπληροφορική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων προσδιορισμού αλληλεπιδράσεων lncRNAs-microRNAs, microRNAs-γονιδίων στόχων και ανάλυσης γονιδιακής οντολογίας/σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι το NEAT-1 στα OA χονδροκύτταρα παρουσιάζει αυξημένη έκφραση, προκαλώντας αντίστοιχη μείωση των επιπέδων έκφρασης του miR-150-5p. Η μειωμένη έκφραση του miR-150-5p οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου του, β-κατενίνη, με επακόλουθο την ενίσχυση της ενεργότητας του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνη και την αύξηση της έκφρασης των καταβολικών ενζύμων, MMP-9, MMP-13, MMP-14 και ADAMTS-5, στα OA χονδροκύτταρα. Συμπερασματικά, στην παρούσα διπλωματική εργασία αναδείχτηκε η κατασταλτική δράση του NEAT-1 στη ρύθμιση της έκφρασης του miR-150-5p στα OA χονδροκύτταρα. Η μειωμένη έκφραση του miR-150-5p συμβάλει στην ενίσχυση της καταβολικής δράσης των OA χονδροκυττάρων μέσω της ρύθμισης της έκφρασης της β-κατενίνης.

**Λέξεις- Κλειδιά: Οστεοαρθρίτιδα, NEAT-1, miR-150-5p, β-κατενίνη, MMPs**

## **ABSTRACT**

Osteoarthritis (OA) is the most common degenerative joint disease and characterized by progressive loss and destruction of articular cartilage. Numerous studies have shown that deregulation of signaling pathways such as the Wnt / $\beta$ -catenin pathway as well as epigenetic mechanisms including microRNAs and lncRNAs are involved in the onset and progression of the disease. The aim of this study was to investigate the possible interaction of lncRNA NEAT-1 with miR-150-5p as well as the role of miR-150-5p through regulation of  $\beta$ -catenin expression, in catabolic activity of OA chondrocytes. qRT-PCR and Western Blotting were used to analyze the transcriptional and protein expression of genes. Investigation of possible interactions between the genes of interest was assessed after treatment of OA or normal with siRNA-NEAT1, mimic miR-150-5p and LiCl. Bioinformatics analysis was performed to determine the interactions of lncRNAs-microRNAs, microRNAs-target genes as well as the analysis of genetic ontology (GO)/signaling pathways. We showed that NEAT-1 expression increased in OA chondrocytes resulting in a decrease in the expression levels of miR-150-5p. Decreased expression of miR-150-5p led to an increase in the expression of its target gene,  $\beta$ -catenin, thereby enhancing the activity of the Wnt /  $\beta$ -catenin pathway and increasing the expression of the catabolic enzymes, MMP-9, MMP-13, MMP-14 and ADAMTS-5 in OA chondrocytes. In conclusion, in the present study, we highlighted the suppressive effect of NEAT-1 in miR-150-5p expression in OA chondrocytes. Abnormal expression of miR-150-5p enhanced the catabolic activity of OA chondrocytes through epigenetic regulation of  $\beta$ -catenin expression.

**Key words: Osteoarthritis, NEAT-1, miR-150-5p,  $\beta$ -catenin, MMPs**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |    |
|---|----|
| Ευχαριστίες.....  | 3  |
| Περίληψη.....   | 4  |
| A. Εισαγωγή.....  | 9  |
| A.1. Ρόλος και δομή αρθρικού χόνδρου.....                                     | 9  |
| A.2. Εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων-Οστεοαρθρίτιδα.....                      | 11 |
| A.2.1. Θεραπεία και διάγνωση της νόσου.....                                   | 12 |
| A.2.2. Μηχανισμοί αιτιοπαθογένειας της ΟΑ.....                                | 13 |
| A.3. Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη.....                                | 16 |
| A.3.1. Κύρια μόρια του μονοπατιού σηματοδότησης Wnt/ β-κατενίνη.....          | 16 |
| A.3.3. Ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ β-κατενίνης στην ΟΑ.....       | 18 |
| A.4 Επιγενετική και οστεοαρθρίτιδα.....                                       | 20 |
| A.4.1 microRNAs.....  | 22 |
| A.4.1.1. Μηχανισμός βιογένεσης microRNAs.....                                 | 22 |
| A.4.1.2. microRNAs και οστεοαρθρίτιδα.....                                    | 24 |
| A.4.1.2 miR-150-5p και οστεοαρθρίτιδα.....                                    | 24 |
| A.4.2. lncRNAs (long non coding RNAs).....                                    | 25 |
| A.4.2.1 lncRNAs και οστεοαρθρίτιδα.....                                       | 26 |
| A.4.2.2 NEAT1 και οστεοαρθρίτιδα.....   | 27 |
| A.5. Στόχος εργασίας.....   | 29 |
| B. Υλικά και Μέθοδοι.....   | 31 |
| B.1. Δείγματα αρθρικού χόνδρου.....   | 31 |
| B.2. Καλλιέργεια χονδροκυττάρων.....  | 31 |
| B.3. Επιμόλυνση χονδροκυττάρων με mimic miR-150-5p, siRNA-NEAT1 και LiCl..... | 32 |

|  |    |
|--|----|
| B.3.1. Επιμόλυνση OA χονδροκυττάρων με mimic miR-150-5p ή siRNA-NEAT1.....   | 32 |
| B.3.2. Χορήγηση LiCl σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα και επακόλουθη επιμόλυνση με mimic miR-150-5p.....   | 32 |
| B.4. Απομόνωση RNA από χονδροκύτταρα κυτταροκαλλιέργειας.....  | 33 |
| B.5. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).....   | 34 |
| B.6. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR).....  | 36 |
| B.7. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blotting).....  | 38 |
| B.7.1. Απομόνωση κυτταρικού εκχυλίσματος από χονδροκύτταρα.....  | 38 |
| B.7.2. Φωτομέτρηση πρωτεϊνών.....  | 38 |
| B.7.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου –SDS.....   | 39 |
| B.7.4. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF.....  | 39 |
| B.7.5. Ανίχνευση σήματος με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια.....  | 40 |
| B.8. Ανεύρεση γονιδίων-στόχων του miR-150-5p, ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (GO enrichment analysis) και σηματοδοτικών μονοπατιών (KEGG analyze) αυτών με προγράμματα βιοπληροφορικής..... | 40 |
| B.9. Στατιστική ανάλυση.....   | 40 |
| Γ. Αποτελέσματα.....   | 41 |
| Γ.1. Έκφραση NEAT-1 και miR-150-5p σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα.....  | 41 |
| Γ.2. Αλληλεπίδραση του NEAT-1 με το miR-150-5p στα χονδροκύτταρα.....  | 42 |
| Γ.3. Προσδιορισμός γονιδίων-στόχων του miR-150-5p με εργαλεία βιοπληροφορικής.....   | 43 |
| Γ.4. Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας [GO enrichment analysis] και σηματοδοτικών μονοπατιών των γονιδίων-στόχων του miR-150-5p.....   | 44 |
| Γ.5. Έκφραση της β-κατενίνης σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα.....  | 46 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Γ.6. Ρύθμιση της έκφρασης της β-κατενίνης από το miR-150-5p στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα.....</b>                             | <b>47</b> |
| <b>Γ.7. Το miR-150-5p συμμετέχει στην καταβολική δράση των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων μέσω της ρύθμισης της β-κατενίνης.....</b> | <b>49</b> |
| <b>Δ. Συζήτηση.....</b>  | <b>50</b> |
| <b>Ε. Βιβλιογραφία.....</b>  | <b>55</b> |

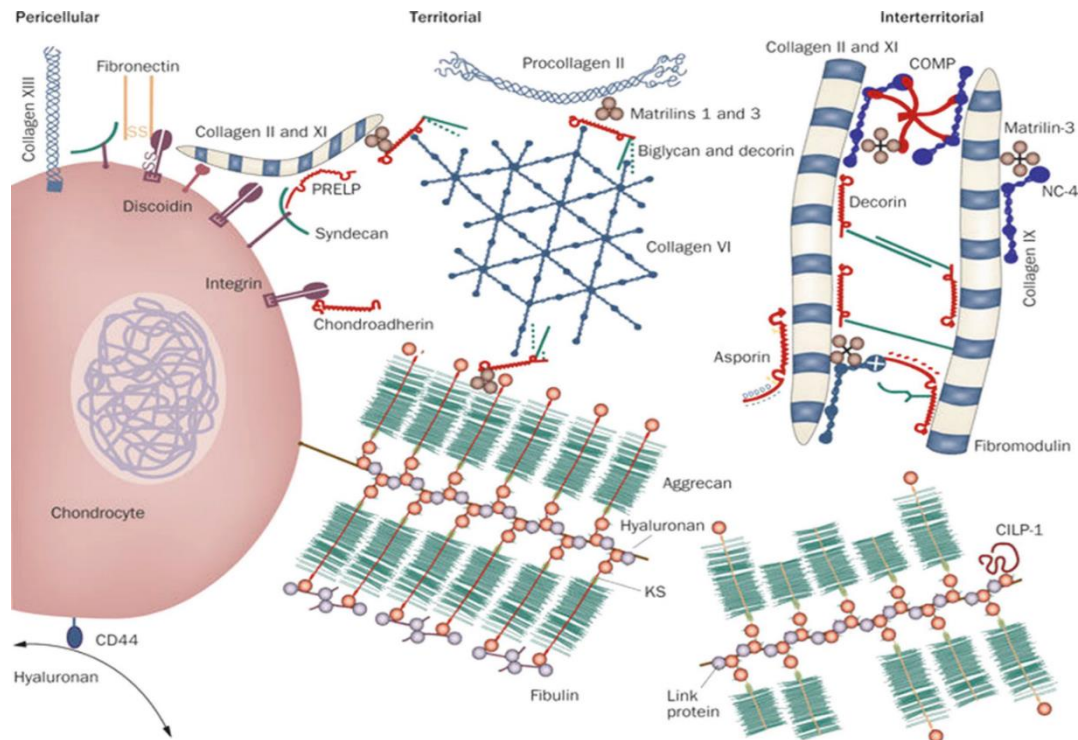


## A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### A.1. Ρόλος και δομή αρθρικού χόνδρου

Ο αρθρικός χόνδρος είναι ένας εξαιρετικά εξειδικευμένος ιστός που βρίσκεται στην επιφάνεια των αρθρώσεων (Hwang 2015). Δεν φέρει αιμοφόρα αγγεία και νεύρα και πρόκειται κυρίως για έναν χόνδρο υαλίνης πάχους 2-4mm (Rim 2020). Η κύρια λειτουργία του είναι η ευθυγράμμιση της επιφάνειας του οστού, παρέχοντας μια λεία επιφάνεια για τον περιορισμό της τριβής των αρθρώσεων, απορροφώντας και διανέμοντας εξωτερικά φορτία. (Rim 2020, Charlier 2016). Η ικανότητα του αρθρικού χόνδρου για εγγενή επούλωση και επιδιόρθωση είναι περιορισμένη, επομένως η διατήρηση ενός υγιούς και φυσιολογικού χόνδρου είναι υψίστης σημασίας για τη φυσιολογική λειτουργία των αρθρώσεων (Fox 2009).

Ο χόνδρος αποτελείται από μια πυκνή εξωκυτταρική μήτρα (ECM) με πολύ αραιή κατανομή κυττάρων που ονομάζονται χονδροκύτταρα (Κονάcs 2019, Fox 2009). Η ECM αποτελείται κυρίως από 65-80% από νερό και ανόργανα άλατα και από 20-35% οργανικά μακρομόρια όπως κολλαγόνο (κυρίως κολλαγόνο τύπου II ενώ τα κολλαγόνα τύπου I, IV, V, VI, IX, και XI συναντώνται σε μικρές ποσότητες) πρωτεογλυκάνες (κυρίως αγγρεκάνη αλλά και ντεκορίνη, διγλυκάνη και ινωδομοντουλίνη), καθώς και άλλες μη κολλαγόνες πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες (Κονάcs 2019, Fox 2009). Μαζί, αυτά τα συστατικά βοηθούν στη διατήρηση του νερού εντός της ECM, κάτι που είναι κρίσιμο για τη διατήρηση των μοναδικών μηχανικών ιδιοτήτων του (Κονάcs 2019, Fox 2009). Οι ίνες κολλαγόνου σχηματίζουν ένα τρισδιάστατο δίκτυο που προσδίδουν σχήμα στον ιστό και του παρέχουν αντοχή σε εφελκυσμό και ακαμψία (Κονάcs 2019, Howard 2020). Η αγγρεκάνη προσελκύει κατιόντα και νερό για να διατηρήσει τη μορφή του ιστού και να αντισταθεί στις συμπιεστικές δυνάμεις. Είναι εύκαμπτος και ανθεκτικός, επιτρέποντάς του να απορροφά και να διαλύει φορτία διατηρώντας παράλληλα έναν πολύ χαμηλό συντελεστή τριβής κατά την κίνηση (Howard 2020).

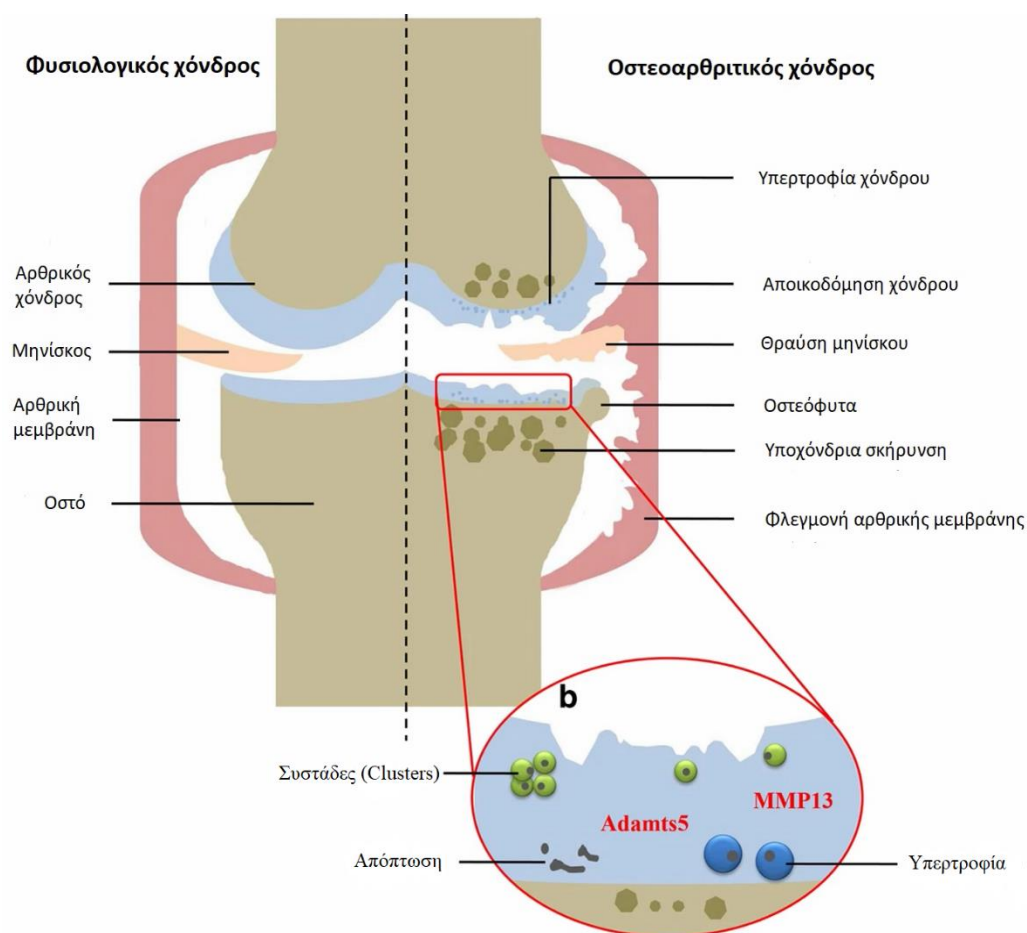


**Εικόνα 1:** Μοριακή οργάνωση φυσιολογικού χόνδρου. Η ECM γύρω από τα χονδροκύτταρα σε φυσιολογικό αρθρικό χόνδρο οργανώνεται σε τρεις ζώνες και κάθε ζώνη αποτελείται από διαφορετικού τύπου κολλαγόνα και πρωτεΐνες που υποστηρίζουν την ακεραιότητα του αρθρικού χόνδρου (Heinegård 2010).

Τα χονδροκύτταρα αποτελούν τον μοναδικό τύπο κυττάρου του αρθρικού χόνδρου και είναι κύτταρα εξαιρετικά εξειδικευμένα, μεταβολικά ενεργά, υπεύθυνα για τη σύνθεση, συντήρηση και επιδιόρθωση της ECM, παρέχοντας έτσι στον χόνδρο τις λειτουργίες μηχανικής υποστήριξης και λίπανσης των αρθρώσεων (Charlier 2016, Fox 2009). Προέρχονται από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα μέσω της διαδικασίας της χονδρογένεσης και ποικίλλουν σε σχήμα, αριθμό και μέγεθος, ανάλογα με τις ανατομικές περιοχές του αρθρικού χόνδρου (Fox 2009). Η πυκνότητά τους είναι υψηλότερη στο βαθύ στρώμα χόνδρου και μειώνεται σταδιακά προς την επιφανειακή ζώνη (Κονάcs 2019). Μεμονωμένα, τα χονδροκύτταρα έχουν υψηλό μεταβολικό ρυθμό, αλλά συνολικά λόγω του περιορισμένου κυτταρικού τους πληθυσμού δεν επιτρέπουν γρήγορες αλλαγές στον αρθρικό χόνδρο (Κονάcs 2019). Τα χονδροκύτταρα προσαρμόζουν το μεταβολισμό τους στις φυσικοχημικές αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος ως μηχανικοί και ωσμωτικοί αισθητήρες (Κονάcs 2019). Επιπλέον έχουν περιορισμένο δυναμικό αναπαραγωγής, επομένως η εγγενής ικανότητα επούλωσης του χόνδρου ως απόκριση στον τραυματισμό είναι περιορισμένη (Fox 2009).

## Α.2. Εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων-Οστεοαρθρίτιδα

Η οστεοαρθρίτιδα(OA), η πιο κοινή εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων, είναι μία χρόνια πάθηση με εξαιρετική ετερογένεια που επηρεάζει όλες τις δομές της άρθρωσης με κύριο χαρακτηριστικό στον σταδιακό εκφυλισμό του χόνδρου (Rim 2020, Κονάς 2019, Guilak 2018). Επίσης μια OA άρθρωση χαρακτηρίζεται από φλεγμονή του υμένα, αναδιαμόρφωση του υποχόνδριου οστού, δομικές αλλαγές στους συνδέσμους και τον μηνίσκο και από σχηματισμό οστεοφύτων (Εικόνα 2) (Rim 2020, Κονάς 2019, Guilak 2018). Ως συνέπεια της καταστροφής και αναδιαμόρφωσης των δομών της άρθρωσης προκαλείται πόνος, απώλεια λειτουργικότητας και κινητικότητας των αρθρώσεων, που οδηγούν σε αναπηρία και γενικότερα μείωση της ποιότητας ζωής των ασθενών (Rim 2020, Guilak 2018, Charlier 2016).



**Εικόνα 2:** Αλλαγές που παρατηρούνται στις δομές μιας OA άρθρωσης συγκριτικά με μια φυσιολογική (Zhang 2016).

Εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από ΟΑ και αναμένεται μεγάλη αύξηση των πασχόντων εξαιτίας της γήρανσης του πληθυσμού, της αύξησης των ποσοστών παχυσαρκίας και των υψηλών ποσοστών τραυματισμών των αρθρώσεων, κυρίως του γονάτου (HE 2020, Berenbaum 2020). Η ΟΑ που εμφανίζεται σε νεαρούς ενήλικες προκαλείται συχνότερα από προηγούμενο τραυματισμό της άρθρωσης, μια διαδικασία γνωστή ως μετατραυματική ΟΑ, ενώ σε ηλικιωμένα άτομα ένας αριθμός παραγόντων που σχετίζονται με τη γήρανση μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη της νόσου με αποτέλεσμα να ανήκει στις ηλικιο-εξαρτώμενες παθήσεις (Loeser 2016). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει συγκεκριμένη θεραπεία εκτός από την χειρουργική επέμβαση ενώ οι μοριακοί μηχανισμοί και τα ακριβή αίτια της νόσου δεν είναι πλήρως γνωστά ( P.K. Sacitharan 2019, Guilak 2018, Charlier 2016). Μηχανικοί παράγοντες όπως ο τραυματισμός των αρθρώσεων και η παχυσαρκία θεωρούνται πρωταρχικοί παράγοντες της νόσου, αλλά και παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο και η γενετική προδιάθεση συμβάλλουν στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου (P.K. Sacitharan 2019, Guilak 2018, Charlier 2016). Αποτελεί λοιπόν μία ασθένεια με δυσμενείς επιπτώσεις στο κοινωνικό σύνολο και στην οικονομία με αξιοσημείωτες επιπτώσεις για τα άτομα που πλήττονται και τα συστήματα υγείας (Neogi 2013).

### **A.2.1. Θεραπεία και διάγνωση της νόσου**

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν διαθέσιμα φάρμακα για την αναστροφή της εξέλιξης της νόσου και οι θεραπείες που επιλέγονται, περιορίζονται στην ανακούφιση των συμπτωμάτων με την χρήση αναλγητικών και μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων με τη χειρουργική αφαίρεση των προσβεβλημένων αρθρώσεων σε προχωρημένα στάδια της νόσου να αποτελεί την έσχατη λύση (Zhang 2018, Troeberg 2012). Οι ενδοαρθρικές ενέσεις γλυκοκορτικοειδών χρησιμοποιούνται συνήθως ως κύρια θεραπεία για την οστεοαρθρίτιδα του γόνατος, αλλά υπάρχουν συγκρουόμενες αναφορές σχετικά με την έκταση και τη διάρκεια της ανακούφισης των συμπτωμάτων με αυτήν τη θεραπεία (Deyle 2020). Επιπλέον η φυσιοθεραπεία για την οστεοαρθρίτιδα του γόνατος είχε ως αποτέλεσμα καλύτερες απόλυτες βαθμολογίες σε κλίμακες πόνου και φυσικής λειτουργίας από την ένεση γλυκοκορτικοειδών (Deyle 2020). Τα τελευταία χρόνια, τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα και οι στρατηγικές της αναγεννητικής ιατρικής θεωρούνται πολλά υποσχόμενες θεραπείες για την

αποκατάσταση της βλάβης του χόνδρου στην OA (Wang 2019). Παρόλα αυτά τα κλινικά δεδομένα σχετικά με τις μακροπρόθεσμες συνέπειες είναι περιορισμένα και επομένως υπάρχει ακόμα ασάφεια σχετικά με τις πιθανές επιπτώσεις που μπορεί να προκύψουν μεταγενέστερα (Wang 2019).

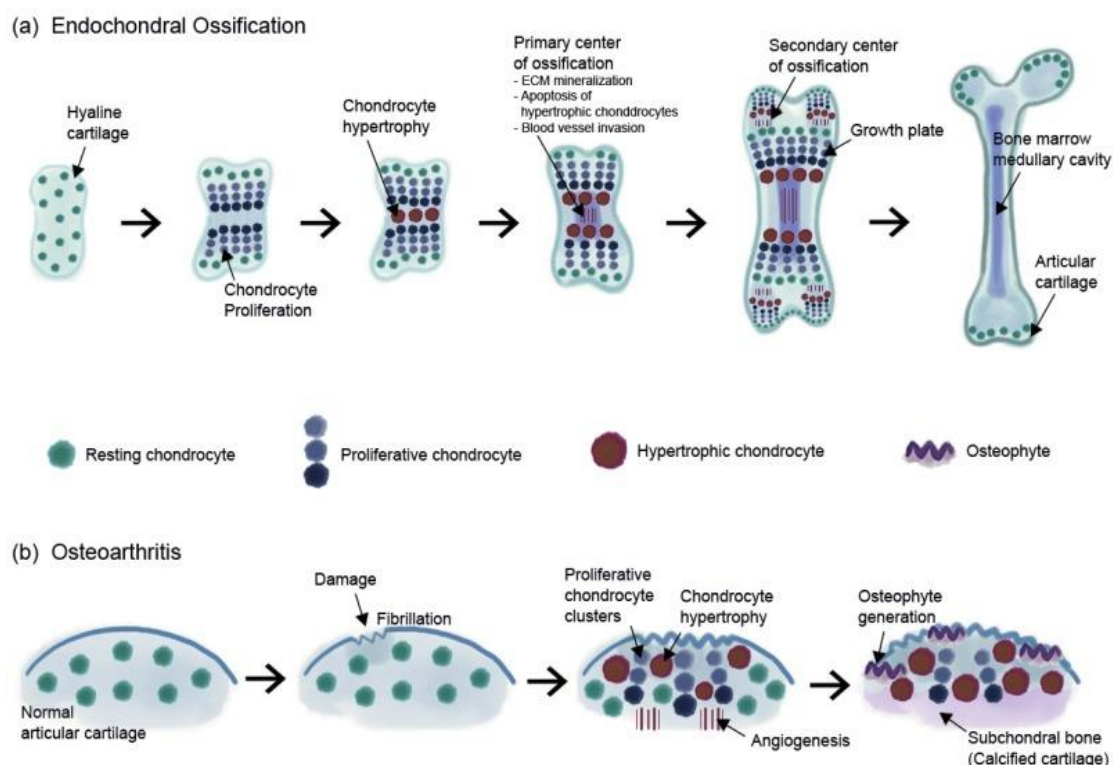
Μέχρι σήμερα η ιατρική εξέταση και οι ακτινολογικές εξετάσεις μπορούν να βοηθήσουν στη διάγνωση της νόσου, με αποτέλεσμα τις περισσότερες φορές να υπάρχει καθυστέρηση στην αντιμετώπιση της νόσου (Munjal 2019). Οι βιοδείκτες είναι μετρήσιμες ουσίες και η παρουσία τους μπορεί να υποδηλώνει ένα συγκεκριμένο φαινόμενο ή ασθένεια (Munjal 2019). Οι βιοδείκτες μπορούν να βρεθούν σε βιολογικά υγρά του σώματος, συμπεριλαμβανομένων των ούρων, του ορού, των περιττωμάτων, της λέμφου και του αρθρικού υγρού (Munjal 2019). Οι βιοδείκτες μπορούν να ανιχνεύουν την αποδόμηση των αρθρικού χόνδρου σε πρώιμο στάδιο στην OA (Mobasheri 2017). Τα κύρια βιολογικά υγρά που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό βιοδεικτών στην παθοφυσιολογία της OA είναι τα ούρα, το αρθρικό υγρό και το αίμα (Munjal 2019). Επιπλέον μπορούν να παρέχουν χρήσιμες διαγνωστικές και προγνωστικές πληροφορίες αντανακλώντας τη σχετική με τη νόσο βιολογική δραστηριότητα της άρθρωσης και να προβλέπουν την πορεία της εξέλιξης της νόσου (Mobasheri 2017). Τα μικρά μη κωδικά μόρια RNAs(microRNAs) θεωρούνται πιθανοί βιοδείκτες για την OA (Li 2016).

### **A.2.2. Μηχανισμοί αιτιοπαθογένειας της OA**

Αρκετές κυτταρικές και μοριακές διεργασίες εμπλέκονται στις παθολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στην OA όπως αύξηση των καταβολικών διεργασιών στον αρθρικό χόνδρο με ταυτόχρονη μείωση των αναβολικών διεργασιών και της επιδιόρθωσης του, υπερτροφία, απόπτωση και γήρανση των χονδροκυττάρων, φλεγμονή εντός της OA άρθρωσης καθώς και βλάβη ή μη φυσιολογική λειτουργία της αυτοφαγίας (Scanzello 2017, Robinson 2016, Loeser 2016). Παρόλα αυτά, δεν είναι ακόμα επαρκώς γνωστό το πως αυτές οι διαδικασίες συνδυάζονται και οδηγούν στην παθογένεια της νόσου (Robinson 2016).

Η υπερτροφία των χονδροκυττάρων και ο κυτταρικός θάνατος είναι φυσικά φαινόμενα που συμβαίνουν συνήθως κατά τη διάρκεια μιας αναπτυξιακής διαδικασίας που ονομάζεται ενδοχόνδρια οστεοποίηση (EO) (Rim 2020). Η υπερτροφία είναι το

τελικό στάδιο διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων της αυξητικής πλάκας και προκαλεί δραστικές φαινοτυπικές αλλαγές στα κύτταρα του χόνδρου (Singh 2019). Ο υάλινος χόνδρος μπορεί να χωριστεί στον μόνιμο χόνδρο, όπου τα χονδροκύτταρα υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται σε ηρεμία και δεν υπόκεινται σε τελική διαφοροποίηση και σε προσωρινό χόνδρο, όπου τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε υπερτροφικά, αποπίπτουν δίνοντας χώρο για να την ανάπτυξη οστού (Rim 2020). Οι αλλαγές που παρατηρούνται κατά την υπερτροφική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σχετίζονται από την υψηλή έκφραση του κολλαγόνου τύπου X (COL10A1), του παράγοντα μεταγραφής RUNX2, και των αποικοδομητικών ενζύμων ADAMTS-5, MMP-9 και MMP-13 ενώ παρατηρείται μείωση της έκφρασης της αγγρεκάνης, του κολλαγόνου τύπου II και του SOX9 (Yeri 2020, Singh 2019). Η μη φυσιολογική αλλαγή των χονδροκυττάρων προς ένα υπερτροφικό φαινότυπο που παρατηρείται στην ΟΑ καταλήγει σε μη αναστρέψιμη καταστροφή του χόνδρου (Singh 2019).



**Εικόνα 3:** Α) Σχηματική απεικόνιση των γεγονότων κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση Β) Σχηματική απεικόνιση της εξέλιξης της οστεοαρθρίτιδας στον αρθρικό χόνδρο μέσω της αλλαγής του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά. (Rim 2020).

Η φλεγμονή παίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της ΟΑ προωθώντας τις καταβολικές αντιδράσεις των χονδροκυττάρων και συμβάλλοντας στον πόνο στις αρθρώσεις (Scanzello 2017). Η φλεγμονή που παρατηρείται στην ΟΑ είναι γενικά χρόνια και χαμηλού βαθμού και μπορεί να προκληθεί τοπικά εντός της άρθρωσης από βλάβες ιστών και αντιδράσεις στρες ωστόσο και η συστηματική φλεγμονή που σχετίζεται με την παχυσαρκία μπορεί να ενισχύσει αυτές τις τοπικές αντιδράσεις και να έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου (Scanzello 2017, Robinson 2016). Η φλεγμονή του αρθρικού ιστού οδηγεί στην απελευθέρωση του φλεγμονωδών και προ-αποικοδομητικών διαμεσολαβητών όπως κυτταροκίνες και MMPs (Berenbaum 2020). Αυτοί οι παράγοντες οδηγούν σε περαιτέρω υποβάθμιση του χόνδρου, συμβάλλοντας στην επιδείνωση των συμπτωμάτων της νόσου (Berenbaum 2020).

Η γήρανση έχει συσχετιστεί με χρόνια φλεγμονή χαμηλού βαθμού, η οποία θα μπορούσε να προάγει την ΟΑ, αν και μέχρι σήμερα τα στοιχεία σχετικά με τους ακριβείς μηχανισμούς της είναι ανεπαρκή (Loeser 2016). Η γήρανση και η ΟΑ είναι ανεξάρτητες ωστόσο συνδέονται στενά μέσω των αλληλένδετων ρόλων της φλεγμονής και της κυτταρικής γήρανσης, με την φλεγμονή και την παραγωγή ROS να οδηγούν σε οξειδωτικό στρες και τελικά σε γήρανση των χονδροκυττάρων (Berenbaum 2020). Επιπλέον παράγοντες που σχετίζονται με την ηλικία και συμβάλλουν στην ανάπτυξη της ΟΑ περιλαμβάνονται και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, το οξειδωτικό στρες και η μειωμένη αυτοφαγία στα χονδροκύτταρα, προάγοντας τις καταβολικές διεργασίες και τον κυτταρικό θάνατο έναντι των αναβολικών διεργασιών (Loeser 2016).

Η βελτίωση της κατανόησης της αιτιολογίας και της παθογένειας της ΟΑ είναι καθοριστικής σημασίας για τον εντοπισμό πιθανών θεραπευτικών στόχων για την πρόληψη της ανάπτυξης και της εξέλιξης της νόσου (He 2020). Για τον σκοπό αυτό, η παρέμβαση σε ένα μόνο γνωστό ρυθμιστικό μονοπάτι είναι ανεπαρκής και για τον λόγο αυτό πρέπει να ληφθούν υπόψη οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολλαπλών ρυθμιστικών μοριακών μονοπατιών που μπορούν ταυτόχρονα να συμμετέχουν στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου (He 2020). Μια πιθανή στρατηγική είναι η χρήση ή ανάπτυξη μορίων που επηρεάζουν ταυτόχρονα διάφορες βασικές οδούς ή διεργασίες όπως τα microRNAs το καθένα από τα οποία μπορεί να στοχεύσει σε εκατοντάδες στόχους (He 2020, Mohr 2015). Για παράδειγμα, διαδικασίες όπως η χονδρογένεση και η διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων προς την υπερτροφία, μαζί με τις συνακόλουθες αλλαγές της ECM μέσω της δραστηριότητας των MMPs, ρυθμίζονται στενά από τις

συντονισμένες δράσεις μεταγραφικών παραγόντων όπως το RUNX2 και το SOX9, που με τη σειρά τους ρυθμίζουν ή ρυθμίζονται από πλήθος μονοπατιών σηματοδότησης όπως των FGFs, BMPs, WNTs και NF-κB (Singh 2019). Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη έχει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της ΟΑ καθώς η αλληλεπίδραση του σηματοδοτικού αυτού μονοπατιού με πολλαπλές οδούς σηματοδότησης όπως Hedgehog, MAPK, NF/κB, BMP/TGF-β/Smad και Notch επηρεάζουν την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, την υπερτροφία, τον καταβολισμό και τον αναβολισμό, διαδικασίες οι οποίες έχουν άμεση συσχέτιση με την ανάπτυξη ΟΑ (Wang 2019).

### **A.3. Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη**

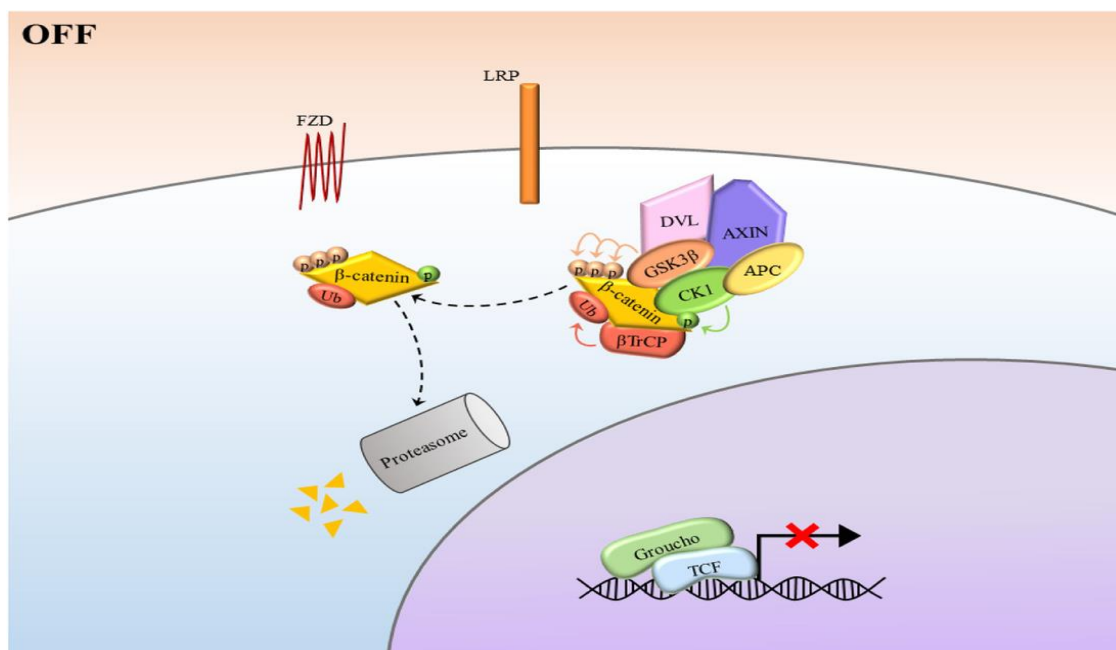
Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β-κατενίνη υπόκειται αυστηρό έλεγχο έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η σωστή λειτουργία του καθώς ενέχεται στην ρύθμιση πληθώρας διαδικασιών τόσο κατά την εμβρυική ανάπτυξη, όσο και καθ' όλη την διάρκεια της ζωής (Nguyen 2019, Clevers 2006). Το μονοπάτι Wnt/ β-κατενίνη ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την μοίρα των βλαστικών κυττάρων, την απόπτωση ενώ δυσλειτουργία του οδηγεί σε απώλεια της ομοιοστατικής ισορροπίας των ιστών και συμβάλει στην ανάπτυξη διαφόρων πολυπαραγοντικών ασθενειών όπως ο καρκίνος αλλά και η ΟΑ (Nguyen 2019, Liu 2017).

#### **A.3.1. Κύρια μόρια του μονοπατιού σηματοδότησης Wnt/ β-κατενίνη**

Η β-κατενίνη, μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που η ενεργή της μορφή μεταφέρεται στον πυρήνα ώστε να ασκήσει τη δράση της, είναι το κύριο μόριο της κανονικής σηματοδότησης του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνη, καθώς η σταθερότητα των πρωτεϊνικών της μορίων στο κυτταρόπλασμα και η μετέπειτα μεταφορά της στον πυρήνα καθορίζει την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων που αποτελούν στόχοι του μονοπατιού που συμμετέχει (Monroe 2012, Clevers 2006, Almeida 2005). Η αποδόμηση ή όχι της β-κατενίνης στο πρωτεόσωμα άρα και η σταθερότητα της, ελέγχεται από ένα σύμπλοκο καταστροφής, η ενεργοποίηση του οποίου καθορίζεται από την παρουσία ή όχι των πρωτεϊνών Wnts (Monroe 2012, Clevers 2006, Almeida 2005). Οι Wnts είναι εκκρινόμενες πλούσιες σε κυστεΐνη γλυκοπρωτεΐνες που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής μοίρας,



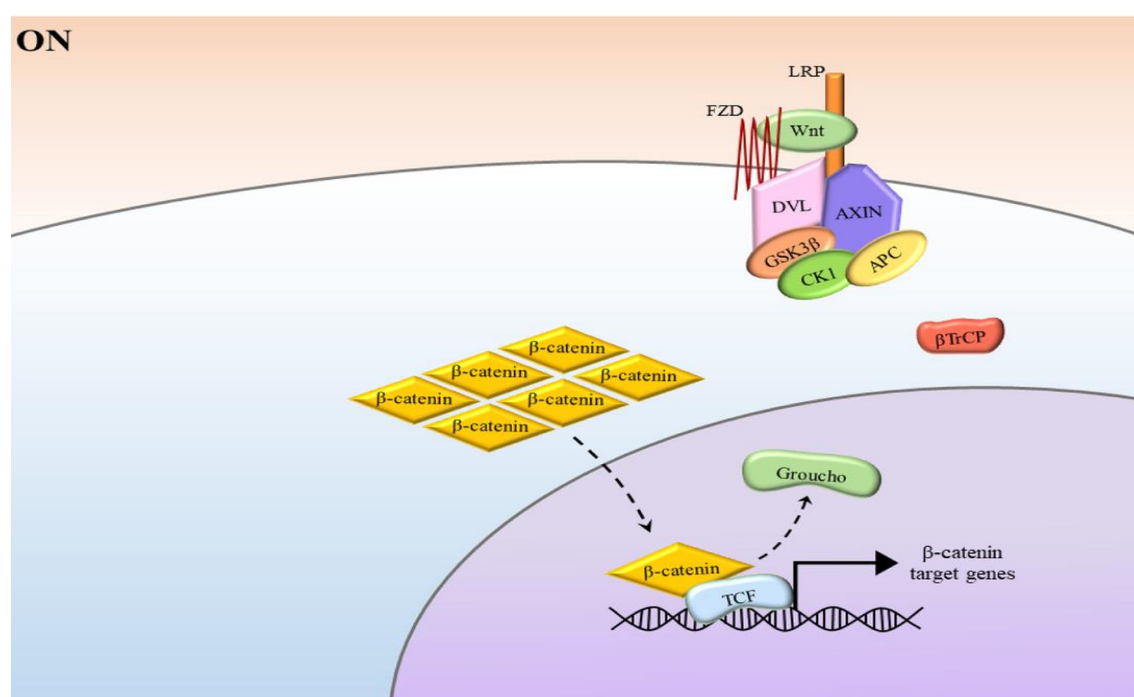
της γονιδιακής έκφρασης και της επιβίωσης των κυττάρων και συνδέονται στους κατάλληλους υποδοχείς των κυττάρων ώστε να ενεργοποιηθεί το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -κατενίνη (Monroe 2012, Clevers 2006, Almeida 2005). Όταν η Wnt πρωτεΐνη απουσιάζει ένα κυτταροπλασματικό σύμπλοκο πρωτεϊνών οδηγεί στην αποδόμηση της  $\beta$  κατενίνης. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από τις APC (adenomatous polyposis coli), GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ), CK1 (casein kinase 3 $\beta$ ), AXIN 1/2, Dvl (Dishevelled) και την λιγάση E3,  $\beta$ -TrCP. (Nguyen 2019, Monroe 2012). Η AXIN λειτουργεί ως πρωτεΐνη κρίωμα για την συναρμολόγηση του συμπλόκου αυτών των πρωτεϊνών που θα αποδομήσουν την  $\beta$ -κατενίνη. Αρχικά η  $\beta$ -κατενίνη φωσφορυλιώνεται στην S45 από την CK1 και στην συνέχεια στη S33,37 και T41 από τη GSK3 $\beta$  (Nguyen 2019). Η  $\beta$ -TrCP αναγνωρίζει την φωσφορυλιωμένη  $\beta$ -κατενίνη και δημιουργείται ένα σύμπλοκο με την Skp1 και Cullin ώστε η  $\beta$ -κατενίνη να ουβικουτινιωθεί και τελικά να αποδομηθεί στο πρωτεόσωμα (2019, Clevers 2006).



**Εικόνα 4:** Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/  $\beta$ -κατενίνης είναι απενεργοποιημένο, όταν η Wnt απουσιάζει (Nguyen 2019).

Η παρουσία συγκεκριμένων Wnts οδηγεί στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -κατενίνη. Το αρχικό βήμα είναι η πρόσδεση των Wnts στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας FZD (Frizzled) και LRP 5/6. Έπειτα μέσω της αλληλεπίδρασης με την κυτταροπλασματική επικράτεια του FZD, η Dvl

στρατολογείται στην κυτταρική μεμβράνη (Nguyen 2019). Παράλληλα η Dvl προσδένεται στην AXIN, προκαλώντας την μεταφορά ολόκληρου του συμπλόκου καταστροφής της β-κατενίνης στην κυτταρική μεμβράνη (Nguyen 2019). Η β-κατενίνη ελεύθερη πλέον από το σύμπλοκο καταστροφής της, δεν φωσφορυλιώνεται και δεν αποδομείται, με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή της στο κυτταρόπλασμα να αυξάνεται και τελικά να μετατοπίζεται στον πυρήνα (Monroe 2012, Clevers 2006). Η β-κατενίνη προσδένεται στους μεταγραφικούς παράγοντες TCF/LEF, εκτοπίζοντας τον μεταγραφικό αναστολέα Groucho με επακόλουθο την επαγωγή της την μεταγραφής των γονιδίων-στόχων (Nguyen 2019, Monroe 2012, Clevers 2006).



**Εικόνα 5:** Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β-κατενίνη είναι ενεργοποιημένο μετά την πρόσδεση της Wnt στους κυτταροπλασματικούς υποδοχείς FZD και LRP 5/6 (Nguyen 2019).

### A.3.3. Ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ β-κατενίνης στην ΟΑ

Η σηματοδότηση Wnt/β-κατενίνη αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ΟΑ (Cherifi 2021). Η σηματοδοτική οδός Wnt/β-κατενίνη εμφανίζει υπερβολική ενεργοποίηση στην ΟΑ και παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου καθώς αλληλεπιδρά με ένα πλήθος

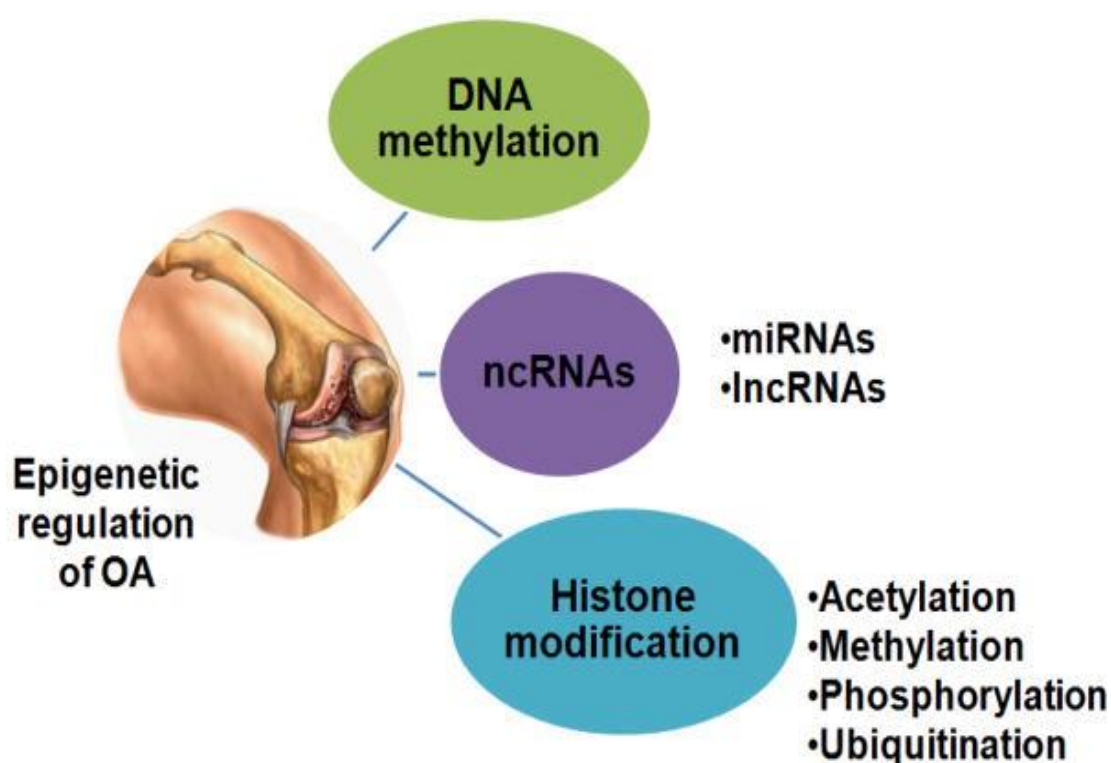
σηματοδοτικών μονοπατιών όπως ο Hedgehog, NF/κB, BMP/TGF-β/Smad, PTH, Notch και HIF1α, τα οποία ελέγχουν διεργασίες που έχουν άμεση σχέση με την ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου (Wang 2019). Η οδός σηματοδότησης Wnt ελέγχει διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των χονδροκυττάρων ενώ πιθανώς έχει καθοριστικό ρόλο στις αντιφλεγμονώδεις αντιδράσεις (Liu 2019). Μελέτες δείχνουν ότι η σηματοδοτική αυτή οδός εμπλέκεται στην απόπτωση μέσω της ρύθμισης γονιδίων, όπως το c-Myc και η κυκλίνη D1 (Zhang 2015). Η λειτουργία της οδού Wnt στην ομοίωση των χονδροκυττάρων και η παθογένεια της ΟΑ παραμένει αμφιλεγόμενη (Charlier 2016). Από την μία, τα αποτελέσματα έρευνας έδειξαν ότι η οδός Wnt έχει προστατευτικό ρόλο ενάντια στην απόπτωση των χονδροκυττάρων και την καταστροφή του αρθρικού χόνδρου καθώς η αναστολή της σηματοδότησης της β-κατενίνης σε χονδροκύτταρα ποντικών οδήγησε σε σημαντική αύξηση της απόπτωσης των ΟΑ χονδροκυττάρων (Charlier 2016). Από την άλλη όμως, έχει βρεθεί επίσης ότι ο παράγοντας μεταγραφής 4 (TCF4), ένας μεταγενέστερος μεσολαβητής σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνης, βρέθηκε αυξημένος στον ανθρώπινο χόνδρο ΟΑ σε σύγκριση με τον υγιή χόνδρο (Charlier 2016). Η υπερέκφραση του TCF4 ενεργοποίησε την κασπάση 3/7 και προκάλεσε απόπτωση ανθρώπινων χονδροκυττάρων και γεγονός που μπορεί να συμβάλει στον εκφυλισμό του οστεοαρθρικού (Charlier 2016). Φαίνεται λοιπόν ότι οι επιδράσεις της σηματοδότησης Wnt στην ΟΑ είναι περίπλοκες και τόσο η υπερβολική σηματοδότηση όσο και η απουσία ενεργοποίησης του Wnt μπορούν να συμβάλουν στη βλάβη των αρθρώσεων (Cherifi 2021). Το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt χαρακτηρίζεται από διαφορετικά επίπεδα ρύθμισης, γεγονός που όχι μόνο επισημαίνει τη σημασία του στον υγιή ή οστεοαρθρικό χόνδρο, αλλά παρέχει επίσης πολλές ευκαιρίες για συγκεκριμένη ρύθμιση και διαμόρφωση αυτών των καταρακτών σηματοδότησης και επομένως για θεραπευτικές παρεμβάσεις (Cherifi 2021). Μια πρόσφατη κλινική δοκιμή φάσης I (NCT02095548) έδειξε ότι ο αναστολέας σηματοδότησης της οδού σηματοδότησης Wnt, SM04690, έχει τη δυνατότητα να δράσει ως φάρμακο τροποποίησης της νόσου (disease-modifying osteoarthritis drug) (DMOAD) (Wang 2019). Λόγω της σπουδαιότητας αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού στην αιτιοπαθογένεια της νόσου, οι μελλοντικές έρευνες πρέπει να επικεντρωθούν στην ανάπτυξη πρόσθετων αναδυόμενων γενετικών θεραπειών ή μικρών μορίων που στοχεύουν στο μονοπάτι σηματοδότησης Wnt (Wang 2019).

#### A.4 Επιγενετική και οστεοαρθρίτιδα

Η επιγενετική είναι ένα πεδίο της γενετικής όπου οι διαφορές στον κυτταρικό φαινότυπο θεωρείται ότι προκύπτουν από εξωτερικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τον τρόπο ρύθμισης της γονιδιακής δραστηριότητας και χωρίς να συμβαίνουν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA (Malemud 2018). Οι επιγενετικές τροποποιήσεις μπορεί να είναι σταθερές και να μεταφέρονται στις μελλοντικές γενιές, αλλά σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να είναι δυναμικές και να αλλάζουν σε απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Shen 2017). Επομένως αν και το επιγένωμα κάθε κυττάρου είναι μοναδικό, εντούτοις μπορεί να υποστεί χρονικές και χωρικές αλλαγές ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως η διατροφή, η άσκηση, το κάπνισμα και η κατάσταση της νόσου (Khan 2018). Υπάρχουν τρεις κύριοι μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης γονιδίων: η μεθυλίωση του DNA που μεταβάλλει ομοιοπολικά τη δομή του DNA, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών που επηρεάζουν τη διαμόρφωση της χρωματίνης καθώς και τα μη κωδικοποιητικά μόρια RNAs, όπως τα μικρά μη κωδικοποιητικά RNAs (microRNAs) και τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (lncRNAs), που δρουν κυρίως στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης (Shen 2017, Meulenberg 2016).

Τις τελευταίες δεκαετίες, μια πληθώρα μελετών έχει αναδείξει τις επιγενετικές αλλαγές ως σημαντικοί παράγοντες στην αποδόμηση της ECM του χόνδρου και την ανάπτυξη και τη εξέλιξη της OA (Malemud 2018). Μελέτες ανάλυσης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS) εντόπισαν αρκετά κρίσιμα γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των IL-1β, IL-6 και TNF-α, τα οποία υπέστησαν επιγενετικές τροποποιήσεις κατά την εξέλιξη της OA (Malemud 2018). Στην πραγματικότητα, αυτά τα γονίδια και άλλα εμπλέκονταν σε φλεγμονώδεις διεργασίες που συμβάλλουν στην εξέλιξη της OA, καθώς και θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του υπερτροφικού φαινοτύπου των χονδροκυττάρων που χαρακτηρίζει την αλλοιωμένη δομή του χόνδρου στην νόσο (Malemud 2018). Σε OA χονδροκύτταρα παρατηρήθηκε υπομεθυλίωση στις περιοχές υποκινητών συγκεκριμένων καταβολικών γονιδίων όπως MMP3, MMP9, MMP13 and ADAMTS4 και επομένως αύξηση της έκφρασης των γονιδίων αυτών, αναδεικνύοντας τη μεθυλίωση του DNA ως μηχανισμό αιτιοπαθογένειας της OA (Khan 2018). Όσον αφορά τις τροποποιήσεις των ιστονών, έχει βρεθεί ότι οι αποκετυλάσες των ιστονών (HDAC) καταστέλλουν παράγοντες μεταγραφής σημαντικούς για την υπερτροφία των χονδροκυττάρων και τη σύνθεση MMP-13, ενώ

ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι η ενδοχόνδρια οστεοποίηση ήταν εξασθενημένη όταν γινόταν knock out για τις HDAC3, 4, 5 και 7 (Primorac 2020). Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στον ρόλο των non coding RNAs στην OA και κυρίως στον ρόλο των miRNAs, όπου πολυάριθμα από αυτά τα μόρια έχουν πλέον συσχετιστεί με την ανάπτυξη χόνδρου, την ομοιόσταση και εμπλέκονται στην ανάπτυξης OA. Αντιθέτως με τα miRNA, η έρευνα για τον ρόλο άλλων τύπων μη κωδικών RNA, όπως τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA), στην OA και τον χόνδρο παραμένει ακόμα ελλιπή/ σε πρώιμο στάδιο (Reynard 2020).



***Εικόνα 6:** Επιγενετική ρύθμιση στην OA. Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης που επηρεάζουν την παθογένεση της OA. Η μεθυλίωση του DNA, τα μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs: miRNAs και lncRNAs) και οι τροποποιήσεις ιστονών. Η ακετυλίωση της ιστόνης, η μεθυλίωση της ιστόνης, η φωσφορυλίωση και η ουβικουιτίνωση είναι σημαντικές τροποποιήσεις της ιστόνης που εμπλέκονται στην OA (Khan 2018).*

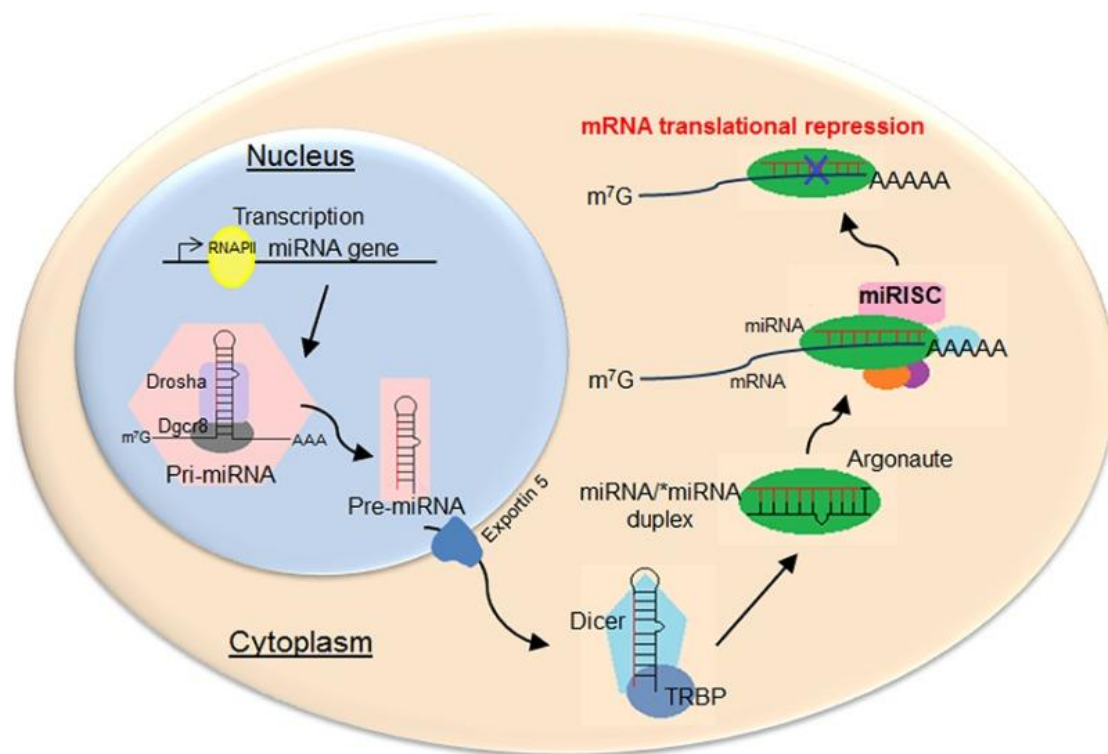
#### A.4.1 microRNAs

Τα microRNAs (ή αλλιώς miRNAs ή miRs) είναι μικρά μη κωδικά μονόκλιωνα μόρια RNA, μήκους 18-22 νουκλεοτιδίων (Varvara Trachana 2018, Wu 2014). Κύριος ρόλος τους είναι η επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο κυρίως μέσω πρόσδεσης στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) των γονιδίων-στόχων τους, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση των mRNA στόχων ή την καταστολή της μετάφρασης (Yu 2019, Varvara Trachana 2018). Μπορούν να στοχεύουν ταυτόχρονα ένα πλήθος γονιδίων προκαλώντας μείωση των επιπέδων της μεταγραφικής τους έκφρασης (Laffont 2017). Ένα microRNA μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση έως και 300 διαφορετικών mRNA στόχων ενώ ένα συγκεκριμένο mRNA μπορεί να έχει έως και 40 θέσεις δέσμησης για διαφορετικά microRNAs (Laffont 2017). Συμμετέχουν σε πλήθος βιολογικών διεργασιών, ελέγχοντας την τύχη των κυττάρων κατά τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίησή τους (Trachana 2018, Wu 2014). Περίπου το 30% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στο ανθρώπινο γονιδίωμα μπορεί να ρυθμίζεται από microRNAs, υποδηλώνοντας τον σπουδαίο ρόλο τους (Wang 2020, Trachana 2018, Laffont 2017, Wu 2014). Επομένως, η μη φυσιολογική δράση των microRNAs μπορεί να οδηγήσει σε πολλές ανθρώπινες διαταραχές, όπως καρκίνος, καρδιαγγειακές παθήσεις και νευρολογικές δυσλειτουργίες καθώς και ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία όπως η OA (Wang 2020, Varvara Trachana 2018, Laffont 2017, Wu 2014). Επιπλέον, τα miRNAs έχουν αναλυθεί ως πιθανοί βιοδείκτες ενώ το μικρό τους μέγεθος τους καθιστά ελκυστικούς θεραπευτικούς στόχους (Shen 2017).

##### A.4.1.1. Μηχανισμός βιογένεσης microRNAs

Η βιογένεση των microRNAs περιλαμβάνει έναν μηχανισμό δύο σταδίων, στα οποία λαμβάνουν χώρα τα ένζυμα Drosha και Dicer (Wang 2020). Τα γονίδια που κωδικοποιούν miRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II ή III για τη δημιουργία ενός δίκλωνου με δομή φουρκέτας πρωτογενούς αντιγράφου-primary miRNA (Pri-miRNA) (Laffont 2017, Wu 2014). Στον πυρήνα το pri-miRNA επάγεται σε επεξεργασία από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από τα ένζυμα Drosha και DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8)(και μετατρέπεται σε pre-

miRNA (microRNA precursor), το οποίο έχει μέγεθος 70nt και εξάγεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της εξπορτίνης-5 (Wang 2020, Yu 2019, Wu 2014). Εκεί το αναγνωρίζεται και επεξεργάζεται από την ριβονουκλεάση RNase III, Dicer με αποτέλεσμα την διάσπασή του pre-miRNA και την μετατροπή του σε ώριμο miRNA μεγέθους 22 nt. (Wang 2020, Wu 2014). Στη συνέχεια, η Dicer συναρμολογείται με πρωτεΐνες δέσμησης RNA και πρωτεΐνες Argonaute (Ago) για να σχηματίσει το σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complexes) (Laffont 2017). Το σύμπλοκο RISC προσδένεται στο ώριμο microRNA και το νέο σύμπλοκο miRNA-RISC δεσμεύει mRNA στόχους. Κατά το τελευταίο βήμα, το σύμπλεγμα RISC στρατολογεί την οικογένεια πρωτεϊνών GW182 στην περιοχή 3' UTR που επιτρέπουν την καταστολή της μετάφρασης mRNA ή προάγουν τη αποαδενυλίωση και την αποικοδόμηση του mRNA (Laffont 2017, Wu 2014). Ο βαθμός συμπληρωματικότητας των ζευγών βάσεων αποτελεί κύριο παράγοντα του βαθμού ρύθμισης (Yu 2019). Στην περίπτωση που υπάρχει μερική συμπληρωματικότητα μεταξύ microRNA και mRNA στόχου, προκαλείται αναστολή της μετάφρασης του mRNA ενώ διάσπαση και αποικοδόμηση του mRNA στόχου προκαλείται όταν υπάρχει πλήρης συμπληρωματικότητα των ζευγών βάσεων (Yu 2019).



**Εικόνα 7:** Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας βιογένεσης των *microRNAs* (Noureddine 2013).

#### **A.4.1.2. microRNAs και οστεοαρθρίτιδα**

Ένα πλήθος microRNAs έχουν ρόλο στην ανάπτυξη της OA καθώς μπορούν μέσω των πολυάριθμων γονιδίων-στόχων τους, να ελέγχουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών όπως την ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και απόπτωσης των χονδροκυττάρων, της σκελετικής ανάπτυξης, του μεταβολισμού και ομοιόστασης της εξωκυτταρικής μήτρας καθώς και της φλεγμονώδους απόκρισης και αυτοφαγίας, λειτουργίες που ενέχονται στην παθογένεια της OA (Xie 2020, Wang 2020, Yu 2019, Chen 2015, Wu 2014). Επιπρόσθετα, οι σηματοδοτικοί οδοί στις οποίες ενέχονται οι παράγοντες TGF- $\beta$ , SMA και SMADs, BMP, MMPs, iNOS, IL-1 και TNF- $\alpha$  και εμπλέκονται στην ανάπτυξη OA φαίνεται να ρυθμίζονται εν μέρει από miRNAs που διαφοροποιούνται στην OA (Malemud 2018). Το πρώτο μελετημένο miRNA στην οστεοαρθρίτιδα ήταν το miR-140, το οποίο εκφράζεται συγκεκριμένα στον χόνδρο, παίζει σημαντικό ρόλο στη χονδρογένεση και η έκφρασή του παρουσιάζει μείωση στην OA (Khan 2019). Από το σύνολο περίπου των 100 microRNAs που παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στην OA, μόλις τα 46 έχει αποδειχθεί να ενέχονται στην αιτιοπαθογένεια της νόσου (Cong 2017). Η πλειονότητα των ανωτέρω microRNAs ρυθμίζουν την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων που ευθύνονται για τη γονιδιακή ρύθμιση ενώ άλλα ελέγχουν διαδικασίες που πραγματοποιούνται στον πυρήνα (Malemud 2018). Τα microRNA που παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στην OA, επηρεάζουν διαδικασίες όπως τον μεταβολισμό των λιπιδίων, την ομοιόσταση και διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, την φλεγμονή καθώς και την αποδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας (Khan 2018).

#### **A.4.1.2 miR-150-5p και οστεοαρθρίτιδα**

Ένα από τα microRNAs που παρουσιάζει διαφοροποιημένη έκφραση στην OA είναι το miR-150-5p, με έναν μικρό αριθμό μελετών να επικεντρώνεται στη διερεύνηση του ρόλου στον καταβολισμό του αρθρικού χόνδρου. Ωστόσο, παρόλο που πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το miR-150-5p θα μπορούσε να έχει ρόλο στην καταστολή του πολλαπλασιασμού και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, να διευκολύνει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και να αναστέλλει τη διαδικασία ανάπτυξης του όγκου (Saberinia 2020), ο ρόλος του παραμένει ακόμα ασαφής στην αιτιοπαθογένεια της OA και απαιτούνται περαιτέρω έρευνες (Zhang 2019).



Μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα ορού προερχόμενα από ασθενείς με ΟΑ και υγιή άτομα, προκειμένου να αναδειχθούν νέοι βιοδείκτες της νόσου, έδειξε μείωση των επιπέδων έκφρασης του miR-150-5p στον ορό των ΟΑ ασθενών συγκριτικά με τα υγιή άτομα, αποτέλεσμα που επιβεβαιώθηκε και σε ΟΑ χονδροκύτταρα (Ntoumou 2017). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η αντιγονεκτίνη απελίνη (adipokine apelin), που συμμετέχει στη διαδικασία της αγγειογένεσης και φαίνεται να εμπλέκεται στην παθογένεια της ΟΑ, μειώνει την έκφραση του miR-150-5p σε OASFs (human osteoarthritis synovial fibroblasts) κύτταρα με αποτέλεσμα να επάγεται η έκφραση του VEGF και κατ'επέκταση η αγγειογένεση στον υμένα μέσω του καταρράκτη σηματοδότησης FAK /Src /Akt (Wang 2020). Προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην κυτταρική σειρά χονδροκυττάρων ATDC5 έδειξε πως η μείωση της έκφρασης του microRNA-150 προστατεύει έναντι της φλεγμονής που προκαλείται από την IL-1 λόγω της υπερέκφρασης του Kruppel-like factor 2 (Yang 2018).

Την τελευταία δεκαετία μια πληθώρα μελετών επικεντρώνεται στη μελέτη της αλληλεπίδρασης των microRNAs με τα lncRNAs και αν πιθανές διαταραχές αυτής μπορεί να συμβάλλει στη εκδήλωση πολυπαραγοντικών νόσων, όπως η ΟΑ. Όσον αφορά το miR-150-5p, μελέτες έχουν αναδείξει έναν μεγάλο αριθμό lncRNAs να ρυθμίζουν τα επίπεδα έκφρασης του miR-150-5p σε διάφορους καρκινικούς τύπους (Shi 2021, Jia 2020, Wang 2020). Δύο πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως τα lncRNAs MALAT1 και LINC00511, αλληλεπιδρούν με το miR-150-5p στα ΟΑ χονδροκύτταρα, μειώνοντας τα επίπεδα έκφρασης του και συμβάλλοντας στην ανάπτυξη και εξέλιξη της ΟΑ μέσω διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών που το miR-150-5p ρυθμίζει (Zhang 2020, Ying Zhang 2019).

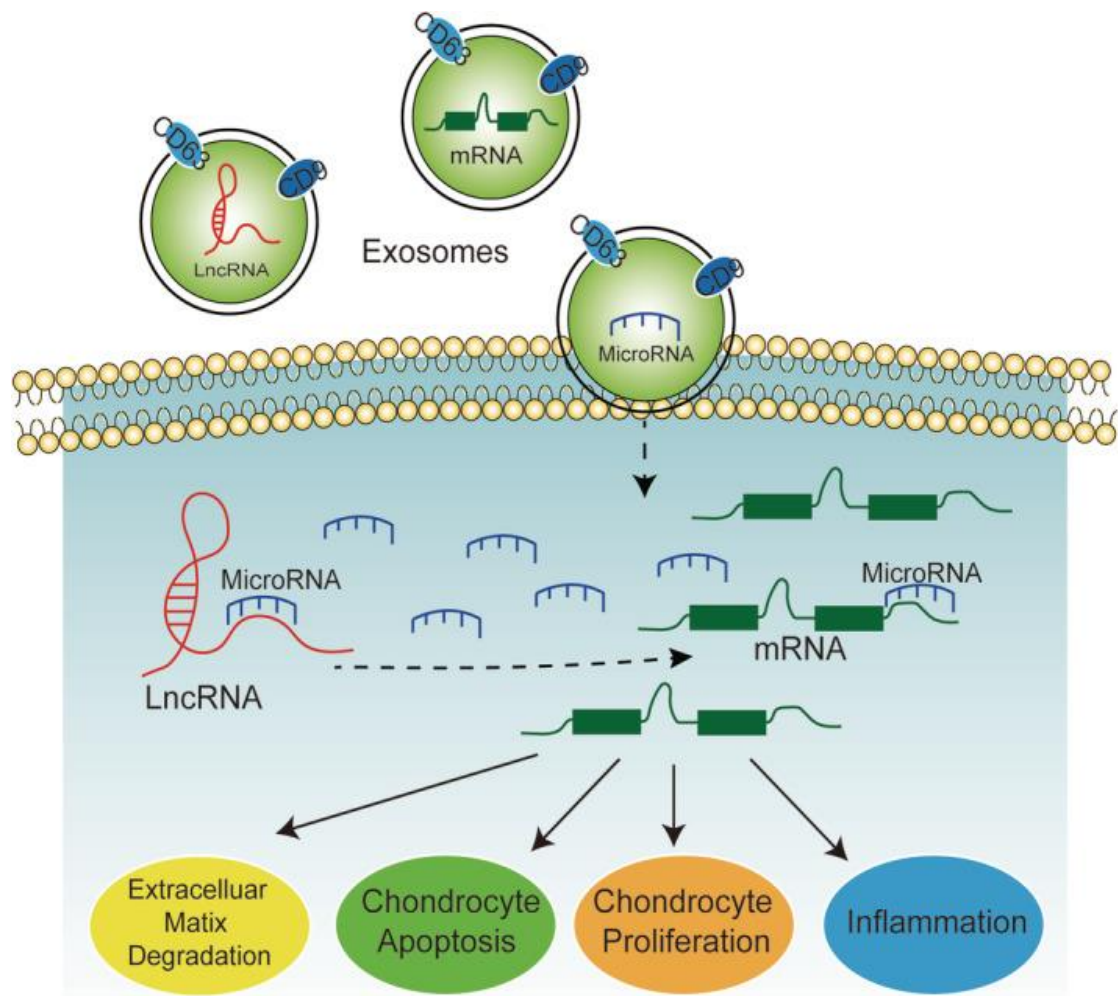
#### **A.4.2. lncRNAs (long non coding RNAs)**

Τα μακρά μη κωδικά RNA (lncRNAs) ορίζονται ως ρυθμιστικά μη κωδικοποιητικά μόρια RNAs, τα οποία μεταγράφονται αλλά δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνη και έχουν μήκος περισσότερο από 200 νουκλεοτίδια (nt) (Wang 2019, Khan 2018). Μεταγράφονται πρωτίστως από την RNA πολυμεράση II και στην συνέχεια μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο όπως αφαίρεση ιντρονίων, εναλλακτικό μάτισμα και προσθήκη πολύ-A ουράς (Shen 2017). Τα επίπεδα

έκφρασης τους είναι σημαντικά χαμηλότερα από αυτά των γονιδίων που παράγουν mRNAs, περιορίζονται συνήθως σε συγκεκριμένους τύπους ιστών και είναι λιγότερο συχνά διατηρημένα μεταξύ των ειδών (Shen 2017). Τα lncRNAs εμπλέκονται σε μια ποικιλία βιολογικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου της υποκυτταρικής αρχιτεκτονικής, την σταθεροποίηση πρωτεϊνικών συμπλοκών καθώς και την ανάπτυξη και απόπτωση των κυττάρων και συνήθως εντοπίζονται στον πυρήνα όπου εμπλέκονται σε διάφορους μηχανισμούς επιγενετικής ρύθμισης για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης (Wang 2019, Shen 2017). Επιπρόσθετα, τα lncRNAs μπορούν να λειτουργήσουν ως ανταγωνιστικά ενδογενή RNA (ceRNA), μειώνοντας έτσι την ενδογενή κατασταλτική δράση των miRNAs (Wang 2019). Ως αποτέλεσμα, το miRNA στο οποίο δεσμεύεται το lncRNA χάνει την ικανότητά του να αποδομεί το mRNA-στόχο, ή να παρεμποδίζει την μετάφραση του αυξάνοντας την έκφραση των γονιδίων-στόχων του (Klec 2019).

#### **A.4.2.1 lncRNAs και οστεοαρθρίτιδα**

Τα lncRNAs μπορούν να έχουν ρόλο σε πολλαπλές βιολογικές διεργασίες εκφυλισμού του χόνδρου και να επηρεάζουν διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων, τη σύνθεση της ECM και τη φλεγμονώδη απόκριση στην OA, οι οποίες επηρεάζουν την ισορροπία μεταξύ των αναβολικών και καταβολικών φάσεων του χόνδρου των αρθρώσεων (Tu 2020). Πολλά lncRNAs όπως τα MALAT1, XIST, MIAT και NEAT1 εμφανίζουν διαφοροποιημένη έκφραση σε οστεοαρθρικούς ιστούς (Wang 2019) ενώ μελέτη έδειξε την ύπαρξη τουλάχιστον 3007 lncRNAs που παρουσιάζουν αύξηση της έκφρασης σε OA χόνδρο σε σχέση με τον φυσιολογικό και 1707 lncRNAs που παρουσιάζουν μείωση της έκφρασης τους σε OA χόνδρο (Khan 2018). Τα lncRNAs που παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στην OA στοχεύουν άμεσα σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ενέχονται στον σταδιακό εκφυλισμό του χόνδρου (μονοπάτι του TGFβ, IL-1, Wnts) αλλά και έμμεσα ρυθμίζοντας τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων microRNAs τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν μόρια των ανωτέρω μονοπατιών (Tu 2020).



**Εικόνα 8:** Τα *microRNAs*, *lncRNAs* και εξωσώματα παρεμβαίνουν στην παθολογική διαδικασία της ΟΑ μέσω του πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων, της απόπτωσης των χονδροκυττάρων, της αποικοδόμησης της εξωκυτταρικής μήτρας και της φλεγμονής. Τα εξωσώματα που εκκρίνονται από άλλα κύτταρα περιέχουν διαφορετικά *lncRNAs*, *microRNAs* ή *mRNAs*. Μόλις τα εξωσώματα έρχονται σε επαφή με την κυτταρική μεμβράνη, αυτές οι ουσίες μεταφέρονται στο κύτταρο στόχο. Στο κύτταρο, το *microRNA* δεσμεύει το *mRNA* στόχο του και αναστείλει την έκφρασή του αλλά η ανταγωνιστική δέσμευση του *lncRNA* στο *microRNA* σταματάει την αναστολή των γονιδίων στόχων από το *microRNA* (Xie 2020).

#### A.4.2.2 NEAT1 και οστεοαρθρίτιδα

Το NEAT1 (Nuclear enriched abundant transcript 1) ανακαλύφθηκε το 2007 από τους Hutchinson et al., το γονίδιο του εντοπίζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 11q13 και κυρίως εντοπίζεται σε ειδικά πυρηνικά σύμπλοκα που αποτελούνται από

πρωτεΐνες (paraspeckles) (Wang 2019, Hutchinson 2007). Το NEAT1 λειτουργεί ως ανταγωνιστικό ενδογενές RNA (ceRNA) που μπορεί να αλληλεπιδρά (sponging) με πολλά διαφορετικά miRNAs και φαίνεται να ενέχεται στην εκδήλωση του καρκίνου συμμετέχοντας σε διεργασίες που σχετίζονται με την ανάπτυξη του όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η εισβολή και η μετανάστευση (Klec 2019). Υπάρχει μια άμεση αλληλεπίδραση του NEAT1 με το miRNA στόχο του και πιθανολογείται ότι η αλληλεπίδραση αυτή, κατά την οποία το NEAT1 δρα ως ceRNA, γίνεται είτε μέσω μεταφοράς του NEAT1 στο κυτταρόπλασμα (ήδη μελέτες έχουν δείξει ότι lncRNAs μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα σε συνθήκες κυτταρικού στρες) είτε μέσω μεταφοράς του miRNA στον πυρήνα (Klec 2019). Λόγω αύξησης του κυτταρικού στρες lncRNAs μεθυλιώνονται ή αποκτούν 5' καλύπτρα και στην συνέχεια μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα (Klec 2019). Επομένως είναι πιθανό ότι και το NEAT1 υφίσταται την επίδραση των μηχανισμών αυτών (μετα-μεταγραφική τροποποίηση ή/και απόκτηση 5' καλύπτρας) και να εξέρχεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Klec 2019). Ωστόσο οι Nishizawa et al. έδειξαν ότι το LINC00152 αλλά όχι το NEAT1 μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα λόγω απόκρισης στο κυτταρικό στρες (Nishizawa 2018). Επιπρόσθετα κατά το κυτταρικό στρες, τα miRNA μεταφέρονται στον πυρήνα μέσω του συμπλόκου SIRC(stress-induced response complex) (Klec 2019). Έτσι προτείνεται η θεωρία/υπόθεση ότι η επαγόμενη από το κυτταρικό στρες μετεγκατάσταση του miRNA στον πυρήνα είναι μια καθολική διαδικασία που θεωρητικά επιτρέπει το NEAT1 να λειτουργεί ως ceRNA (Klec 2019). Ωστόσο παραμένει προς το παρόν άγνωστο αν αυτός είναι όντως ο πραγματικός τρόπος λειτουργίας NEAT1 (ως ceRNA) ή εάν υπάρχει άλλη εξήγηση που ερμηνεύει τη δράση του ως ceRNA (Klec 2019).

Πρόσφατες έρευνες προτείνουν ότι το NEAT1 πιθανόν έχει ρόλο στην εξέλιξη της ΟΑ (Liu 2020, Li 2020). Σε ΟΑ χονδροκύτταρα παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη έκφραση του NEAT1 σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης του σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα (Xiao 2021, Liu 2020). Η αυξημένη έκφραση του NEAT1 στα ΟΑ χονδροκύτταρα συσχετίστηκε με τα μειωμένα επίπεδα του του miR-193a -3p, προωθώντας τη φλεγμονή και την απόπτωση των χονδροκυττάρων και αναστέλλοντας την παραγωγή ECM στα χονδροκύτταρα (Liu 2020). Η βιωσιμότητα των ΟΑ χονδροκυττάρων εξαρτάται από τις αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του NEAT1, με μείωση της έκφρασης του NEAT1 να οδηγεί σε αύξηση της βιωσιμότητας των

χονδροκυττάρων ενώ αντίθετα αύξηση της έκφρασης του μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη απόπτωση των κυττάρων του χόνδρου (Xiao 2021). Πιο συγκεκριμένα, ο Xiao και οι συν. έδειξαν ότι σε OA χονδροκύτταρα, η υπερέκφραση του NEAT1 οδήγησε σε μειωμένη έκφραση του miR-543, με αποτέλεσμα τη μείωση της βιωσιμότητας των χονδροκυττάρων, και την αύξηση της απόπτωσης και φλεγμονής τους, ενώ η αποσιώπηση της έκφρασης του NEAT1 είχε ως αποτέλεσμα την αναστροφή των ανωτέρω διαδικασιών (Xiao 2021).

Αντίθετα αποτελέσματα προέκυψαν από τη μελέτη του Li και των συν. καθώς αναφέρεται πως η αυξημένη έκφραση του NEAT1 στην OA μπορεί να προωθήσει τον πολλαπλασιασμό των OA χονδροκυττάρων και να αναστέλλει την απόπτωση τους μέσω της ρύθμισης του miR-16-5p, το οποίο δρα αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και προάγει την απόπτωση (Li 2020). Επιπλέον, αποσιώπηση της έκφρασης του NEAT1 προκάλεσε απόπτωση και φλεγμονώδη απόκριση και ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό στα OA χονδροκύτταρα μέσω της ρύθμισης του άξονα miR-181a-GPD1L (Wang 2019).

#### **A.5. Στόχος εργασίας**

Βάση τη διεθνούς βιβλιογραφίας γνωρίζουμε τον κρίσιμο ρόλο του μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -κατενίνη καθώς επίσης και της επιγενετικής στην ανάπτυξη της OA. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το miR-150-5p αλλά και το lncRNA NEAT-1 μπορεί να ενέχονται στην αιτιοπαθογένεια της OA. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης του lncRNA NEAT-1 με το miR-150-5p και ο ρόλος του miR-150-5p μέσω της ρύθμισης της έκφρασης της  $\beta$ -κατενίνης, στην επαγωγή της έκφρασης των καταβολικών ενζύμων που ευθύνονται για την αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου.

Για τον σκοπό αυτό, στην διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν οι εξής πειραματικές μελέτες :

- Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του NEAT-1 και του miR-150-5p σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα.
- Διερεύνηση της ύπαρξης αλληλεπίδρασης μεταξύ του NEAT-1 με το miR-150-5p μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης αλλά και σε κυτταρικό επίπεδο μέσω χορήγησης siRNA-NEAT-1 σε OA χονδροκύτταρα

- Προσδιορισμός γονιδίων-στόχων του miR-150-5p με εργαλεία βιοπληροφορικής
- Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας [GO enrichment analysis] και σηματοδοτικών μονοπατιών των γονιδίων-στόχων του miR-150-5p
- Ανάλυση της έκφραση της β-κατενίνης τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο όσο και σε πρωτεϊνικό, σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα
- Διερεύνηση της ρύθμιση της έκφρασης της β-κατενίνης από το miR-150-5p στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα μέσω επιδράσεων με mimic miRNA-150-5p
- Διερεύνηση της συμμετοχής του miR-150-5p στην καταβολική δράση των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων μέσω της ρύθμισης της β-κατενίνης, πραγματοποιώντας επιδράσεις με LiCl και mimic miR-150-5p σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα

## **B. Υλικά και Μέθοδοι**

### **B.1. Δείγματα αρθρικού χόνδρου**

Για την διεκπεραίωση της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή χονδροκύτταρα (ΟΑ χονδροκύτταρα) τα οποία απομονώθηκαν από δείγματα αρθρικού χόνδρου ασθενών που είχαν υποβληθεί σε χειρουργείο ολικής αρθροπλαστικής γόνατος λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ στην Ορθοπεδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα δείγματα αρθρικού χόνδρου που συμπεριελήφθησαν στην έρευνα απομονώθηκαν από σημεία του αρθρικού χόνδρου με υψηλό βαθμό αλλοίωση τα οποία παρουσίαζαν ΟΑ προχωρημένου σταδίου. Ασθενείς οι οποίοι παρουσίαζαν αρθρίτιδα στα πλαίσια άλλης ασθένειας ή ρευματοειδή αρθρίτιδα καθώς και σηπτική ΟΑ, χονδροδυσπλασία και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από την μελέτη. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν χονδροκύτταρα (φυσιολογικά) που απομονώθηκαν από αρθρικό χόνδρο ατόμων, χωρίς να έχουν ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων, που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση επανόρθωσης κατάγματος ή ακρωτηριασμό.

### **B.2. Καλλιέργεια χονδροκυττάρων**

Για την καλλιέργεια των φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 (DMEM/F-12). Πριν τη χρήση του, το θρεπτικό υλικό εμπλουτίστηκε με ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum/FBS) σε αναλογία 10% του όγκου του θρεπτικού υλικού (ο συγκεκριμένος ορός παρέχει τους αναγκαίους παράγοντες που συμβάλλουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό) καθώς και με αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin, P/S) σε αναλογία 1% του όγκου του θρεπτικού υλικού. Η ανάπτυξη των χονδροκυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Heraus Instrumanets), ο οποίος παρέχει σταθερή θερμοκρασία 37°C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO<sub>2</sub>. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ειδικό στείρο χώρο και όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε εστία κάθετης νηματικής ροής προς αποφυγή εξωτερικών μολύνσεων. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss) προκειμένου να ελέγχεται η ανάπτυξη των κυττάρων. Όταν τα χονδροκύτταρα κάλυψαν την επιφάνεια της φλάσκας αποκολλήθηκαν με τη χρήση θρυψίνης και χρησιμοποιήθηκαν για την

απομόνωση RNA, κυτταρικού εκχυλίσματος αλλά και για την πραγματοποίηση των επιδράσεων με διάφορες χημικές ουσίες.

### **B.3. Επιμόλυνση χονδροκυττάρων με mimic miR-150-5p, siRNA-NEAT1 και LiCl.**

#### B.3.1. Επιμόλυνση ΟΑ χονδροκυττάρων με mimic miR-150-5p ή siRNA-NEAT1

ΟΑ χονδροκύτταρα μεταφέρθηκαν σε πλάκα των 6 οπών (6-wells plate) και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM/F-12 με FBS αλλά χωρίς αντιβιοτικά για 24 ώρες στον κλίβανο. Την επόμενη μέρα ακολούθησε επιμόλυνση των κυττάρων είτε με negative control είτε με mimic miR-150-5p είτε με siRNA-NEAT1 σε συγκέντρωση 50 pmol για 72 ώρες. Η επιμόλυνση των χονδροκυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση λιποφεκταμίνης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

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

- Προσθήκη 5 μl λιποφεκταμίνης σε 125 μl Optimem σε ένα Eppendorf των 2 ml
- Προσθήκη 50 pmol negative control ή mimic miR-150-5p ή siRNA-NEAT1 σε 125μl Optimem σε ένα Eppendorf των 2 ml
- Επώαση των δύο παραπάνω διαλυμάτων για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ανάμειξη του διαλύματος της λιποφεκταμίνης με αυτό του negative control ή του mimic miR-150-5p ή του siRNA-NEAT1
- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από τα πηγαδάκια και ξέπλυμα με 5 ml PBS (x2)
- Μεταφορά 250μl του παραπάνω μίγματος σε κάθε πηγαδάκι
- Συμπλήρωση με προσθήκη 1.750μl θρεπτικού με FBS και επώαση των κυττάρων για 72 ώρες στον κλίβανο

#### B.3.2. Χορήγηση LiCl σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα και επακόλουθη επιμόλυνση με mimic miR-150-5p.

Φυσιολογικά χονδροκύτταρα μεταφέρθηκαν σε πλάκα των 6 οπών (6-wells plate) και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM/F-12 με FBS αλλά χωρίς αντιβιοτικά για 24 ώρες στον κλίβανο. Την επόμενη μέρα χορηγήθηκε NaCl (control) ή LiCl για 72 ώρες. Σε μία από τις οπές, μετά το πέρας της επώασης με LiCl αφαιρέθηκε



το θρεπτικό υλικό και ακολούθησε επιμόλυνση των κυττάρων με 50 pmol mimic miR για άλλες 72 ώρες.

#### **B.4. Απομόνωση RNA από χονδροκύτταρα κυτταροκαλλιέργειας**

Η απομόνωση RNA από τα χονδροκύτταρα έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την συλλογή των κυττάρων από 6 wells ήταν το εξής:

- Από τα wells αφαιρείται το υπερκείμενο και σε συνέχεια προστίθεται 1ml PBS για ξέπλυμα, το οποίο στην συνέχεια αφαιρείται
- Προσθήκη 300μl θρυψίνης
- Μεταφορά των 6 wells στον κλίβανο για 10min
- Scraper στα πηγαδάκια των 6 wells
- Προσθήκη 1,5ml θρεπτικού υλικού σε κάθε πηγαδάκι
- Μεταφορά του περιεχομένου σε νέο eppendorf
- Φυγοκέντρηση στις 6rpm για 8min στους 25 °C
- Απόρριψη του υπερκειμένου
- Φυγοκέντρηση στις 6rpm για 8min στους 25 °C
- Απόρριψη του υπερκειμένου
- Αποθήκευση στους -80 °C
- Προσθήκη 1 ml Trizol (η ποσότητα trizol κυμαίνεται από 1-3 ml και είναι ανάλογη με το μέγεθος του ιζήματος των κυττάρων) και μεταφορά σε Eppendorf των 2ml.
- Επώαση των δειγμάτων για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) .
- Προσθήκη 200 μl χλωροφόρμιου.
- Ανάδευση σε Vortex για 15 sec.
- Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C).
- Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 15 min στους 4 °C.
- Μεταφορά υπερκείμενου σε eppendorf των 2 ml
- Προσθήκη 500 μl ισοπροπυλικής αλκοόλης.
- Επώαση για 10 min στο ψυγείο στους -20°C.
- Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 10 min στους 4 °C.
- Απόρριψη υπερκείμενου

- Προσθήκη 1ml 75% αιθανόλης.
- Ανάδευση σε Vortex.
- Φυγοκέντρωση στις 8.000 στροφές για 8 min στους 4 °C.
- Απόρριψη υπερκείμενου
- Προσθήκη 1ml 75% αιθανόλης.
- Ανάδευση σε Vortex.
- Φυγοκέντρωση στις 8.000 στροφές για 8 min στους 4 °C.
- Απόρριψη υπερκείμενου
- Στέγνωμα του RNA σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) στον απαγωγό για περίπου μία ώρα.
- Διάλυση του ιζήματος(RNA) σε 30μl RNAase-free water.
- Επώαση στο υδατόλουτρο για 10 min στους 55-60 °C.
- Διάλυση του ιζήματος(RNA) και αποθήκευσής του στους -80 °C.

### **B.5. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)**

Τα RNAs που απομονώθηκαν από τα φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα καθώς και αλλά και από τα χονδροκύτταρα μετά την χορήγηση του ουσιών, μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής *in vitro*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας ή εκκινητές τεχνολογίας stem-loop (για miR-150-5p και U6) και το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή SuperScript III.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε 2μg RNA από κάθε δείγμα ενώ ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 22 μl. Αναλυτικότερα:

- Αρχικά το RNA διαλύθηκε σε ddH<sub>2</sub>O και προστέθηκε 1μl Random Primers/stem loop primers και 1μl dNTPs, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 15 μl
- Το μείγμα θερμάνθηκε στους 70 °C για 7 λεπτά, ώστε να γίνει αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών των RNA μορίων.
- Ακολούθησε προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων στις εξής ποσότητες
  - Ρυθμιστικό διάλυμα 5x: 5μl
  - DTT: 2μl
  - SuperScript III (200U/μl): 0,5μl

- Το διάλυμα αντίδρασης τοποθετήθηκε στο μηχάνημα PCR στο παρακάτω πρόγραμμα:

- 20 °C, 10 λεπτά
- 42 °C, 45 λεπτά
- 99 °C, 3 λεπτά
- 18 °C, 5 λεπτά
- τελική θερμοκρασία: 4 °C

Για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων και επιβεβαίωση της σύνθεσης cDNA με τη χρήση των random primers, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην συγκεκριμένη περίπτωση, ως μετάγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιήθηκε το mRNA του γονιδίου GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

Το διάλυμα αντίδρασης για την ανίχνευση του γονιδίου GAPDH περιείχε:

|                                  |      |    |
|----------------------------------|------|----|
| ○ cDNA                           | 3    | μl |
| ○ Εκκινητής Forward ( 500 pmol)  | 1    | μl |
| ○ Εκκινητής Reverse (500 pmol)   | 1    | μl |
| ○ Master Mix(Dream Taq Green MM) | 12,5 | μl |
| ○ δις απεσταγμένο νερό           | 7,5  | μl |

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

- 95°C για 10 min.
- 45 κύκλοι:
  - -αποδιάταξη στους 95°C για 15sec
  - -υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60°C για 60 sec
  - -επιμήκυνση στους 72 °C για 30sec
- 72 °C για 10min.

Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, για τον έλεγχο της παρουσίας ή όχι του τμήματος που ενισχύθηκε πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% με μάρτυρα προτύπων μοριακών βαρών 100 bp (Fermentas).

## B.6. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR)

Η ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της φθορίζουσας ουσίας SYBR Green. Η SYBR Green έχει την ιδιότητα να συνδέεται σε δίκλιωνα μόρια DNA, ενισχύοντας τον φθορισμό της και επιτρέποντας στο σύστημα καταγραφής την ανίχνευση των επιθυμητών προϊόντων. Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων και την επακόλουθη ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας το γονίδιο GAPDH ενώ για το miR-150-5p χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο U6.

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

|                     |        |
|---------------------|--------|
| cDNA:               | 2.5 μl |
| SYBR Green:         | 7,5 μl |
| Εκκινητής reverse:  | 0.5 μl |
| Εκκινητής forward:  | 0.5 μl |
| ddH <sub>2</sub> O: | 4 μl   |

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

- 50°C για 2 λεπτά
- 95°C για 2 λεπτά
- 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε δύο στάδια:
  - αποδιάταξη στους 95°C για 15''
  - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών και επιμήκυνση στους 60°C για 1 λεπτό

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μηχανήμα ABI7300 και η ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση του λογισμικού 7300 system SDS. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων σχεδιάστηκαν με το Primer3 Input (version 0.4.0) και οι αλληλουχίες τους παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

**Πίνακας 1:** Εκκινητές γονιδίων ( Αλληλουχία Forward και Reverse).

| Γονίδιο           | Αλληλουχία Forward εκκινητή | Αλληλουχία Reverse εκκινητή |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>β-κατενίνη</b> | TCATGCGTTCTCCTCAGATG        | AATCCACTGGTGAACCAAGC        |
| <b>miR-150-5p</b> | GCTCTCCCAACCCTTGTACC        | CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT       |
| <b>NEAT-1</b>     | TTACCAGCTTCCTCCTGGTG        | TCTGCTGCGTATGCAAGTCT        |
| <b>MMP-13</b>     | TGGCATTGCTGACATCATGA        | GCCAGAGGGCCCATCAA           |
| <b>MMP-14</b>     | GAGCTCAGGGCAGTGGATAG        | GGTAGCCCGGTTCTACCTTC        |
| <b>MMP-9</b>      | TTGACAGCGACAAGAAGTGG        | GCCATTCACGTCGTCCTTAT        |
| <b>ADAMTS-5</b>   | CAGCAGTGCAACCTGACATT        | CAGATTCTCCCCTTTCCACA        |
| <b>U6</b>         | GCTTCGGCAGCACATATACTAAAT    | CTCACACCGTGTTCGTTCCA        |
| <b>GAPDH</b>      | GAGTCAACGGATTTGGTCGT        | GACAAGCTTCCCGTTCTCAG        |

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης έγινε με την συγκριτική CT μέθοδο (comparative CT method) που βασίζεται στους παρακάτω αριθμητικούς τύπους.

- **ΔCt:** η διαφορά του Ct του υπό μελέτη γονιδίου από το Ct του γονιδίου αναφοράς ( $\Delta Ct = Ct_{\text{gene x}} - Ct_{\text{housekeeping gene}}$ )
- **ΔΔCt:** η διαφορά του ΔCt του δείγματος από το ΔCt του δείγματος αναφοράς ( $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{Calibrator}}$ )
- **RQ=2<sup>-ΔΔCt</sup>** όπου RQ: Η σχετική ποσοτικοποίηση

Εξ' ορισμού, για το δείγμα αναφοράς ισχύει ότι  $2^{-\Delta \Delta Ct} = 2^0 = 1$ , οπότε η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου-στόχου στο δείγμα αναφοράς σε σχέση με τον εαυτό του ισούται με 1. Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα δείχνουν πόσες φορές είναι αυξημένη ή μειωμένη η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-στόχου, στα δείγματα αυτά, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Για την ποσοτικοποίηση και σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν στα φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα ως δείγμα αναφοράς (calibrator) χρησιμοποιήθηκε ένα φυσιολογικό δείγμα, και συγκεκριμένα το δείγμα που είχε το μεγαλύτερο ΔCt άρα και την μικρότερη έκφραση. Για την σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων μετά τη χορήγηση ουσιών, ως δείγμα αναφοράς (calibrator) χρησιμοποιήθηκε το δείγμα negative control.

## **B.7. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blotting)**

### B.7.1. Απομόνωση κυτταρικού εκχυλίσματος από χονδροκύτταρα

- Αποκόλληση των κυττάρων με την προσθήκη ενός 1ml θρυψίνης και επώαση για 2-3 λεπτά στον κλίβανο
- Προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα, μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας σε πλαστικό σωληνάριο και φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1500 στροφές για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου, επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS και επανάληψη της φυγοκέντρησης στις ίδιες συνθήκες
- Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 100 μl διάλυμα λύσης εμπλουτισμένο με αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών
- Επαναδιάλυση του ιζήματος και διατήρηση της πρωτεΐνης στον πάγο για 40 λεπτά με ανάδευση σε vortex κάθε 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 15 λεπτά, μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούριο erpendorf και αποθήκευση στους -20 οC

### B.7.2. Φωτομέτρηση πρωτεϊνών

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το φθορόμετρο Qubit. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Προετοιμασία του μείγματος working solution για τον απαιτούμενο αριθμό δειγμάτων και προτύπων(standards). Το working solution αποτελείται από Qubit Reagent και Qubit buffer σε αναλογία 1:200
- Σε κάθε standard γίνεται προθήκη 190μl working solution και 10μl standard
- Για κάθε δείγμα προσθέτω σε νέο Eppendorf 198μl working solution και 2μl πρωτεΐνη
- Στο μηχάνημα Qubic τοποθετούνται πρώτα το mix του πρώτου standard, ακολουθεί μέτρηση της συγκέντρωσης και η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τα mix του δευτέρου και τρίτου standard προκειμένου να δημιουργηθεί η πρότυπη καμπύλη
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τα υπόλοιπα δείγματα

### B.7.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου –SDS

- Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα προετοιμάζονται με την προσθήκη διαλύματος χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης και αναγωγικού διαλύματος.
- Ακολουθεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών με θέρμανση σε μηχανήμα PCR.
- Στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer). Στην αριστερή άκρη της πηκτής φορτώνεται μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών
- Ακολουθεί διαχωρισμών των πρωτεϊνών σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Στη διάρκεια αυτή προετοιμάζονται τα διαλύματα και τα υλικά για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

### B.7.4. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Μετά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών απομακρύνεται η πηκτή από τη θήκη της προσεκτικά και ακολουθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη εφαρμόζοντας το κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο. Αναλυτικότερα:

Επώαση των παρακάτω στο διάλυμα μεταφοράς

- Φύλο μεμβράνης PVDF
- χαρτί Whitman
- πηκτή
- Κατασκευάζεται στιβάδα με: χαρτί Whitman → πηκτή → μεμβράνη → χαρτί Whitman
- Τοποθέτηση της στιβάδας στην κατάλληλη συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών
- Ακολουθεί μεταφορά για 45 min
- Αφού τελειώσει η μεταφορά των περιεχομένων της πηκτής στη μεμβράνη, αφαίρεση της μεμβράνης και χρώση μέχρι να εμφανιστούν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα, για να διαπιστωθεί η ισοφόρτωση των δειγμάτων και η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη.
- Επώαση της μεμβράνη σε διάλυμα πλύσης για 10 λεπτά
- Επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα κορεσμού για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος
- Αμέσως μετά η μεμβράνη επώαζεται για 16-18h με το εκάστοτε πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση

- Απομάκρυνση του πρώτου αντισώματος και έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης
- Επώαση της μεμβράνης με δεύτερο αντίσωμα
- Απομάκρυνση του δεύτερου αντισώματος [δευτερο αντίσωμα σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP) και έκπλυση με διάλυμα πλύσης

#### B.7.5. Ανίχνευση σήματος με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαζεται σε διάλυμα λουμινόλης, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και κουμαρικού οξέος. 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. Η ανίχνευση του σήματος έγινε σε ειδικό μηχάνημα και ακολούθησε ποσοτικοποίηση της έκφρασης με τη χρήση του Image J.

#### **B.8. Ανεύρεση γονιδίων-στόχων του miR-150-5p, ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (GO enrichment analysis) και σηματοδοτικών μονοπατιών (KEGG analyze) αυτών με προγράμματα βιοπληροφορικής**

Για την εύρεση των γονιδίων-στόχων του miR-150-5p χρησιμοποιήθηκαν το υπολογιστικό πρόγραμμα TargetScan. Η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (GO enrichment analysis) και η εύρεση των σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν τα γονίδια-στόχοι του miR-150-5p έγινε με τη χρήση της βάσεως δεδομένων Enrichr.

#### **B.9. Στατιστική ανάλυση**

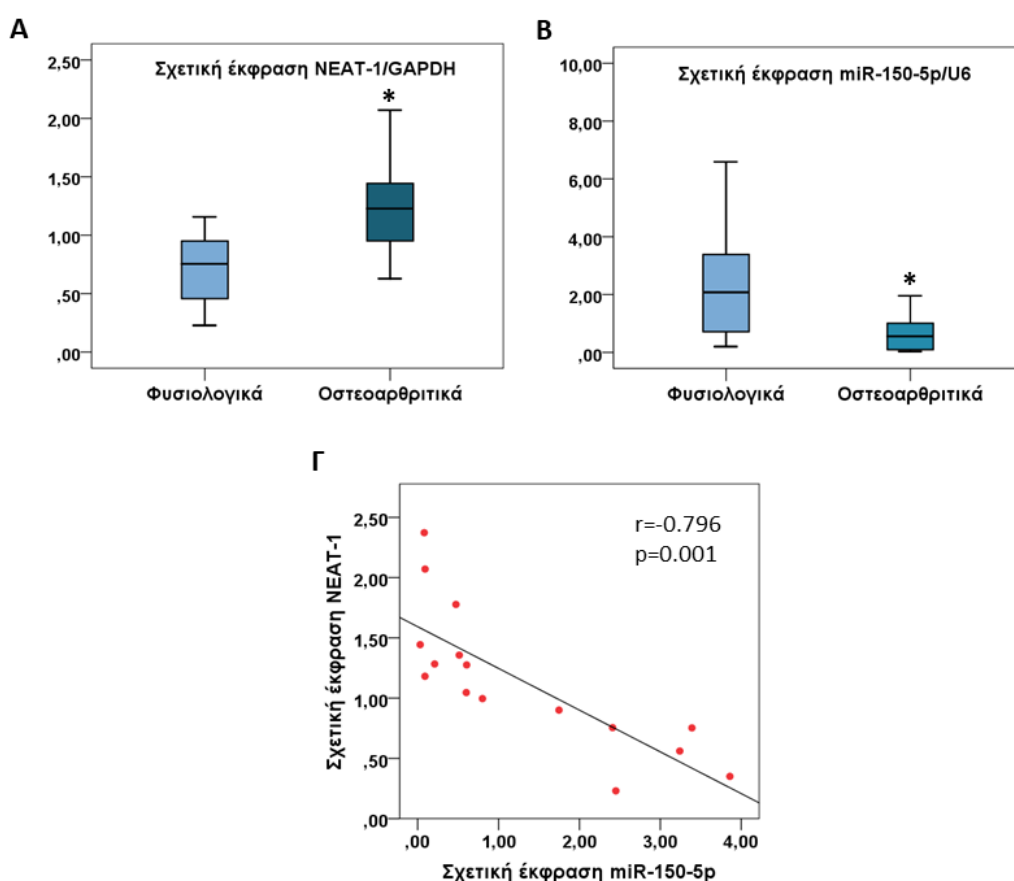
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 21 και αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες independent-samples T test, Mann-Whitney U test, paired-samples T test και Pearson correlation. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή  $p < 0.05$ .



## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Γ.1. Έκφραση NEAT-1 και miR-150-5p σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα.

Αρχικά προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του NEAT-1 και του miR-150-5p σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα με την μέθοδο qRT-PCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του NEAT-1 στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά (Εικόνα 9 Α). Αντίθετα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ( $p < 0.05$ ) μείωση στα επίπεδα έκφρασης του miR-150-5p σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά (Εικόνα 9 Β). Η δημιουργία διαγράμματος διασποράς έδειξε πως υπάρχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ των επιπέδων του NEAT-1 και του miR-150-5p και συγκεκριμένα ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson ( $r$ ) έδειξε ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών, καθώς όσο αυξάνεται η έκφραση του NEAT-1 μειώνεται η έκφραση του miR-150-5p ( $r = -0.796$ ,  $p = 0.001$ ) (Εικόνα 9 Γ).



**Εικόνα 9: Α, Β.** Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του NEAT-1 και του miR-150-5p σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Τα επίπεδα mRNA του

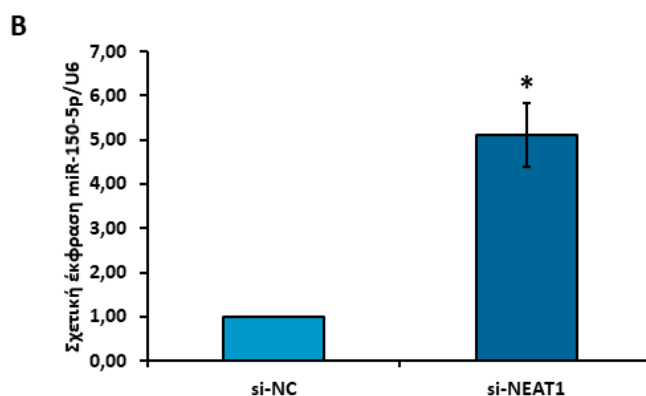
γονιδίου *NEAT-1* και είναι ποσοτικοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του *miR-150-5p* είναι ποσοτικοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς *U6*. \* $p < 0.05$ . Γ. Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει την αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του *NEAT1* και *miR-150-5p*.

## Γ.2. Αλληλεπίδραση του *NEAT-1* με το *miR-150-5p* στα χονδροκύτταρα.

Καθώς παρατηρήθηκε η ύπαρξη αρνητικής συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του *NEAT-1* και του *miR-150-5p*, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση με την χρήση του υπολογιστικού προγράμματος starBase (<http://starbase.sysu.edu.cn/>), για να ερευνηθεί αν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του *NEAT-1* και του *miR-150-5p*. Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης έδειξαν ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του *NEAT-1* και του *miR-150-5p* όπως φαίνεται στην εικόνα 10 Α. Για την επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων σε κυτταρικό επίπεδο, πραγματοποιήθηκε αναστολή της έκφρασης του *NEAT1* με χρήση κατάλληλου siRNA σε ΟΑ χονδροκύτταρα και ακολούθησε ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του *miR-150-5p*. Τα αποτελέσματα της qRT-PCR έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του *miR-150-5p* μετά τη χορήγηση του si-*NEAT1* στα ΟΑ χονδροκύτταρα, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης (Εικόνα 10 Β).

**A**

| miRNA ↓        | GeneName       | TargetSite ↑↓                | Alignment ↑↓   | Class | AgoExpNum  |
|----------------|----------------|------------------------------|--|-------|------------|
| hsa-miR-150-5p | <b>NEAT1</b> ↑ | chr11:65206896-65206917[+] ↑ | Target: 5' guaucccagcacuUUGGGAGa 3' ↑<br><div style="text-align: center;">       </div> miRNA : 3' gugaccauguucccAACCCUCu 5' | 8mer  | <b>7</b> ↑ |



**Εικόνα 10: Α.** Απεικόνιση της θέσης αλληλεπίδρασης του NEAT1 με το miR-150-5p βάσει του υπολογιστικού προγράμματος starBase. **Β.** Έκφραση του miR-150-5p μετά από χορήγηση siRNA Negative Control (si-NC) και si-NEAT1 σε OA χονδροκύτταρα. \* $p < 0.05$ .

### Γ.3. Προσδιορισμός γονιδίων-στόχων του miR-150-5p με εργαλεία βιοπληροφορικής.

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα έκφρασης του miR-150-5p που έδειξαν διαφοροποιημένα επίπεδα του μορίου μεταξύ OA και φυσιολογικών χονδροκυττάρων, στο επόμενο βήμα της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των γονιδίων-στόχων του miR-150-5p με τη χρήση του αλγορίθμου πρόβλεψης TargetScan. Τα αποτελέσματα έδειξαν 357 γονίδια ως πιθανούς στόχους του miR-150-5p, μεταξύ των οποίων και γονίδια που ανέχονται στην παθολογία της OA (CTNNB1, SP1 MMP-14, και FTO) (Πίνακας 2).

|         |             |         |          |              |            |            |          |         |
|---------|-------------|---------|----------|--------------|------------|------------|----------|---------|
| MYB     | SGMS1       | PPP2CB  | NEFM     | FAM134C      | VPS53      | <b>SP1</b> | PFN2     | PTPRB   |
| MDM4    | PSEN1       | ZSCAN29 | FOXP1    | TBC1D20      | PEG10      | NXPH3      | CAPN6    | GID4    |
| ENSA    | UBR1        | ZSWIM6  | SRGAP3   | SOGA3        | HNRNPH3    | DSEL       | PAFAH1B1 | SMU1    |
| ADIPOR2 | SPARC       | VMP1    | PPP2R4   | MDGA1        | DGKI       | IGFBPL1    | REPS2    | CBX8    |
| HILPDA  | EIF4B       | CELF3   | CSNK1A1  | CACNA1G      | PAX5       | DUSP13     | TESK2    | BCL9L   |
| TADA1   | ITIH6       | GABRA4  | B3GNT1   | CAMK2G       | CHD2       | IGF2BP1    | SEMA6D   | STEAP3  |
| MTCH2   | ETF1        | HIF0    | LMO4     | <b>MMP14</b> | KLHL3      | ZBTB7C     | TRMT1L   | ST3GAL6 |
| DCAF6   | PRICKLE2    | SLC30A5 | EPHB2    | FAM47E       | CXorf23    | VSIG10     | IRF2BP2  | FIGN    |
| ELOVL3  | TAF5L       | FDXR    | RSPH10B  | RASGEF1A     | EXO5       | TANGO2     | FOSL2    | SCN3B   |
| WTAP    | PKP4        | TMEM41A | NOVA2    | APC          | AGO1       | FZD4       | RIMKLA   | PDHA1   |
| CMTM6   | PDE7A       | CDAN1   | CERS3    | GABRG2       | E2F3       | SH3BP5L    | GLIS3    | HNRNPU  |
| MBD6    | STX5        | RNF121  | NEGR1    | ZNF226       | CC2D1B     | ELMSAN1    | RCSL1    | PARVA   |
| BASP1   | GCM2        | SCP2    | UST      | PIK3AP1      | KCNB1      | DRG1       | FAHD2A   | CNNM2   |
| SKP1    | PDCD4       | FOXO4   | JPH2     | MUC21        | SRCIN1     | CCND2      | RSBN1L   | ADARB1  |
| CCNT1   | RP6-24A23.6 | C9orf9  | USP49    | NFASC        | GPR75      | CPEB4      | EDA      | ERP44   |
| ZBTB4   | ELOVL1      | UBE2R2  | ATP8A2   | MPP6         | AGO3       | MYO1C      | PA2G4    | PLXNB1  |
| CNPPD1  | ONECUT2     | DYRK1A  | ITGB3    | GPAM         | NR1D2      | PRKCA      | PLXNC1   | CEP128  |
| ZCCHC17 | CALCR       | TRIM66  | RSPH10B2 | ADAM19       | ACTR1A     | TRPS1      | MAP1B    | CNIH1   |
| RNF207  | <b>FTO</b>  | ACTR1B  | ZBTB7A   | UBFD1        | METAP1D    | CTDSP2     | MRV11    | RAB11A  |
| ZMAT2   | NDC1        | PALD1   | PRR3     | SUV39H2      | DST        | NBEA       | CEP85    | DENND4A |
| PLP2    | PCP4L1      | PTGFR   | TMCC1    | EIF4E        | AC027763.2 | PURA       | TCTE1    | TENM4   |
| STAT1   | ZEB1        | RAB9A   | RAD23B   | GAB1         | SEPHS1     | CAPZB      | NLGN3    | SEC31B  |
| TP53    | METAP1      | TPM3    | MARCH6   | CYB561D1     | PRPS1      | ROCK1      | MAP3K3   | AHSA2   |
| CAST    | C3orf72     | HMGA2   | PAPD5    | TET3         | ENTPD1     | RNASEH2C   | SLC16A2  | CFL2    |

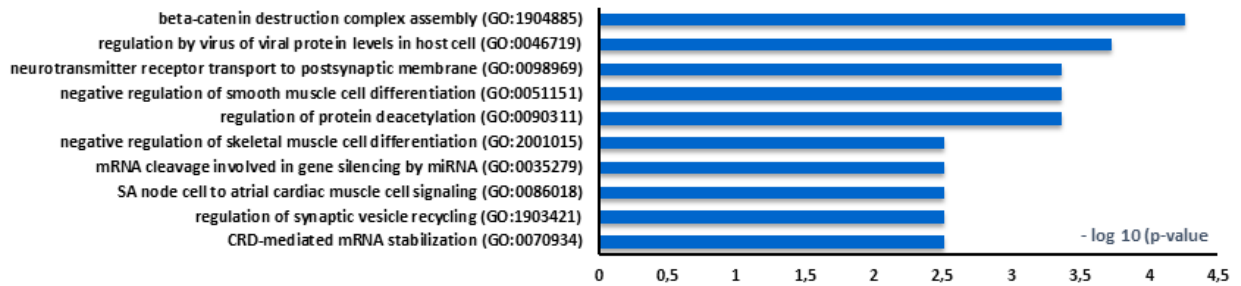
|         |               |          |         |         |         |         |          |         |
|---------|---------------|----------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|
| SHISA4  | RPP14         | AZIN1    | KCTD9   | DKK3    | MTMR9   | NFATC3  | NUP98    | GATA6   |
| OSBPL9  | ACVR1B        | RAD51    | TMEM164 | ANGEL1  | TLR5    | CDK13   | CNTROB   | ZNF574  |
| GRIPAP1 | TMEM55A       | MLXIP    | CPD     | USP13   | RNF32   | GLG1    | BRD1     | UAP1    |
| FOXD3   | ACO1          | PRKAR1A  | EBF3    | AKIRIN1 | PHB2    | POM121C | RSF1     | PARL    |
| ZFP91   | PCNP          | KIAA0087 | SMARCD1 | GTF3C2  | WNT2B   | AKT3    | IPO9     | HIF1A   |
| NKX2-4  | CLCN6         | C6orf120 | TSPYL5  | PKHD1   | PRRT2   | CDK5R1  | CCDC174  | TMEM134 |
| TEK     | DYNLT1        | GRHL2    | STX3    | GAN     | KCNN3   | BTBD9   | C17orf82 | SBF1    |
| AIFM2   | <b>CTNNB1</b> | STYXL1   | PIK3CB  | TMEM107 | ONECUT3 | FBXW11  | MAP3K12  | FNDC5   |
| EGR2    | SZRD1         | MBTD1    | WDR5B   | ZNF189  | BSN     | FAM117B | ACBD3    | GHSR    |
| LRRC58  | ARIH2         | MYOCD    | FAM49A  | ZC3H10  | ANKRD52 | RIMS2   | NCS1     | CYTIP   |
| NR2F2   | ZNF317        | EP300    | DYNLL2  | CALU    | FBLN7   | UPF1    | CDC73    | ZBTB20  |
| PTP4A1  | TCF23         | CBL      | RC3H1   | MGA     | ZNF322  | NOTCH3  | UBE2E3   | CISD3   |
| ACTRT3  | GGNBP2        | RORB     | ITSN1   | LIX1L   | ARNTL2  | PAN2    | NDOR1    |         |
| HSP90B1 | PDIA6         | FAM179B  | PSMD11  | PCDH1   | NFIC    | ABI2    | GSK3B    |         |
| PIGG    | LETMD1        | N4BP2L1  | GDI1    | PAPPA   | SPRED3  | MAP2K6  | IL1RAPL1 |         |
| KCNIP1  | CSF3          | GOSR1    | AEBP2   | ZNF865  | MMP16   | COL4A4  | PTBP2    |         |

*Πίνακας 2: Γονίδια-στόχοι του miR-150-5p όπως αυτά προέκυψαν από τη χρήση του αλγορίθμου πρόβλεψης TargetScan.*

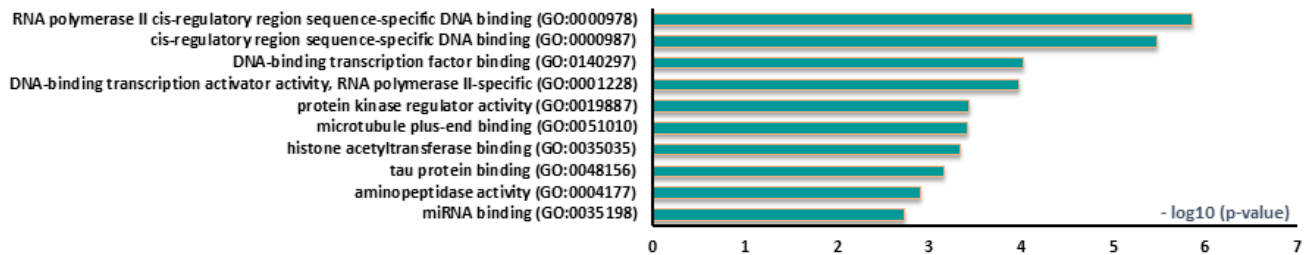
#### **Γ.4. Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας [GO enrichment analysis] και σηματοδοτικών μονοπατιών των γονιδίων-στόχων του miR-150-5p.**

Στην συνέχεια ακολούθησε ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (GO enrichment analysis) ώστε να βρεθεί για τα παραπάνω γονίδια-στόχους του miR-150-5p σε ποιες κυτταρικές και μοριακές λειτουργίες συμμετέχουν και τι κυτταρικά συστατικά αποτελούν οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε KEGG analyze για την εύρεση και των σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν τα συγκεκριμένα γονίδια στόχοι. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της γονιδιακής οντολογίας έδειξαν πως τα γονίδια-στόχοι του miR-150-5p συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες που ρυθμίζουν τη δημιουργία του συμπλόκου της β-κατενίνης, την ακετυλίωση των πρωτεϊνών αλλά και τη δράση των microRNAs. Επίσης μπορούν να δρουν ως ρυθμιστές της μεταγραφικής διαδικασίας ενώ εντοπίζονται κατά κύριο ρόλο σε ενδοκυτταρικά οργάνδια αλλά και στον πυρήνα (Εικόνα 11).

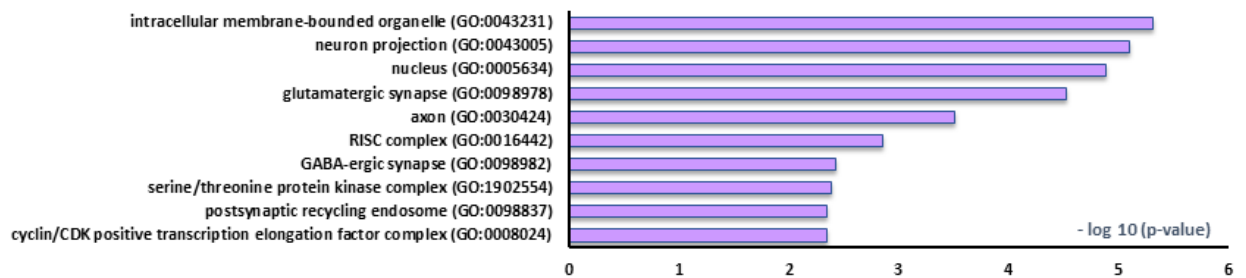
### Top 10 GO Biological Processes



### Top 10 Molecular Functions

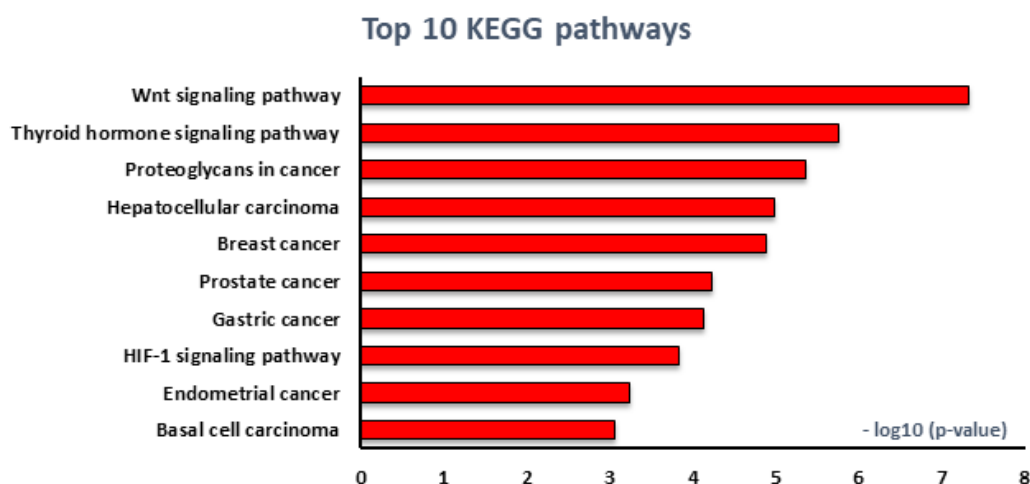


### Top 10 Cellular Components



**Εικόνα 11:** Οργάνωση των γονιδίων-στόχων του *miR-150-5p* σε τρεις ιεραρχικές κατηγορίες (*Biological Processes*, *Cellular Components*, *Molecular Functions*) μετά από ανάλυση γονιδιακής οντολογίας [*GO enrichment analysis*] με τη χρήση του εργαλείου *Enrichr*.

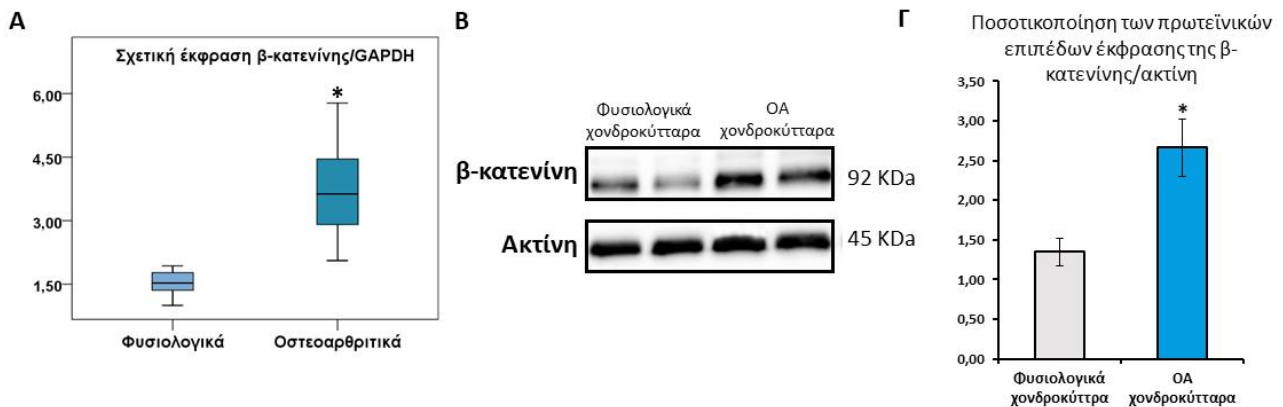
Παράλληλα πραγματοποιήθηκε KEGG ανάλυση για την εύρεση και των σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν τα συγκεκριμένα γονίδια-στόχοι του *miR-150-5p*. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 12 μεταξύ των κύριων σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν τα γονίδια-στόχοι του *miR-150-5p* είναι το Wnt μονοπάτι, η απορύθμιση του οποίου παίζει καίριο ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της ΟΑ.



*Εικόνα 12: Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια-στόχοι του miR-150-5p σύμφωνα με την KEGG ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εργαλείου Enrichr.*

### **Γ.5. Έκφραση της β-κατενίνης σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα.**

Ένα από τα γονίδια-στόχους του miR-150-5p που αποκάλυψε η βιοπληροφορική ανάλυση και συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt είναι η β-κατενίνη. Δεδομένης της εμπλοκής της β-κατενίνης στην ενίσχυση της καταβολικής δράσης των χονδροκυττάρων (Parathanasiou 2012), ακολούθησαν πειραματικές διαδικασίες ώστε να επιβεβαιωθεί η ρύθμιση της έκφρασης της από το miR-150-5p σε κυτταρικό επίπεδο. Αρχικά προσδιορίστηκαν τα επίπεδα μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης της β-κατενίνης σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα μέσω qRT-PCR και Western blot, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τόσο τα επίπεδα mRNA του γονιδίου της β-κατενίνης όσο και τα πρωτεϊνικά επίπεδα ήταν σημαντικά αυξημένα στα ΟΑ χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ( $p < 0.05$ ) (Εικόνα 13).

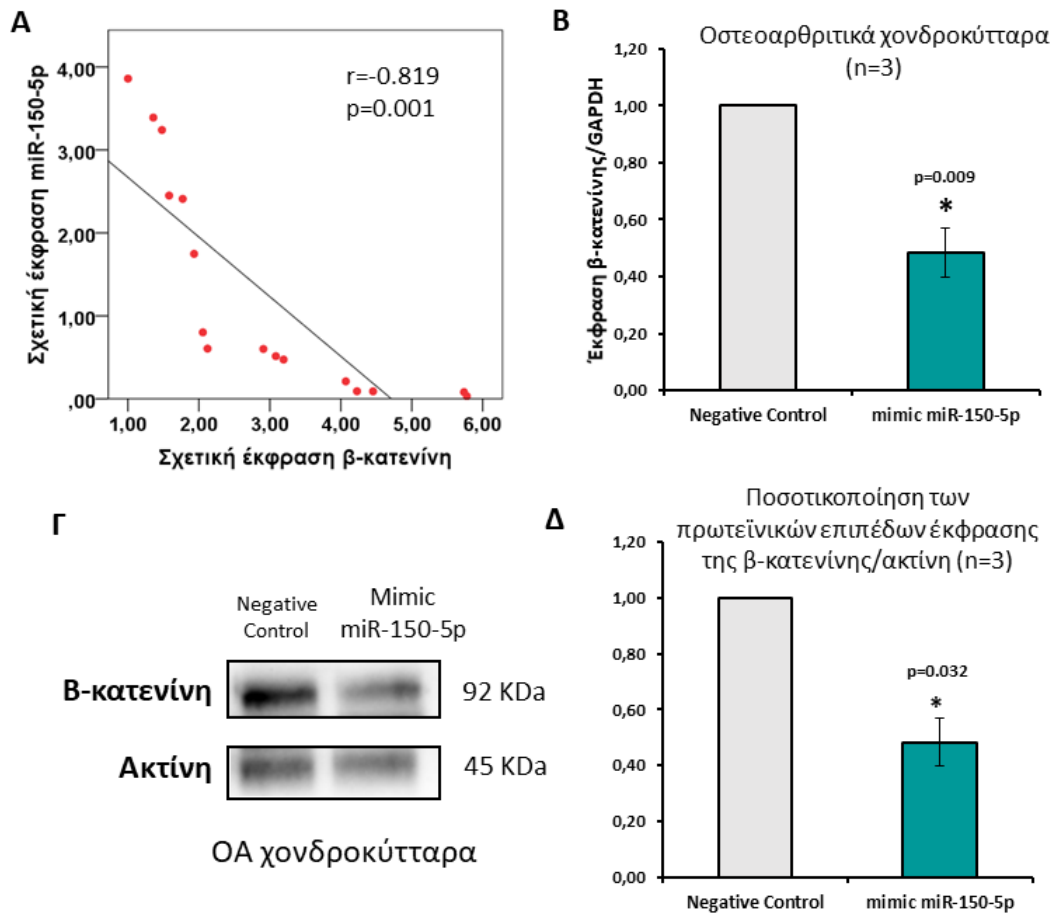


**Εικόνα 13:** Α. Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης της β-κατενίνης σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της β-κατενίνης έγινε ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. \* $p < 0.05$ . Β. Αντιπροσωπευτικό western blot της έκφρασης της β-κατενίνης σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα. Γ. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της β-κατενίνης σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα. Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. \* $p < 0.05$ .

#### Γ.6. Ρύθμιση της έκφρασης της β-κατενίνης από το miR-150-5p στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης του miR-150-5p με αυτά της β-κατενίνης (mRNA). Η δημιουργία διαγράμματος διασποράς έδειξε πως υπάρχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του miR-150-5p και των mRNA επιπέδων της β-κατενίνης και συγκεκριμένα ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson ( $r$ ) έδειξε ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών, καθώς όσο μειώνεται η έκφραση του miR-150-5p αυξάνεται η έκφραση της β-κατενίνης ( $r = -0.819$ ,  $p = 0.001$ ) (Εικόνα 14 Α). Δεδομένου ότι στην ΟΑ παρατηρείται μείωση των επιπέδων του miR-150-5p και αύξηση των επιπέδων της β-κατενίνης, ακολούθησε η χορήγηση mimic miR-150-5p σε ΟΑ χονδροκύτταρα και προσδιορισμός της έκφρασης της β-κατενίνης ώστε να επιβεβαιωθεί σε κυτταρικό επίπεδο η αλληλεπίδραση τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τόσο τα επίπεδα mRNA του γονιδίου της β-κατενίνης όσο και τα πρωτεϊνικά επίπεδα μειώθηκαν μετά τη χορήγηση mimic miR-150-5p σε ΟΑ χονδροκύτταρα

( $p < 0.05$ ) (Εικόνα Β-Δ), αναδεικνύοντας το ρυθμιστικό ρόλο του miR-150-5p στην έκφραση της β-κατενίνης.

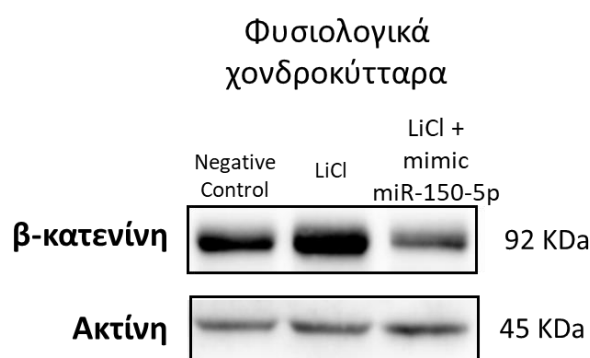


**Εικόνα 14:** **Α.** Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει την αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του miR-150-5p και β-κατενίνης. **Β.** Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης της β-κατενίνης μετά από χορήγηση negative control και mimic miR-150-5p σε OA χονδροκύτταρα. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της β-κατενίνης έγινε ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. **Γ.** Αντιπροσωπευτικό western blot της έκφρασης της β-κατενίνης μετά από χορήγηση negative control και mimic miR-150-5p σε OA χονδροκύτταρα. **Δ.** Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της β-κατενίνης μετά από χορήγηση negative control και mimic miR-150-5p σε OA χονδροκύτταρα.. Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.



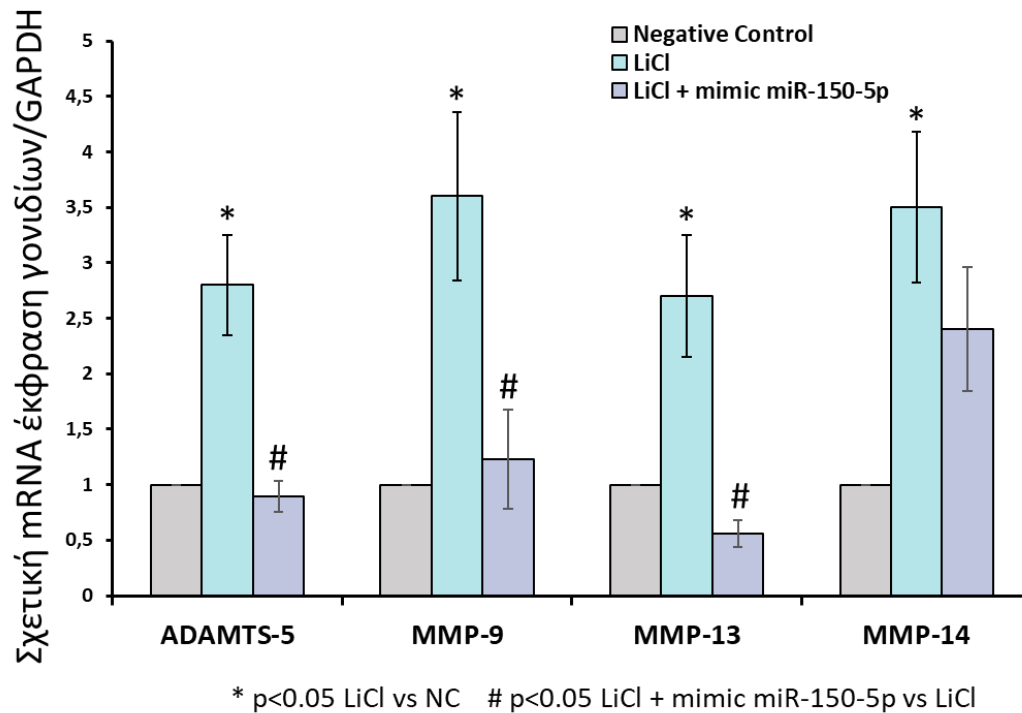
### Γ.7. Το miR-150-5p συμμετέχει στην καταβολική δράση των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων μέσω της ρύθμισης της β-κατενίνης.

Στην συνέχεια, για να διαπιστωθεί αν το miR-150-5p μέσω της ρύθμισης της β-κατενίνης επηρεάζει την έκφραση καταβολικών ενζύμων που ρυθμίζονται από το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη και ταυτόχρονα συμμετέχουν στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου, πραγματοποιήθηκε επαγωγή του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα με τη χορήγηση LiCl και συνχορήγηση LiCl με mimic miR-150-5p. Αρχικά, επιβεβαιώθηκε η ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνη μετά τη χορήγηση LiCl καθώς παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-κατενίνης, τα οποία ακολούθως μειώθηκαν με τη χορήγηση του mimic miR-150-5p.



**Εικόνα 15:** Αντιπροσωπευτικό western blot της έκφρασης της β-κατενίνης μετά από χορήγηση negative control, LiCl ή LiCl + mimic miR-150-5p σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

Μεσώ της μεθόδου qRT-PCR ακολούθως πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε μεταγραφικό επίπεδο των γονιδίων-στόχων της σηματοδοτικής οδού Wnt /β-κατενίνη μετά την επίδραση με LiCl ή LiCl και mimic miR-150-5p. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση της μεταγραφικής έκφρασης των ADAMTS-5, MMP-9, MMP-13 και MMP-14 μετά την χορήγηση LiCl λόγω ενεργοποίησης του μονοπατιού Wnt /β-κατενίνη, ενώ η χορήγηση του mimic miR-150-5p αντέστρεψε την αύξηση της έκφρασης των ανωτέρω καταβολικών ενζύμων, αναδεικνύοντας τον καταβολικό ρόλο του miR-150-5p στην OA μέσω της ρύθμισης της β-κατενίνης.



**Εικόνα 16:** Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των *ADAMTS-5*, *MMP-9*, *MMP-13*, *MMP-14* σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα χορήγηση *negative control*, *LiCl* ή *LiCl + mimic miR-150-5p* σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων *mRNA* των γονιδίων έγινε ως προς το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*. \* $p < 0.05$ .

## Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η (ΟΑ) είναι η πιο κοινή ασθένεια των αρθρώσεων με την αιτιοπαθογένεια της να μην είναι ακόμη πλήρως κατανοητή λόγω της πολύπλοκης αιτιολογίας της. Προκαλεί βλάβη και απώλεια του αρθρικού χόνδρου, αναδιαμόρφωση του υποχόνδριου οστού, σχηματισμό οστεοφύτων, χαλάρωση των συνδέσμων και αποδυνάμωση των αρθρικών μυών (Rim 2020, Litwic 2013). Αποτελεί μια ασθένεια με σημαντικές επιπτώσεις τόσο σε ατομικό όσο και σε συλλογικό επίπεδο καθώς αν και η εξέλιξη της νόσου είναι συνήθως αργή, σταδιακά υποβαθμίζει την ποιότητα ζωής των ασθενών (Rim 2020, Van Spil 2019, Litwic 2013). Λόγω της συνεχώς αυξανόμενης γήρανσης του πληθυσμού, της αύξησης του αριθμού των παχύσαρκων ατόμων αλλά και την αλλαγή του τρόπου ζωής του πληθυσμού, ο επιπολασμός της ΟΑ αναμένεται να αυξηθεί περαιτέρω (Van Spil 2019). Οι υπάρχουσες θεραπευτικές επιλογές περιορίζονται στην ανακούφιση των συμπτωμάτων ή στη χειρουργική αντικατάσταση των προσβεβλημένων αρθρώσεων, χωρίς να μπορούν να αντιστρέψουν ή να περιορίσουν τον παθολογικό φαινότυπο (Endisha 2021, Van Spil 2019, Troeberg 2012).

Η καταστροφή του αρθρικού χόνδρου αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό της νόσου και προκαλείται από ένα συνδυασμό μηχανικών και μοριακών μηχανισμών που οδηγούν σε προοδευτική απώλεια του ως αποτέλεσμα μιας ανισορροπίας μεταξύ της σύνθεσης και της αποδόμησης των συστατικών της ECM (Endisha 2021, Litwic 2013, Troeberg 2021). Η ενισχυμένη καταβολική δράση των χονδροκυττάρων και η αλλαγή του φαινοτύπου τους σε υπερτροφικά, η φλεγμονή και η διαταραχή της διαδικασίας της αυτοφαγίας είναι κάποιοι από τους μηχανισμούς που συμβάλλουν στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου (Endisha 2021). Καταλυτικό ρόλο στη ρύθμιση των ανωτέρω μηχανισμών διαδραματίζουν πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών, μεταξύ των οποίων και το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -κατενίνη, αλλά και επιγενετικοί μηχανισμοί, όπως η δράση των miRNAs και lncRNAs (Wang 2019, Khan 2018). Μελέτες έχουν αναδείξει πως η απορρύθμιση της δράσης σηματοδοτικών μονοπατιών και επιγενετικών μηχανισμών που ενέχονται στις παραπάνω διαδικασίες αποτελούν μοριακούς μηχανισμούς που συμβάλλουν στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου (Wang 2019, Khan 2018).

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της αλληλεπίδρασης του NEAT-1 με το miR-150-5p και η διερεύνηση του ρόλου του miR-150-5p μέσω της

επιγενετικής ρύθμιση της έκφρασης της β-κατενίνης, στην επαγωγή της σύνθεσης καταβολικών ενζύμων που ευθύνονται για την αποδόμηση του χόνδρου στην ΟΑ. Ένα lncRNA μπορεί να αλληλεπιδράσει με το miRNA και να δράσει ως ανταγωνιστικό ενδογενές RNA (ceRNA), μειώνοντας την έκφραση του miRNA και κατ' επέκταση επηρεάζοντας την έκφραση των γονιδίων-στόχων του miRNA (Klec 2019). Τα αποτελέσματα μας έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του NEAT-1 στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά, ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του miR-150-5p σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, επιβεβαιώνοντας και τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών (Xiao 2021, Zhang 2019, Liu 2020). Περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων έδειξε την ύπαρξη αρνητικής συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης του NEAT-1 και miR-150-5p, όπου η αύξηση της έκφρασης του NEAT-1 προκαλεί αντίστοιχη μείωση της έκφρασης του miR-150-5p. Η επακόλουθη βιοπληροφορική ανάλυση ανέδειξε την αλληλεπίδραση του NEAT-1 και του miR-150-5p η οποία επιβεβαιώθηκε και σε κυτταρικό επίπεδο καθώς η αποσιώπηση της έκφρασης του NEAT-1 στα ΟΑ χονδροκύτταρα επέφερε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του miR-150-5p. Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν το NEAT-1 ως έναν ρυθμιστικό παράγοντα της έκφρασης του miR-150-5p στα ΟΑ χονδροκύτταρα δρώντας ως ceRNA. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση του NEAT-1 με διαφορετικά miRNAs έχει ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της ΟΑ (Xiao 2021, Liu 2020).

Τα miRNAs έχουν καίριο ρόλο στην παθοφυσιολογία της ΟΑ και παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης σε ασθενείς σε σύγκριση με υγιή άτομα. Ένα πλήθος μελετών είχε εντοπίσει κρίσιμους ρόλους των miRNAs στη χονδρογένεση, τη ρύθμιση ECM, την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και άλλες βιολογικές διεργασίες που διέπουν τη φυσιολογική λειτουργία των αρθρώσεων και διατηρούν την ομοιόσταση (Endisha 2021). Το miR-150-5p είναι ένα από τα miRNAs που έχει προταθεί ότι παίζει ρόλο στην παθογένεια της ΟΑ, αν και ο ακριβής ρόλος του στην ανάπτυξη της νόσου παραμένει ακόμα ασαφής (Wang 2020, Zhang 2019). Για τον λόγο αυτό και με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα μας που έδειξαν την διαφοροποιημένη έκφραση του miR-150-5p στην ΟΑ, προσδιορίστηκαν τα γονίδια στόχοι του, με τη χρήση του αλγορίθμου πρόβλεψης TargetScan. Συνολικά 357 γονίδια αναφέρονται ως στόχοι του miR-150-5p, στα οποία συμπεριλαμβάνεται και το γονίδιο

της β-κατενίνης. Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (GO enrichment analysis) έδειξε πως τα γονίδια-στόχοι του miR-150-5p συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες που ρυθμίζουν τη δημιουργία του συμπλόκου της β-κατενίνης, την ακετυλίωση των πρωτεϊνών αλλά και τη δράση των microRNAs. Επίσης μπορούν να δρουν ως ρυθμιστές της μεταγραφικής διαδικασίας ενώ εντοπίζονται κατά κύριο ρόλο σε ενδοκυτταρικά οργανίδια αλλά και στον πυρήνα. Ακόμη βρέθηκαν και τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία τα συγκεκριμένα γονίδια στόχοι συμμετέχουν μέσω KEGG ανάλυση, με τα περισσότερα γονίδια στόχοι να συμμετέχουν στην οδό σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνης. Είναι ήδη γνωστό ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης ενέχεται στην παθογένεση της OA (Wang 2019) ενώ μελέτες δείχνουν ότι η ρύθμιση της β-κατενίνης από τα miRNAs μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο στην νόσο. Συγκεκριμένα μελέτη των Shu Hu et al. υποστήριξε ότι το miR-320c μπορεί να αναστείλει τον εκφυλισμό των χονδροκυττάρων της OA μέσω της καταστολής της κανονικής οδού σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνης (Hu 2019).

Βάσει όλων των παραπάνω γίνεται αντιληπτό, ότι το miR-150-5p μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της OA μέσω της επιγενετικής ρύθμισης της β-κατενίνης. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν αυξημένη έκφραση της β-κατενίνης και μειωμένη έκφραση του miR-150-5p στα OA χονδροκύτταρα καθώς επίσης και ύπαρξη αρνητικής σχέσης μεταξύ των επιπέδων των δύο μορίων καθώς η αύξηση της έκφραση του miR-150-5p προκαλούσε αντίστοιχη μείωση της έκφραση της β-κατενίνης στα χονδροκύτταρα. Σε κυτταρικό επίπεδο, η αύξηση της έκφρασης του miR-150-5p είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της έκφρασης της β-κατενίνης, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης για επιγενετική ρύθμιση της β-κατενίνης από το miR-150-5p. Ήδη η β-κατενίνη είχε επιβεβαιωθεί ότι αποτελεί στόχο του miR-150 σε πολλούς τύπους καρκίνου (He 2020) ενώ μελέτη του Wang έδειξε ότι η αύξηση της έκφρασης του miR-150 μείωνε την ικανότητα των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων που προέρχονται από λιπόδη ιστό (ADMSCs) να διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες μέσω αναστολής της έκφρασης της β-κατενίνης (Wang 2019). Τα αποτελέσματα της ερευνάς μας συμφωνούν με τις προηγούμενες μελέτες όσον αφορά την ρύθμιση της β-κατενίνης από το miR-150-5p ενώ αποδεικνύεται για πρώτη φορά η ύπαρξη αυτής της αλληλεπίδρασης σε κύτταρα του χόνδρου.

Δεδομένο ότι το μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -κατενίνη επάγει την έκφραση των καταβολικών ενζύμων στην OA (Parathanasiou 2012), στο τελευταίο μέρος της εργασίας μας μελετήσαμε το ρόλο της επιγενετικής ρύθμισης της έκφρασης της  $\beta$ -κατενίνης από το miR-150-5p στην καταβολική δράση των OA χονδροκυττάρων. Σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -κατενίνη μετά τη χορήγηση LiCl επέφερε αύξηση των επιπέδων της  $\beta$ -κατενίνης η οποία αντιστράφηκε μετά την αύξηση της έκφρασης του miR-150-5p, ενισχύοντας τα προηγούμενα αποτελέσματα μας πως το miR-150-5p είναι αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης της  $\beta$ -κατενίνης. Επιπλέον, η αύξηση της έκφρασης του miR-150-5p είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης των καταβολικών ενζύμων ADAMTS-5, MMP-9, MMP-13 και MMP-14 σε επίπεδα παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν πριν την ενεργοποίηση του μονοπατιού με LiCl, αναδεικνύοντας το ρόλο της απορρύθμισης της έκφρασης του miR-150-5p στην επαγωγή της καταβολικής δράσης στα OA χονδροκύτταρα μέσω της  $\beta$ -κατενίνης. Οι MMPs και οι ADAMTS συμμετέχουν στην υποβάθμιση της ECM μέσω της αποδόμησης του κολλαγόνου τύπου II και της αγγρεκάνης, καταλαμβάνοντας κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη OA (Yang 2017). Είναι γνωστό ότι η αυξημένη ενεργότητα του μονοπατιού της  $\beta$ -κατενίνης που παρατηρείται σε περιοχές εκφυλισμένου χόνδρου, λόγω αύξησης της έκφρασης της, οδηγεί στην επαγωγή διαφορετικών μεταλλοπρωτεϊνών (MMP 9, 13, 14) καθώς και αγγρεκενάσης (ADAMTS-5) προωθώντας καταβολικές δράσεις και διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά (Parathanasiou 2012, Parathanasiou 2009).

Συμπερασματικά, το NEAT-1 παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στα OA χονδροκύτταρα, προκαλώντας μείωση των επιπέδων έκφρασης του miR-150-5p με επακόλουθο την αναστολή της ενδογενούς κατασταλτικής δραστηριότητας του miR-150-5p στην έκφραση των γονιδίων-στόχων του, όπως είναι η  $\beta$ -κατενίνη. Κατά συνέπεια, η χονδροπροστατευτική δράση του miR-150-5p εξασθενεί καθώς παρατηρείται αύξηση της ενεργότητας του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -κατενίνη, μέσω της αύξησης της έκφρασης της  $\beta$ -κατενίνης, που οδηγεί σε ενίσχυση της καταβολικής δράσης των OA χονδροκυττάρων και αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου.

## E. Βιβλιογραφία

Almeida, M., Han, L., Bellido, T., Manolagas, S. C., & Kousteni, S. (2005). Wnt Proteins Prevent Apoptosis of Both Uncommitted Osteoblast Progenitors and Differentiated Osteoblasts by  $\beta$ -Catenin-dependent and -independent Signaling Cascades Involving Src/ERK and Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT. *Journal of Biological Chemistry*, 280(50), 41342–41351. <https://doi.org/10.1074/jbc.m502168200>

Berenbaum, F., & Walker, C. (2020). Osteoarthritis and inflammation: a serious disease with overlapping phenotypic patterns. *Postgraduate Medicine*, 132(4), 377–384. <https://doi.org/10.1080/00325481.2020.1730669>

Charlier, E., Relic, B., Deroyer, C., Malaise, O., Neuville, S., Collée, J., Malaise, M., & de Seny, D. (2016). Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2146. <https://doi.org/10.3390/ijms17122146>

Chen, D., Shen, J., & Hui, T. (2015). Epigenetic and microRNA regulation during osteoarthritis development. *F1000Research*, 4, 1092. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6548.1>

Cherifi, C., Monteagudo, S., & Lories, R. J. (2021). Promising targets for therapy of osteoarthritis: a review on the Wnt and TGF- $\beta$  signalling pathways. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 13, 1759720X2110069. <https://doi.org/10.1177/1759720x211006959>

Clevers, H. (2006). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*, 127(3), 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>

Cong, L., Zhu, Y., & Tu, G. (2017). A bioinformatic analysis of microRNAs role in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 25(8), 1362–1371. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2017.03.012>

Deyle, G. D., Allen, C. S., Allison, S. C., Gill, N. W., Hando, B. R., Petersen, E. J., Dusenberry, D. I., & Rhon, D. I. (2020). Physical Therapy versus Glucocorticoid Injection for Osteoarthritis of the Knee. *New England Journal of Medicine*, 382(15), 1420–1429. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1905877>

- Endisha, H., Datta, P., Sharma, A., Nakamura, S., Rossomacha, E., Younan, C., Ali, S. A., Tavallae, G., Lively, S., Potla, P., Shestopaloff, K., Rockel, J. S., Krawetz, R., Mahomed, N. N., Jurisica, I., Gandhi, R., & Kapoor, M. (2021). MicroRNA-34a-5p Promotes Joint Destruction During Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*, *73*(3), 426–439. <https://doi.org/10.1002/art.41552>
- Guilak, F., Nims, R. J., Dicks, A., Wu, C. L., & Meulenbelt, I. (2018). Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biology*, *71–72*, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.05.008>
- HE, J., Cao, W., Azeem, I., & Shao, Z. (2020). Epigenetics of osteoarthritis: Histones and TGF- $\beta$ 1. *Clinica Chimica Acta*, *510*, 593–598. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.08.011>
- He, Y., Li, Z., Alexander, P. G., Ocasio-Nieves, B. D., Yocum, L., Lin, H., & Tuan, R. S. (2020). Pathogenesis of Osteoarthritis: Risk Factors, Regulatory Pathways in Chondrocytes, and Experimental Models. *Biology*, *9*(8), 194. <https://doi.org/10.3390/biology9080194>
- He, Z., Dang, J., Song, A., Cui, X., Ma, Z., & Zhang, Y. (2020). The involvement of miR-150/ $\beta$ -catenin axis in colorectal cancer progression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *121*, 109495. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109495>
- Heinegård, D., & Saxne, T. (2010). The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, *7*(1), 50–56. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.198>
- Howard, T. A., Murray, I. R., Amin, A. K., Simpson, A. H., & Hall, A. C. (2020). Damage control articular surgery: Maintaining chondrocyte health and minimising iatrogenic injury. *Injury*, *51*, S83–S89. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2019.10.072>
- Hu, S., Mao, G., Zhang, Z., Wu, P., Wen, X., Liao, W., & Zhang, Z. (2019). MicroRNA-320c inhibits development of osteoarthritis through downregulation of canonical Wnt signaling pathway. *Life Sciences*, *228*, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.011>
- Hutchinson, J. N., Ensminger, A. W., Clemson, C. M., Lynch, C. R., Lawrence, J. B., & Chess, A. (2007). A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding



RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics*, 8(1).  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-39>

Hwang, H., & Kim, H. (2015). Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26035–26054.  
<https://doi.org/10.3390/ijms161125943>

Jia, H., Wu, D., Zhang, Z., & Li, S. (2020). Regulatory effect of the MAFG-AS1/miR-150-5p/MYB axis on the proliferation and migration of breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, 58(1), 33–44.  
<https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5150>

Khan, N. M., & Haqqi, T. M. (2018). Epigenetics in osteoarthritis: Potential of HDAC inhibitors as therapeutics. *Pharmacological Research*, 128, 73–79.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.007>

Klec, C., Prinz, F., & Pichler, M. (2018). Involvement of the long noncoding RNA NEAT 1 in carcinogenesis. *Molecular Oncology*, 13(1), 46–60.  
<https://doi.org/10.1002/1878-0261.12404>

Kovács, B., Vajda, E., & Nagy, E. E. (2019). Regulatory Effects and Interactions of the Wnt and OPG-RANKL-RANK Signaling at the Bone-Cartilage Interface in Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4653.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20184653>

Laffont, B., & Rayner, K. J. (2017). MicroRNAs in the Pathobiology and Therapy of Atherosclerosis. *Canadian Journal of Cardiology*, 33(3), 313–324.  
<https://doi.org/10.1016/j.cjca.2017.01.001>

Li, D., Sun, Y., Wan, Y., Wu, X., & Yang, W. (2020). LncRNA NEAT1 promotes proliferation of chondrocytes via down-regulation of miR-16-5p in osteoarthritis. *The Journal of Gene Medicine*, 22(9). <https://doi.org/10.1002/jgm.3203>

Li, Y. H., Tavallae, G., Tokar, T., Nakamura, A., Sundararajan, K., Weston, A., Sharma, A., Mahomed, N., Gandhi, R., Jurisica, I., & Kapoor, M. (2016). Identification of synovial fluid microRNA signature in knee osteoarthritis: differentiating early- and late-stage knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(9), 1577–1586.  
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.04.019>

- Litwic, A., Edwards, M. H., Dennison, E. M., & Cooper, C. (2013). Epidemiology and burden of osteoarthritis. *British Medical Bulletin*, *105*(1), 185–199. <https://doi.org/10.1093/bmb/lds038>
- Liu, F., Liu, X., Yang, Y., Sun, Z., Deng, S., Jiang, Z., Li, W., & Wu, F. (2020). NEAT1/miR-193a-3p/SOX5 axis regulates cartilage matrix degradation in human osteoarthritis. *Cell Biology International*, *44*(4), 947–957. <https://doi.org/10.1002/cbin.11291>
- Liu, S., Yang, H., Hu, B., & Zhang, M. (2017). Sirt1 regulates apoptosis and extracellular matrix degradation in resveratrol-treated osteoarthritis chondrocytes via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways. *Experimental and Therapeutic Medicine*. Published. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5165>
- Liu, X., Wang, L., Ma, C., Wang, G., Zhang, Y., & Sun, S. (2019). Exosomes derived from platelet-rich plasma present a novel potential in alleviating knee osteoarthritis by promoting proliferation and inhibiting apoptosis of chondrocyte via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s13018-019-1529-7>
- Loeser, R. F., Collins, J. A., & Diekman, B. O. (2016). Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, *12*(7), 412–420. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.65>
- Malemud, C. (2018). MicroRNAs and Osteoarthritis. *Cells*, *7*(8), 92. <https://doi.org/10.3390/cells7080092>
- Meulenbelt, I. M., Bhutani, N., den Hollander, W., Gay, S., Oppermann, U., Reynard, L. N., Skelton, A. J., Young, D. A., Beier, F., & Loughlin, J. (2016). The first international workshop on the epigenetics of osteoarthritis. *Connective Tissue Research*, *58*(1), 37–48. <https://doi.org/10.3109/03008207.2016.1168409>
- Mobasheri, A., Bay-Jensen, A. C., van Spil, W., Larkin, J., & Levesque, M. (2017). Osteoarthritis Year in Review 2016: biomarkers (biochemical markers). *Osteoarthritis and Cartilage*, *25*(2), 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.12.016>
- Mohr, A., & Mott, J. (2015). Overview of MicroRNA Biology. *Seminars in Liver Disease*, *35*(01), 003–011. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1397344>

- Monroe, D. G., McGee-Lawrence, M. E., Oursler, M. J., & Westendorf, J. J. (2012). Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene*, *492*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.044>
- Munjaj, A., Bapat, S., Hubbard, D., Hunter, M., Kolhe, R., & Fulzele, S. (2019). Advances in Molecular biomarker for early diagnosis of Osteoarthritis. *Biomolecular Concepts*, *10*(1), 111–119. <https://doi.org/10.1515/bmc-2019-0014>
- Neogi, T. (2013). The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *21*(9), 1145–1153. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.03.018>
- Nguyen, V. H. L., Hough, R., Bernaudo, S., & Peng, C. (2019). Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in ovarian cancer: Insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis. *Journal of Ovarian Research*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0596-z>
- Noureddine, L., Hajarnis, S., & Patel, V. (2013). MicroRNAs and polycystic kidney disease. *Drug Discovery Today: Disease Models*, *10*(3), e137–e143. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2013.10.001>
- Ntoumou, E., Tzetis, M., Braoudaki, M., Lambrou, G., Poulou, M., Malizos, K., Stefanou, N., Anastasopoulou, L., & Tsezou, A. (2017). Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes. *Clinical Epigenetics*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0428-1>
- Papathanasiou, I., Malizos, K. N., & Tsezou, A. (2009). Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research*, *28*(3), 348–353. <https://doi.org/10.1002/jor.20993>
- Papathanasiou, I., Malizos, K. N., & Tsezou, A. (2012). Bone morphogenetic protein-2-induced Wnt/beta-catenin signaling pathway activation through enhanced low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 catabolic activity contributes to hypertrophy in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, *14*(2), R82. <https://doi.org/10.1186/ar3805>
- Primorac, D., Molnar, V., Rod, E., Jeleč, E., Čukelj, F., Matišić, V., Vrdoljak, T., Hudetz, D., Hajsok, H., & Borić, I. (2020). Knee Osteoarthritis: A Review of

- Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. *Genes*, 11(8), 854. <https://doi.org/10.3390/genes11080854>
- Reynard, L., & Barter, M. (2020). Osteoarthritis year in review 2019: genetics, genomics and epigenetics. *Osteoarthritis and Cartilage*, 28(3), 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.11.010>
- Rim, Y. A., Nam, Y., & Ju, J. H. (2020). The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2358. <https://doi.org/10.3390/ijms21072358>
- Robinson, W. H., Lepus, C. M., Wang, Q., Raghu, H., Mao, R., Lindstrom, T. M., & Sokolove, J. (2016). Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(10), 580–592. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.136>
- Saberinia, A., Alinezhad, A., Jafari, F., Soltany, S., & Akhavan Sigari, R. (2020). Oncogenic miRNAs and target therapies in colorectal cancer. *Clinica Chimica Acta*, 508, 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.012>
- Scanzello, C. R. (2017). Role of low-grade inflammation in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 29(1), 79–85. <https://doi.org/10.1097/bor.0000000000000353>
- Shen, J., Abu-Amer, Y., O’Keefe, R. J., & McAlinden, A. (2016). Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. *Connective Tissue Research*, 58(1), 49–63. <https://doi.org/10.1080/03008207.2016.1208655>
- Shi, G., Cheng, Y., Zhang, Y., Guo, R., Li, S., & Hong, X. (2021). Long non-coding RNA LINC00511/miR-150/MMP13 axis promotes breast cancer proliferation, migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1867(3), 165957. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165957>
- Singh, P., Marcu, K. B., Goldring, M. B., & Otero, M. (2018). Phenotypic instability of chondrocytes in osteoarthritis: on a path to hypertrophy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1442(1), 17–34. <https://doi.org/10.1111/nyas.13930>

- Sophia Fox, A. J., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2009). The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health: A Multidisciplinary Approach*, 1(6), 461–468. <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>
- Trachana, V., Ntoumou, E., Anastasopoulou, L., & Tsezou, A. (2018). Studying microRNAs in osteoarthritis: Critical overview of different analytical approaches. *Mechanisms of Ageing and Development*, 171, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.02.006>
- Troeberg, L., & Nagase, H. (2012). Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(1), 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.06.020>
- Tu, J., Huang, W., Zhang, W., Mei, J., & Zhu, C. (2020). The emerging role of lncRNAs in chondrocytes from osteoarthritis patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110642. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110642>
- van Spil, W. E., Kubassova, O., Boesen, M., Bay-Jensen, A. C., & Mobasheri, A. (2019). Osteoarthritis phenotypes and novel therapeutic targets. *Biochemical Pharmacology*, 165, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.037>
- Wang, H. (2020). MicroRNAs and Apoptosis in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5353. <https://doi.org/10.3390/ijms21155353>
- Wang, J., Hu, X., Ji, Q., Zheng, B., & Huang, L. (2019). miR-150 Affects Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Activity and Regulates MSC Osteogenic Differentiation. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 9(10), 1339–1345. <https://doi.org/10.1166/jbt.2019.2147>
- Wang, X., Jiang, G., Ren, W., Wang, B., Yang, C., & Li, M. (2020). LncRNA NEAT1 Regulates 5-Fu Sensitivity, Apoptosis and Invasion in Colorectal Cancer Through the MiR-150-5p/CPSF4 Axis. *OncoTargets and Therapy*, Volume 13, 6373–6383. <https://doi.org/10.2147/ott.s239432>
- Wang, Y., Fan, X., Xing, L., & Tian, F. (2019). Wnt signaling: a promising target for osteoarthritis therapy. *Cell Communication and Signaling*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0411-x>

Wang, Y. H., Kuo, S. J., Liu, S. C., Wang, S. W., Tsai, C. H., Fong, Y. C., & Tang, C. H. (2020). Apelin Affects the Progression of Osteoarthritis by Regulating VEGF-Dependent Angiogenesis and miR-150-5p Expression in Human Synovial Fibroblasts. *Cells*, 9(3), 594. <https://doi.org/10.3390/cells9030594>

Wang, Z., Hao, J., & Chen, D. (2019). Long Noncoding RNA Nuclear Enriched Abundant Transcript 1 (NEAT1) Regulates Proliferation, Apoptosis, and Inflammation of Chondrocytes via the miR-181a/Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like (GPD1L) Axis. *Medical Science Monitor*, 25, 8084–8094. <https://doi.org/10.12659/msm.918416>

WU, C., TIAN, B., QU, X., LIU, F., TANG, T., QIN, A., ZHU, Z., & DAI, K. (2014). MicroRNAs play a role in chondrogenesis and osteoarthritis (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 34(1), 13–23. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1743>

Xiao, P., Zhu, X., Sun, J., Zhang, Y., Qiu, W., Li, J., & Wu, X. (2020). LncRNA NEAT1 regulates chondrocyte proliferation and apoptosis via targeting miR-543/PLA2G4A axis. *Human Cell*, 34(1), 60–75. <https://doi.org/10.1007/s13577-020-00433-8>

Xie, F., Liu, Y., Chen, X., Li, Q., Zhong, J., Dai, B., Shao, X., & Wu, G. (2020). Role of MicroRNA, LncRNA, and Exosomes in the Progression of Osteoarthritis: A Review of Recent Literature. *Orthopaedic Surgery*, 12(3), 708–716. <https://doi.org/10.1111/os.12690>

Yang, C. Y., Chanalaris, A., & Troeberg, L. (2017). ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis – looking beyond the ‘usual suspects.’ *Osteoarthritis and Cartilage*, 25(7), 1000–1009. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2017.02.791>

Yang, X., Zhang, Q., Gao, Z., Yu, C., & Zhang, L. (2018). Down-Regulation of MiR-150 Alleviates Inflammatory Injury Induced by Interleukin 1 via Targeting Kruppel-Like Factor 2 in Human Chondrogenic Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(6), 2579–2588. <https://doi.org/10.1159/000491654>

Yu, Y., & Zhao, J. (2019). Modulated Autophagy by MicroRNAs in Osteoarthritis Chondrocytes. *BioMed Research International*, 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/1484152>

Zhang, C., Zou, Y. L., Ma, J., Dang, X. Q., & Wang, K. Z. (2015). Apoptosis associated with Wnt/ $\beta$ -catenin pathway leads to steroid-induced avascular necrosis of femoral head. *BMC Musculoskeletal Disorders*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12891-015-0606-2>

Zhang, W., Ouyang, H., Dass, C. R., & Xu, J. (2016). Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. *Bone Research*, *4*(1). <https://doi.org/10.1038/boneres.2015.40>

Zhang, X., Bu, Y., Zhu, B., Zhao, Q., Lv, Z., Li, B., & Liu, J. (2018). Global transcriptome analysis to identify critical genes involved in the pathology of osteoarthritis. *Bone & Joint Research*, *7*(4), 298–307. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.74.bjr-2017-0245.r1>

Zhang, Y., Dong, Q., & Sun, X. (2020). Positive Feedback Loop LINC00511/miR-150-5p/SP1 Modulates Chondrocyte Apoptosis and Proliferation in Osteoarthritis. *DNA and Cell Biology*, *39*(9), 1506–1512. <https://doi.org/10.1089/dna.2020.5718>

Zhang, Y., Wang, F., Chen, G., He, R., & Yang, L. (2019). LncRNA MALAT1 promotes osteoarthritis by modulating miR-150-5p/AKT3 axis. *Cell & Bioscience*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0302-2>