



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



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

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

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Σύγκριση μελετών γονιδιακής έκφρασης μεγάλης κλίμακας (gene expression arrays) σε διάφορους ιστούς της άρθρωσης (οστό, χόνδρος, υμένας) σε άτομα με εκφυλιστική αρθρίτιδα»**

**ΣΤΑΘΗ ΔΗΜΗΤΡΑ**

**ΙΑΤΡΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ**

**ΙΟΥΝΙΟΣ, 2014**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

*ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Α. ΤΣΕΖΟΥ*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

κ.Τσέζου Ασπασία, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής ΠΘ

κ.Μαλίζος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Ορθοπαιδικής ΠΘ

κ.Δήμας Κωνσταντίνος, Επ. Καθηγητής Φαρμακολογίας ΠΘ

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>4-5</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>6-8</b>
<b>A. Μελέτες γονιδιακής έκφρασης στο υποχόνδριο οστό</b>	<b>8-36</b>
<b>B. Μελέτες γονιδιακής έκφρασης στον αρθρικό υμένα</b>	<b>36-45</b>
<b>Γ. Μελέτες γονιδιακής έκφρασης στον αρθρικό χόνδρο</b>	<b>45-72</b>
<b>Δ. Σύγκριση των ανωτέρω μελετών γονιδιακής έκφρασης</b>	<b>72-73</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>73-75</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>76-93</b>

## Περίληψη

Η εκφυλιστική αρθρίτιδα (οστεοαρθρίτιδα) είναι η συχνότερη μορφή αρθρίτιδας προσβάλλοντας πάνω από το 40% των ατόμων ηλικίας άνω των 70,5 ετών. Αν και η οστεοαρθρίτιδα προσβάλλει πάντα τον αρθρικό χόνδρο, τα τελευταία χρόνια έχειδειχθεί ότι προσβάλλει όλους τους ιστούς της άρθρωσης. Η αιτιολογία της νόσου δεν είναι πλήρως κατανοητή, ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι πρόκειται για πολυπαραγοντικό νόσημα που προκαλείται από την αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η περιγραφή και η σύγκριση μελετών γονιδιακής έκφρασης μεγάλης κλίμακας που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα υποχόνδριου οστού, αρθρικού υμένα και αρθρικού χόνδρου πασχόντων από τη νόσο και υγιών ατόμων αλλά και σε πειραματικά μοντέλα ζώων με τη βοήθεια της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών.

Γονίδια με ρόλο στην οστική ανάπτυξη ή την οστική αναδιοργάνωση (π.χ.*FGFR2*, *ASPN*, *BMP1*, *COL-2a1*, *ADAMTS5*) καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν χημειοκίνες και τους υποδοχείς τους (π.χ.*CCL2*, *CCL7*) ή κυττοκίνες και τους υποδοχείς τους (π.χ.*TNFRSF9*, *IL10*) έχουν τροποποιημένη έκφραση στο πάσχον υποχόνδριο οστό. Γονίδια που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του WNT (π.χ.*PTEN*, *WNT5B*, *CTNNB1*, *IBSP*) ή του TGF-β/BMP (π.χ.*ADAMTS4*, *MEPE*, *SMAD3*, *TGFB1*), καθώς και γονίδια με γνωστούς ρόλους στις δραστηριότητες των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών (π.χ.*FOS*, *PRSS11*, *AKT1*, *BMP1*, *TNFRSF11*, *ACP5*, *CTSK*, *MMP2*, *POSTN*, *COL-3a1*) έχουν επίσης βρεθεί ότι είναι διαφορετικά εκφρασμένα στο πάσχον υποχόνδριο οστό σε σύγκριση με το υγιές. Άλλα γονίδια με διαφορετική έκφραση αφορούν την αγγειογένεση (π.χ.*MMP25*, *S100A4*, *ANGPTL4*, *STC1*, *IGFBP3*), την κυτταρική νέκρωση (π.χ.*WISP1*, *ADIPOQ*), το λιπώδη ιστό (π.χ.*WNT10B*, *CIDEA*, *LEP*) και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (π.χ.*GRB14*, *BTG2*).

Όσον αφορά τον αρθρικό υμένα, γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα ή ενισχυτές/αναστολείς αυτών (π.χ.*PGK1*, *SORD*, *EXT1*) ή πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας (π.χ.*FN1*, *FBLN3*) είχαν τροποποιημένη έκφραση στα

δείγματα αρθρικού υμένα των ασθενών σε σύγκριση με τα δείγματα των υγιών μαρτύρων. Επιπλέον, σε μελέτη που προσδιόρισε πρότυπα γονιδιακής έκφρασης μεταξύ 2 περιοχών του αρθρικού υμένα στον ίδιο ασθενή, γονίδια συσχετιζόμενα με τη φλεγμονή (π.χ.*IL-8*, *S100A9*, *CXCL2*, *PTGES*, *TREM1*, *CXCL6*), τον αναβολισμό (π.χ.*HAPLN1*, *CILP*, *COL1A2*), τον καταβολισμό (π.χ.*CTSS*, *MMP3*) και την αγγειογένεση (π.χ.*DNER*, *AQP9*, *STC1*) ήταν διαφορετικά εκφρασμένα μεταξύ των φυσιολογικών και των φλεγμονωδών περιοχών του υμένα. Τέλος, γονίδια, τα οποία σχετίζονται με την ανοσολογική απάντηση (π.χ.*MIF*, *LAX1*), την ανάπτυξη του χόνδρου (π.χ.*HOXA11*, *RUNX2*) και τη γλυκοζυλίωση (π.χ.*SERP1*) ήταν διαφορετικά εκφρασμένα στον αρθρικό υμένα μεταξύ των αρχικών και των τελικών σταδίων της νόσου.

Τα γονίδια που παρουσιάζουν τροποποιημένη έκφραση στον οστεοαρθρικό χόνδρο εμπλέκονται σε διεργασίες, όπως η φλεγμονή (π.χ.*PTGES*, *IL6*, *IL-8* και *LIF*), η πρωτεόλυση (π.χ.*ADAMTS5*, *MMP2*), ο αναβολισμός (π.χ.*COL1A1*, *COL6A1*, *COL9A2*, *COL11A1*, *FMOD*, *CILP*, *FN1*, *TNC*, *SPARC*), η οξειδωτική άμυνα (π.χ.*GPX3*, *SOD2*, *SOD3*), ο οστικός σχηματισμός (π.χ.*CLEC3B*, *CDH11*, *MSX1*), η αγγειογένεση (π.χ.*RUNX1*, *CCL4*, *CCL2*), η σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού του TGF- $\beta$  (π.χ.*LTBP1*) ή του WNT (π.χ.*WNT5B*), η διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων (π.χ.*ECM1*) και η ανοσολογική απόκριση (π.χ. *DAF*, *IF*).

Συνολικά, τα 49 γονίδια που είχαν τροποποιημένη έκφραση σε τουλάχιστον 2 ιστούς της πάσχουσας από οστεοαρθρίτιδα άρθρωσης και που θα αναλυθούν στην παρούσα εργασία, εμπλέκονται σε διεργασίες, όπως ο σχηματισμός, η διαφοροποίηση και η λειτουργία των οστεοκλαστών, η οστική αναδιόργάνωση, η οστική ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και η λειτουργία των οστεοβλαστών, η εναπόθεση ασβεστίου στα οστά, η φλεγμονή, η αγγειογένεση, η ανάπτυξη του χόνδρου, ο μεταβολισμός του χόνδρου, η διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, η σηματοδότηση μέσω WNT, η σηματοδότηση μέσω TGF- $\beta$ /BMP, η πρωτεόλυση, η ανοσολογική απάντηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική προσκόλληση, η κυτταρική μετανάστευση και η κυτταρική νέκρωση.

## Εισαγωγή

Η οστεοαρθρίτιδα είναι ένα σύνολο διαταραχών του μυοσκελετικού συστήματος που χαρακτηρίζεται από φθορά και απώλεια του αρθρικού χόνδρου στις αρθρώσεις, συνηθέστερα στις αρθρώσεις του γονάτου, του ισχίου, του χεριού, του ποδιού και της σπονδυλικής στήλης. Η ανάπτυξη της οστεοαρθρίτιδας φαίνεται να είναι αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ μηχανικών, βιολογικών, βιοχημικών και μοριακών παραγόντων που επιδρούν στις λειτουργίες της αποδόμησης και της σύνθεσης της εξωκυττάριας ουσίας από τα χονδροκύτταρα του αρθρικού χόνδρου, αλλά και στο υποχόνδριο οστό.

Αν και η οστεοαρθρίτιδα προσβάλλει πάντα τον αρθρικό χόνδρο, επιδρά σε όλους τους ιστούς της άρθρωσης. Η απώλεια του αρθρικού χόνδρου συνοδεύεται από αναδιαμόρφωση του υποχόνδριου οστού με σκλήρυνση και σε πολλές περιπτώσεις με κύστεις, σχηματισμό οστεοφύτων, χαλάρωση συνδέσμων, μυϊκή ατροφία και σπασμούς και στα κλινικά στάδια της ασθένειας, με φλεγμονή του αρθρικού υμένα (Martel-Pelletier et al, 2008), (Altman, 2010).

Οι επιπτώσεις στην υγεία και η κοινωνικοοικονομική επιβάρυνση που συνεπάγεται η οστεοαρθρίτιδα είναι ουσιώδεις. Το βασικό σύμπτωμα της οστεοαρθρίτιδας είναι ο πόνος και η απώλεια της λειτουργικότητας της άρθρωσης οδηγεί σε μειωμένη κινητικότητα (Moskowitz, 2009). Τα υπάρχοντα σχήματα αντιμετώπισης της νόσου είναι συνδυασμοί φαρμακευτικών και μη φαρμακευτικών θεραπειών (Altman, 2010). Ωστόσο, αυτά είναι συχνά αναποτελεσματικά στην αντιμετώπιση του κυρίου συμπτώματος της νόσου οδηγώντας σε αυξανόμενες ανάγκες για ολική αρθροπλαστική (Katz, 2006).

Η οστεοαρθρίτιδα είναι η πιο επικρατής μορφή αρθρίτιδας προσβάλλοντας πάνω από το 40% των ατόμων ηλικίας άνω των 70,5 ετών και η συχνότητα της είναι σε άνοδο (Dieppe and Lohmander, 2005). Στις ΗΠΑ, 27 εκατομμύρια ενήλικες είχαν κλινική ένδειξη οστεοαρθρίτιδας το 2005, μια αύξηση σχεδόν 30% από την εκτίμηση των 21 εκατομμυρίων το 1995 (Lawrence et al, 1998),

(Lawrence et al, 2008). Με το αυξανόμενο προσδόκιμο επιβίωσης και την πανδημία της παχυσαρκίας -με την ηλικία και την παχυσαρκία να αποτελούν καθιερωμένους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη και την εξέλιξη της ασθένειας- η συχνότητα της αναμένεται να αυξηθεί ραγδαία.

Αν και η αιτιολογία της οστεοαρθρίτιδας δεν είναι πλήρως κατανοητή, έχει αποδειχθεί ότι η νόσος προκαλείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Η ηλικία είναι ο συχνότερος παράγοντας κινδύνου για όλα τα είδη οστεοαρθρίτιδας, ενώ η παχυσαρκία φαίνεται να προσδίδει το μεγαλύτερο κίνδυνο στην οστεοαρθρίτιδα γόνατος, ιδιαίτερα στις γυναίκες. Επιπρόσθετα, οι επιδημιολογικές έρευνες προτείνουν ότι ο σωματικός φόρτος εργασίας, η αυξημένη αθλητική δραστηριότητα, οι τραυματισμοί στις αρθρώσεις και το γυναικείο φύλο μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης οστεοαρθρίτιδας σε συγκεκριμένες αρθρώσεις (Panoutsoroulou and Zeggini, 2013).

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα είναι στραμμένη στον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου με μελέτες γονιδιακής έκφρασης μεγάλης έκτασης να πραγματοποιούνται σε πειραματικά μοντέλα ζώων καθώς και σε δείγματα πασχόντων από τη νόσο. Γονιδιακή έκφραση είναι η διεργασία με την οποία ένα γονίδιο ασκεί τη δράση του σε ένα κύτταρο ή σε ένα οργανισμό, συνήθως κατευθύνοντας τη σύνθεση ενός μορίου RNA που μπορεί να μεταφραστεί σε μία πρωτεΐνη με χαρακτηριστική δράση. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών επέφερε επανάσταση στην ανάλυση των γονιδίων, καθώς επέτρεψε την ταυτόχρονη καταγραφή των mRNA μεταγράφων χιλιάδων γονιδίων και συνεπώς την αναγνώριση και τη μελέτη των προτύπων γονιδιακής έκφρασης που κατευθύνουν τη φυσιολογία κάθε κυττάρου.

Οι DNA μικροσυστοιχίες είναι γυάλινα πλακίδια μικροσκοπίου κατάφορτα με κλάσματα DNA. Κάθε κλάσμα περιέχει μια νουκλεοτιδική αλληλουχία που λειτουργεί ως ανιχνευτής για ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Μερικά είδη μικροσυστοιχιών φέρουν κλάσματα DNA που αντιστοιχούν σε ολόκληρα γονίδια, ενώ άλλα είδη περιέχουν μικρά ολιγονουκλεοτίδια. Σε κάθε περίπτωση, είναι γνωστή η ακριβής αλληλουχία και εντόπιση κάθε DNA

ανιχνευτή πάνω στην μικροσυστοιχία. Για την ταυτόχρονη καταγραφή της έκφρασης κάθε γονιδίου σε ένα κυτταρικό πληθυσμό με την τεχνική των DNA μικροσυστοιχιών, απομονώνεται mRNA από τα υπό μελέτη κύτταρα και αντιγράφεται σε συμπληρωματικό DNA (c-DNA), το οποίο σημαίνεται με ένα φθορίζοντα ανιχνευτή. Η μικροσυστοιχία επωάζεται με το σημασμένο δείγμα c-DNA, αφήνεται να συμβεί υβριδισμός και στη συνέχεια η μικροσυστοιχία πλένεται ώστε να απομακρυνθούν τα μη συνδεδεμένα μόρια. Οι θέσεις όπου έχουν υβριδιστεί σημασμένα κλάσματα DNA αναγνωρίζονται ως φθορίζουσες κηλίδες με ένα αυτοματοποιημένο μικροσκόπιο σάρωσης laser. Τέλος, οι θέσεις αντιστοιχίζονται στα συγκεκριμένα γονίδια των οποίων το DNA είχε τοποθετηθεί σε αυτές τις θέσεις (Alberts et al, 2006).

Χάρη στην ταυτόχρονη εξέταση των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων και την ανάλυση των απορρυθμισμένων γονιδίων μπορούν να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς παθογένειας της οστεοαρθρίτιδας σε κυτταρικό επίπεδο. Επιπλέον, οι πληροφορίες από τις μικροσυστοιχίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανακάλυψη νέων μοριακών διαγνωστικών δεικτών και θεραπευτικών στόχων.

## **A. Μελέτες γονιδιακής έκφρασης στο υποχόνδριο οστό**

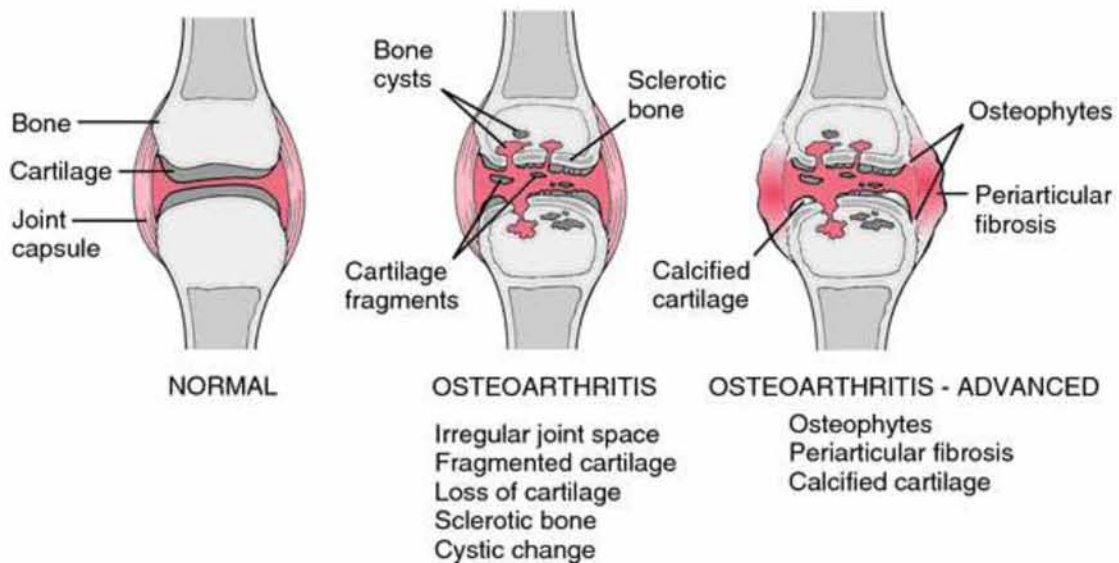
Αν και γενικά η οστεοαρθρίτιδα θεωρείται ασθένεια του χόνδρου, υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι αποτελεί και ασθένεια του οστού. Οι αλλαγές στο υποχόνδριο οστό ίσως συμβαίνουν πριν την έναρξη της εκφύλισης του χόνδρου και αυξάνονται με την πρόοδο της νόσου. Έχει αποδειχτεί ότι το υποχόνδριο οστό παράγει κυττοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και θρεπτικά στοιχεία, τα οποία μπορούν να μεταφερθούν μέσω καναλιών στον αρθρικό χόνδρο (Zhang et al, 2012). Στην οστεοαρθρίτιδα ο οστικός όγκος (bone volume fraction) αυξάνει, αλλά το οστό είναι μηχανικά αδύναμο εξαιτίας της μειωμένης ασβεστοποίησης, του αυξημένου μεταβολισμού του κολλαγόνου και της τροποποιημένης οστικής αναδιοργάνωσης (Horwood et al, 2007). Η καλύτερη κατανόηση των αρχικών μοριακών αλλαγών στο υποχόνδριο οστό ίσως βοηθήσει στη διαλεύκανση της παθογένειας της οστεοαρθρίτιδας.





- Οστεόφυτα
- Σκλήρυνση υποχόνδριου οστού
- Υποχόνδριες κύστεις
- Στένωση του αρθρικού διαστήματος (απώλεια χόνδρου)

Εικόνα 1: [www.quizlet.com](http://www.quizlet.com)



Εικόνα 2: <http://medical-dictionary.thefreediction>

### A1) Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε υποχόνδριο οστό σε πειραματικό μοντέλο πρώιμης οστεοαρθρίτιδας

Σε χειρουργικά επαγόμενο πειραματικό μοντέλο οστεοαρθρίτιδας σε αρουραίους, το οποίο αντιστοιχεί στην μετατραυματική οστεοαρθρίτιδα στους ανθρώπους και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για γενετική ανάλυση, εφαρμόστηκε η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών για να διερευνηθεί η χρονική πορεία των μοριακών αλλαγών στο υποχόνδριο οστό στα πρώτα στάδια της πειραματικής οστεοαρθρίτιδας και τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με RT-PCR και ανοσοιστοχημεία. Συνολικά προσδιορίστηκαν 2.234 γονίδια με διαφορετική έκφραση την πρώτη εβδομάδα, 1.944 γονίδια τη δεύτερη εβδομάδα και 1.517 γονίδια την τέταρτη εβδομάδα μετά το χειρουργείο. Μερικά από αυτά γονίδια, όπως τα *Alp*, *Igf1*, *Tgf β1*, *Postn*, *Mmp3*, *Tnfsf11*, *Acp5*, *Bmp5*,

*Aspn* και *Ihh*, παίζουν ρόλο στην οστική ανάπτυξη ή την αναδιοργάνωση. Οι διαφορές στην έκφραση αυτών των γονιδίων επιβεβαιώθηκαν με PCR πραγματικού χρόνου, ενώ ανοσοιστοχημεία χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθεί η έκφραση των πρωτεϊνών MMP3 και ASPN σε τομές ιστών. Αυτές οι αναλύσεις δείχνουν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης MMP3 ταιριάζει απόλυτα με τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών και των αναλύσεων με PCR πραγματικού χρόνου. Ωστόσο, η έκφραση της πρωτεΐνης ASPN δε φάνηκε να διαφέρει οποιαδήποτε στιγμή.

Ο αριθμός των γονιδίων με αυξημένη ή μειωμένη έκφραση ήταν παρόμοιος την πρώτη και τη δεύτερη εβδομάδα μετεγχειρητικά. Την τέταρτη εβδομάδα, αναγνωρίστηκε ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων με μειωμένη έκφραση, υποδεικνύοντας ότι κατά τα τελευταία στάδια της οστεοαρθρίτιδας, τα κύτταρα του υποχόνδριου οστού είχαν πιο περιορισμένες δυνατότητες να παράγουν λειτουργικούς μεσολαβητές που εμπλέκονται στην ομοίωση του οστίτη ιστού σε σχέση με τα κύτταρα του υποχόνδριου οστού στα αρχικά στάδια της νόσου. Μόνο 112 γονίδια ήταν διαφορετικά εκφρασμένα και στα 3 χρονικά σημεία. Από αυτά, 41 είχαν αυξημένη έκφραση, 60 είχαν μειωμένη έκφραση, ενώ 11 είχαν μειωμένη έκφραση την πρώτη εβδομάδα μετά το χειρουργείο, αυξημένη έκφραση τη δεύτερη εβδομάδα και μειωμένη έκφραση μετά από 4 εβδομάδες.

Η οστική αναδιοργάνωση ρυθμίζεται από την ελεγχόμενη από οστεοκλάστες οστική απορρόφηση και την ελεγχόμενη από οστεοβλάστες οστική σύνθεση. Διαταραχή αυτής της ισορροπίας οδηγεί σε απορρυθμισμένη οστική αναδιοργάνωση και μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την υπερβολική απώλεια οστού ή την πλεονάζουσα οστική κατασκευή και συνεπώς τη σκελετική νόσο. Στο πειραματικό μοντέλο ταυτοποιήθηκε μια ομάδα γονιδίων που παίζουν ρόλο στη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών στα αρχικά στάδια της οστεοαρθρίτιδας. Αυτά τα δεδομένα αποτελούν επιπλέον ενδείξεις ότι ο τροποποιημένος φαινότυπος των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών του υποχόνδριου οστού συμβάλλει στην οστεοαρθρίτιδα (Zhang et al, 2012).

Πίνακας 1: Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια στο υποχόνδριο οστό (Zhang et al, PLOS ONE 2012)

<p>Γονίδια με ρόλο στη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των οστεοκλαστών</p>	<p><b>Acp5</b> (Acid phosphatase 5), <b>Ihh</b> (Indian hedgehog), <b>Ctsk</b> (Cathepsin K), <b>Csf1</b> (Colony stimulating factor 1) <b>Ostf1</b> (Osteoclast stimulating factor 1), <b>Mmp1b</b> (Matrix metalloproteinase 1b), <b>Mmp2</b>, <b>Mmp3</b>, <b>Mmp12</b>, <b>Mmp13</b>, <b>Mmp14</b>, <b>Mmp16</b>, <b>Mmp23</b>, <b>Mmp24</b>, <b>TIMP1</b> (Metalloproteinase inhibitor 1 precursor, partial 70%), <b>Tnfsf11 (RANKL)</b> [Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11], <b>Tnfrsf11b (OPG)</b> [Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b]</p>
<p>Γονίδια με ρόλο στη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των οστεοβλαστών</p>	<p><b>Alp</b> (Alkaline phosphatase), <b>Angptl2</b> (angiopoietin-like 2), <b>Angptl1</b> (angiopoietin-like 1), <b>Cbfb</b> (Core-binding factor, beta subunit), <b>Col-1a1</b> (Collagen, type 1, alpha 1), <b>Col-1a2</b>, <b>Col-3a1</b>, <b>Col-4a1</b>, <b>Mapk6</b> (Mitogen-activated protein kinase 6), <b>Igf1</b> (Insulin-like growth factor 1), <b>Igfals</b> (Insulin-like growth factor binding protein), <b>Igfbp1</b> (Insulin-like growth factor binding protein 1), <b>Osr2</b> (Odd-skipped related 2), <b>Postn</b> (Periostin, osteoblast specific factor), <b>Pth</b> (Parathyroid hormone), <b>Pthlh</b> (Parathyroid hormone-like hormone), <b>Pth1r</b> (Parathyroid hormone 1 receptor)</p>
<p>Γονίδια με ρόλο στην οστική ανάπτυξη ή την οστική αναδιοργάνωση</p>	<p><b>Adams5</b> (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 5), <b>Aspn</b> (Asporin), <b>Bmp1</b>, <b>Bmp3</b>, <b>Bmp4</b>, <b>Bmp5</b> (Bone morphogenetic proteins), <b>Bmpr1a</b> (Bone morphogenetic protein receptor, type IA), <b>Cald1</b> (Caldesmon 1), <b>Col-2a1</b>, <b>Col-5a1</b>, <b>Col-5a2</b>, <b>Col-5a3</b>, <b>Col-6a2</b>, <b>Col-8a1</b>, <b>Col-9a</b>, <b>Col-9a2</b>, <b>Co-19a3</b> (Procollagen, type IX, alpha 3), <b>Col-11a2</b>, <b>Col-16a1</b>, <b>Col-18a1</b>, <b>Col-27a1</b>, <b>Ctnnb1</b> (Catenin beta 1), <b>Ddr2</b> (Discoidin domain receptor tyrosine kinase 2), <b>Fgfr2</b>, <b>Fgfr3</b> (Fibroblast growth factor receptor), <b>Fgfbp3</b> (Fibroblast growth factor binding protein 3), <b>Fap</b> (Fibroblast activation protein, alpha), <b>Fgf13</b> (Fibroblast growth factor 13), <b>Gbx2</b> (Gastrulation brain homeobox 2), <b>Mst1</b> (Macrophage</p>

	stimulating 1), <b>Igsf10</b> (Immunoglobulin superfamily, member 10), <b>Runx2</b> , <b>Runx3</b> (Runt related transcription factor), <b>Sdc2</b> (Syndecan 2), <b>Sfrp2</b> (Secreted frizzled-related protein 2), <b>Tgf-b1</b> (Transforming growth factor, beta 1), <b>Wisp1</b> , <b>Wisp3</b> (WNT1 inducible signaling pathway protein)
Γονίδια που κωδικοποιούν χημειοκίνες και τους υποδοχείς τους	<b>Ccl2</b> (Monocyte chemoattractant protein-1 gene), <b>Ccl3</b> (Chemokine ligand 3), <b>Ccl4</b> (Chemokine ligand 4), <b>Ccl7</b> (Chemokine ligand 7), <b>Ccl11</b> (Chemokine ligand 11), <b>Ccl19</b> (Chemokine ligand 19), <b>Cxcl9</b> (Chemokine ligand 9), <b>Cxcl10</b> (Chemokine ligand10), <b>Cxcl11</b> (Chemokine ligand11), <b>Cxcl13</b> (Chemokine ligand13), <b>Cx3cl1</b> (Chemokine ligand 1), <b>Ccr5</b> (Chemokine receptor 5), <b>Ccr9</b> (Chemokine receptor 9), <b>Cmklr1</b> (Chemokine-like receptor 1)
Γονίδια που κωδικοποιούν κυττοκίνες και τους υποδοχείς τους	<b>IL1f8</b> (Interleukin 1 family, member 8), <b>IL1rl1</b> (Interleukin 1 receptor-like 1, transcript variant 1), <b>IL2rb</b> (Interleukin 2 receptor, beta), <b>IL7r</b> (Interleukin 7 receptor), <b>IL10</b> (Interleukin 10), <b>IL13ra1</b> (Interleukin 13 receptor, alpha 1), <b>IL18</b> (Interleukin 18), <b>IL18bp</b> (Interleukin 18 binding protein), <b>Ifn-a4</b> (Interferon, alpha 4), <b>Ifn-c</b> (Interferon gamma), <b>Jak3</b> (Janus kinase 3), <b>Stat1</b> (Signal transducer and activator of transcription 1), <b>Stat3</b> (Signal transducer and activator of transcription 3), <b>Socs3</b> (Suppressor of cytokine signaling 3), <b>Tnfrsf9</b> (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9), <b>Tnfsf9</b> [Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9], <b>Ttrap</b> (Traf and Tnf receptor associated protein), <b>Vegfa</b> (Vascular endothelial growth factor A)

Η οστική αναδιοργάνωση περιλαμβάνει τη σύνθεση και την αποδόμηση του κολλαγόνου του οστού. Το ινώδες κολλαγόνο τύπου I είναι το κύριο δομικό συστατικό των οστών, και οι μεταβολές στο μεταβολισμό του κολλαγόνου είναι επιζήμιες για τις δομικές ιδιότητες των οστών (Mansell and Bailey, 1998). Ανωμαλίες του κολλαγόνου τύπου 1 έχουν παρατηρηθεί σε καλλιέργειες

οστεοβλαστών από τα οστά ασθενών με προχωρημένη οστεοαρθρίτιδα (Couchourel D et al, 2009). Στο πειραματικό ζωικό μοντέλο παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του *Col-1a1* και του *Col-1a2* την πρώτη εβδομάδα μετεγχειρητικά. Ωστόσο, οι αλλαγές στην έκφραση του *Col-1a2* ήταν λίγο μεγαλύτερες από αυτές του *Col-1a1*. Επιπλέον, η έκφραση του *Col-4a1* αυξήθηκε την πρώτη εβδομάδα μετεγχειρητικά και στη συνέχεια μειώθηκε στις 2 εβδομάδες. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι σχετιζόμενες με το κολλαγόνο μεταβολικές αλλαγές εμφανίστηκαν με χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο στο συγκεκριμένο μοντέλο (Zhang et al, 2012).

Το κολλαγόνο τύπου 2 είναι ένα σημαντικό και ομοιόμορφα κατανομημένο στοιχείο του χόνδρου και η καταστροφή του οδηγεί σε φθορά του χόνδρου (Zhang et al, 2012). Αυξημένη έκφραση του κολλαγόνου τύπου 2 παρατηρήθηκε την πρώτη εβδομάδα μετεγχειρητικά. Έχει προταθεί ότι το κολλαγόνο τύπου 2 εκφράζεται και παράγεται από τα μεσεγχευματικά κύτταρα στο υποχόνδριο οστό και στη συνέχεια μεταφέρεται στον υπερκείμενο χόνδρο (Matyas et al, 1997). Αυτή η μεταφορά θα μπορούσε να συμβαίνει μέσω διαύλων στο υποχόνδριο οστό με σκοπό την προστασία του χόνδρου από την διάβρωση στα πολύ πρώιμα στάδια της οστεοαρθρίτιδας (Hayami et al, 2004). Επιπλέον, λόγω της αυξημένης έκφρασης των MMPs και των προ-φλεγμονωδών κυττοκινών που παρατηρήθηκε και λόγω ενδείξεων από προηγούμενη μελέτη ότι συμβάλλουν στην αποδόμηση του χόνδρου μετά από επαγωγή από το κολλαγόνο τύπου 2 (Klatt et al, 2009), συμπεραίνεται ότι το κολλαγόνο τύπου 2 που εκφράζεται στα κύτταρα του υποχόνδριου οστού ίσως εμπλέκεται στην οστική αναδιοργάνωση.

Στην μελέτη αποδείχτηκε επίσης για πρώτη φορά ότι η πλειοψηφία των χημειοκινών και των υποδοχέων τους έχουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης mRNA στα αρχικά στάδια της οστεοαρθρίτιδας. Παρομοίως, ένα υποσύνολο φλεγμονωδών κυττοκινών και των αντίστοιχων υποδοχέων τους, το οποίο εμπλέκεται στα σηματοδοτικά μονοπάτια των χημειοκινών, συμπεριλαμβανομένων των IL18, IL18BP, IL2RB, IL7R, IFN- $\gamma$ , TNFRSF9, TTRAP, JAK3, STAT1 και STAT3, επίσης είχε μειωμένη έκφραση την πρώτη εβδομάδα μετεγχειρητικά (Zhang et al, 2012). Είναι γνωστό ότι οι χημειοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στις χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις, βρίσκονται σε αφθονία εντός των φλεγμονωδών ιστών των αρθρώσεων και επηρεάζουν την

ενεργοποίηση και τη μετανάστευση των κυκλοφορούντων κυττάρων στον ιστό (Vergunst et al,2005), (Sanchez-Madrid and Pozo,1999). Επιπλέον, οι χημειοκίνες που παράγονται στο υποχόνδριο οστό μπορούν άμεσα ή έμμεσα να επάγουν τη φθορά του χόνδρου και την οστική αναδιοργάνωση κατά την πρόοδο της νόσου (Lisignoli et al,1999), (Endres et al,2010). Οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυττοκίνες παράγονται από τα κύτταρα στους πάσχοντες ιστούς της άρθρωσης, συμμετέχουν ενεργά στις λειτουργικές αλλοιώσεις στο υποχόνδριο οστό και η σχέση μεταξύ φλεγμονωδών κυττοκινών και χημειοκινών είναι περίπλοκη (Zhang et al, 2012).

Επιπρόσθετα, η έκφραση των CCL2, CCL7, CCR9 και ορισμένων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως οι IL1F8, IL1RL1,IL13ρα1και ο TNFSF9, άρχισε να αυξάνεται στις 2 ή 4 εβδομάδες μετεγχειρητικά. Ταυτόχρονα, η έκφραση ορισμένων αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως οι IL10, IFN-α4, TGF-β και ο SOCS3, μειώθηκε. Συγκεκριμένα η έκφραση της CCL2 μειώθηκε την πρώτη εβδομάδα μετεγχειρητικά και αυξήθηκε στις 2 εβδομάδες μετεγχειρητικά, υποδεικνύοντας ότι οι αλλαγές στην έκφραση των χημειοκινών ήταν χρόνο-εξαρτώμενες. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η φλεγμονή αυξάνεται σε προχωρημένα στάδια της νόσου και ίσως συμμετέχει ενεργά στην αναδιοργάνωση του υποχόνδριου οστού σε αυτό το ζωικό μοντέλο οστεοαρθρίτιδας (Zhang et al, 2012).

Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι οι χημειοκίνες διεγείρουν διάφορους κυτταρικούς τύπους στην πάσχουσα άρθρωση, προκαλώντας έτσι την παραγωγή κυτταροκινών και μεταλλοπρωτεϊνών από αυτά (Borzi et al,2000), (Yuan et al,2001). Αν και στη μελέτη παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση χημειοκινών, η έκφραση των MMPs ήταν αυξημένη από την πρώτη εβδομάδα μετεγχειρητικά, υποστηρίζοντας περαιτέρω το συμπέρασμα ότι η έκφραση των MMPs αυξάνει την οστική απορρόφηση στην οστεοαρθρίτιδα. Η Mmp3, η οποία εκφράζεται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους του οστού και συμμετέχει ενεργά στην οστική απορρόφηση και κατασκευή, είχε αυξημένα επίπεδα m-RNA και πρωτεϊνών στις 1 και 2 εβδομάδες μετεγχειρητικά σε πολυπύρηννα και μονοπύρηννα κύτταρα που παίζουν ρόλο στην παθοφυσιολογία της οστεοαρθρίτιδας στα αρχικά στάδια (Zhang et al, 2012).

Η έκφραση του *Ihh* ήταν αυξημένη στις 1 και 2 εβδομάδες και αμετάβλητη στις 4 εβδομάδες μετεγχειρητικά. Αυτή η επίδραση ήταν αποτέλεσμα χειρουργικά επαγόμενης ανισορροπίας δυνάμεων στην άρθρωση (Zhang et al, 2012). Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο *Ihh* είναι βασικός μεσολαβητής στη μεταγωγή μηχανικών σημάτων, προκαλώντας πολλαπλασιασμό και υπερτροφία των χονδροκυττάρων (Wu Q et al,2001), (Tang et al,2004). Επαναλαμβανόμενος μηχανικός φόρτος διεγείρει την έκφραση του *Ihh*, το οποίο με τη σειρά του αυξάνει τον αριθμό των αναδιπλασιαζόμενων μεσεγχυματικών κυττάρων και την παραγωγή χόνδρου (Ng TCS et al,2006). Το σηματοδοτικό μονοπάτι του *Hh* ενεργοποιείται στην οστεοαρθρίτιδα και τα αυξημένα επίπεδα του στα χονδροκύτταρα επάγουν ένα πιο σοβαρό φαινότυπο της νόσου (Lin AC et al,2009). Η συγκεκριμένη μελέτη ήταν η πρώτη που έδειξε αυξημένη έκφραση του *Ihh* στο υποχόνδριο οστό σε μοντέλο αρουραίων την πρώτη εβδομάδα μετεγχειρητικά. Σε αυτό το στάδιο οι μορφολογικές αναλύσεις αποκάλυψαν ότι δεν υπήρχε σχεδόν καμία μεταβολή στον αρθρικό χόνδρο (Zhang et al, 2012).

Η περιοστίνη (POSTN) είναι μια πρωτεΐνη που φαίνεται να επάγει την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση, ενώ είναι γνωστό ότι παίζει ουσιαστικό ρόλο στην πρόοδο της εκφύλισης των καρδιακών βαλβίδων επάγοντας την αγγειογένεση και την παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) συμπεριλαμβανομένων των MMP2 και MMP13 (Lindner et al,2005). Στην συγκεκριμένη έρευνα παρατηρήθηκε με την βοήθεια μικροσυστοιχιών ότι η έκφραση των MMP2 και MMP13 ήταν αυξημένη την πρώτη εβδομάδα μετεγχειρητικά. Επιβεβαιώθηκε επίσης με real-time PCR ότι η έκφραση του *Postn* ήταν σημαντικά αυξημένη την πρώτη εβδομάδα (Zhang et al, 2012).

Οι μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών δρουν ως βασικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης και της ομοιόστασης του οστού και του χόνδρου και παίζουν ζωτικό ρόλο στην ανάπτυξη και επιδιόρθωση του (Li X and Cao X,2006). Όταν εμφυτευτούν σε μαλακό ιστό in vivo προκαλούν το σχηματισμό ετεροτοπικού οστού μέσω ενδοχόνδριας διαδικασίας (Glaser DL et al, 2003). Μέσω μικροσυστοιχιών φάνηκε δραματική αύξηση στην έκφραση των *Bmp* (συμπεριλαμβανομένων των *Bmp1*, *Bmp3*, *Bmp4* και *Bmp5*) στο υποχόνδριο οστό την πρώτη εβδομάδα μετεγχειρητικά. Αυτές οι σημαντικές αλλαγές

υποδηλώνουν ότι ο σχηματισμός οστεοφύτων στις αρθρώσεις ίσως είναι αποτέλεσμα σηματοδότησης μέσω Bmp (Zhang et al, 2012).

Η διαφορική έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονταν στη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των οστεοβλαστών (π.χ. *Alp*, *Igf1*, *Tgf b1* και *Postn*), στη λειτουργία και τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών (π.χ. *Mmp3*, *Tnfsf11* και *Acp5*) και γνωστών γονιδίων της νόσου (π.χ. *Bmp5*, *Aspn* και *lhh*) επιβεβαιώθηκε με real-time PCR. Τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης για τα *Mmp3*, *Acp5* και *Igf1*, τα οποία εμπλέκονται στη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών, ταίριαζαν ακριβώς με τα πρότυπα έκφρασης από τις μικροσυστοιχίες. Ωστόσο, τα *Alp*, *Tgf-b1* και *Tnfsf11* δεν ήταν διαφορικά εκφρασμένα σε κανένα σημείο της real-time PCR. Όσον αφορά τα υπόλοιπα γονίδια τα αποτελέσματα της real-time PCR ταίριαζαν με αυτά των μικροσυστοιχιών σε τουλάχιστον ένα χρονικό σημείο (Zhang et al, 2012).

## **A2) Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε υποχόνδριο οστό από την κροταφογοναθική άρθρωση *bgn-10fmod-/-* ποντικών**

Σε πειραματικό μοντέλο οστεοαρθρίτιδας έγινε εφαρμογή της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών για την ταυτοποίηση αλλαγών στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης στην κροταφογοναθική άρθρωση κατά τα αρχικά στάδια της οστεοαρθρίτιδας, χρησιμοποιώντας ένα καθιερωμένο πειραματικό μοντέλο ποντικού με έλλειψη 2 πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, των FMOD και BGN (*bgn-10fmod-/-*), το οποίο είναι κατάλληλο για την ανάδειξη της χρονολογικής αλληλουχίας κυτταρικών/ιστολογικών στοιχείων που σηματοδοτούν την παθολογία της νόσου. Ανάλυση διαφορικής έκφρασης διεξήχθη με εξαγωγή RNA από 3 εβδομάδων Wild type και *bgn-10fmod-/-* ποντίκια με άθικτη διασύνδεση χόνδρου/ υποχόνδριου οστού. Συνολικά, 22 γονίδια, τα οποία ήταν διαφορικά εκφρασμένα στα *bgn-10fmod-/-* ποντίκια, θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην έναρξη της νόσου, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που εμπλέκονται στη δραστηριότητα και τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Οκτώ γονίδια είχαν μειωμένη έκφραση στα *bgn-10fmod-/-* δείγματα και περιελάμβαναν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που εμπλέκονται στην εκφύλιση του χόνδρου, όπως η HAPLN1 (hyaluronan and proteoglycan link protein 1) (M.Embree et al, 2011). Το γονίδιο *Mrpl30*, που σχετίζεται με το μεταβολισμό της ενέργειας



των μιτοχονδρίων (Pagliarini et al, 2008), είχε επίσης μειωμένη έκφραση. Γονίδια που αντιστοιχούν σε άλλες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και εμπλέκονται στην εκφύλιση του χόνδρου σε άλλα γενετικά μοντέλα ποντικών είχαν επίσης μειωμένη έκφραση στα *bgn-10fmod-1-* δείγματα, συμπεριλαμβανομένων του προκολλαγόνου τύπου IX, alpha 3, του προκολλαγόνου τύπου II, alpha 1 και του προκολλαγόνου τύπου IX, alpha 1 και της matrilin 3 (M. Embree et al, 2011).

Η ανάλυση με μικροσυστοιχίες αποκάλυψε τουλάχιστον 5 γονίδια με διαφορετική έκφραση στα *bgn-10fmod-1-* δείγματα, τα οποία σχετίζονται με τη λειτουργία/διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και τον οστικό μεταβολισμό, συμπεριλαμβανομένων, των *Cartpt*, *Sfrp1*, *Arsk*, *Slc4a1* και *Ptprv*. Ειδικότερα, το πρωτεϊνικό προϊόν του *Cartpt* εμποδίζει την οστική απορρόφηση, ρυθμίζοντας την έκφραση του *RANKL* (Elefteriou et al, 2005) και τα επίπεδα του ήταν μειωμένα στη συγκεκριμένη μελέτη. Επιπλέον, η SFRP1 (secreted frizzled-related sequence protein 1), η οποία εκφράζεται από τους οστεοβλάστες και εμποδίζει το σχηματισμό οστεοκλαστών (Hausler et al, 2004), είχε αυξημένα επίπεδα υποδηλώνοντας ότι ο οστικός μεταβολισμός ίσως είναι αυξημένος στο υποχόνδριο οστό των *bgn-10fmod-1-* ποντικών. Ο ανταλλάκτης διττανθρακικών / χλωρίου [solute carrier family 4, member 1 (*Slc4a1*)], στενά συσχετιζόμενος με το *Slc4a2*, είχε επίσης αυξημένη έκφραση στα *bgn-10fmod-1-* δείγματα. Η πρωτεΐνη του *Slc4a2* είναι ένας βασικός μεσολαβητής της διαφοροποίησης και της λειτουργίας των οστεοκλαστών (Wu et al, 2008). Στο σύνολο τους, τα ευρήματα αυτά πρότειναν ότι η δραστηριότητα των οστεοκλαστών και/ή ο οστικός μεταβολισμός ίσως αυξάνεται στο υποχόνδριο οστό των *bgn-10fmod-1-* ποντικών. Η RT-PCR επιβεβαίωσε ότι το *Cartpt* είχε μειωμένη έκφραση, ενώ τα *Ptprv* και *Slc4a1* είχαν αυξημένη έκφραση στα *bgn-10fmod-1-* δείγματα (M. Embree et al, 2011).

Άλλα γονίδια με αυξημένη έκφραση περιελάμβαναν αυτά που σχετίζονται με την κυτταροκίνηση των χονδροκυττάρων (*Pfn1*), τη διάσπαση της β-σεκρετάσης (*Bace1*), τη διέγερση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (*Angptl7*), τη φλεγμονή και το μεταβολισμό των λιπιδίων (*Rps19*), την ερυθροποίηση (*Ahsp*) και την κυτταρική προσκόλληση/ κινητικότητα (*Tspan33*) (M. Embree et al, 2011).

Το *RANKL* παράγεται πρωτίστως από τα οστεοκύτταρα, τους οστεοβλάστες και/ ή από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού και είναι ένας παράγοντας κλειδί για τη διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών. Το *RANKL* προσδένεται στο *OPG*, γνωστό και ως ανασταλτικός παράγοντας της οστεοκλαστογένεσης και αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα *RANK* για να ρυθμίσει το επίπεδο δραστηριότητας των οστεοκλαστών καθώς και την οστική ομοιόσταση σε απάντηση σε κάποια κυτταροκίνη ή σε ενδοκρινικό ερέθισμα ή σε παρακρινικό ερέθισμα ή σε μηχανικές καταπονήσεις (Nakashima et al, 2011).

Για να εξεταστεί η δραστηριότητα των οστεοκλαστών στα *bgn-10fmod-1-* ποντίκια, χρησιμοποιήθηκαν TRAP χρώσεις στο υποχόνδριο οστό και ποσοτική RT-PCR για τα *OPG* και *RANKL*. Σε συμφωνία με τα ευρήματα των μικροσυστοιχιών παρατήρησαν αυξημένη χρώση TRAP ειδικά εντοπιζόμενη στη διασύνδεση χόνδρου/υποχόνδριου οστού, η οποία υποδηλώνει ενεργό οστικό μεταβολισμό σε αυτή την περιοχή. Παρομοίως, παρατήρησαν μια αύξηση κατά 128% στην αναλογία γονιδιακής έκφρασης *OPG/RANKL* στα *bgn-10fmod-1-* δείγματα, η οποία θα μπορούσε να προκαλεί αυξημένο μεταβολισμό στο υποχόνδριο οστό στα *bgn-10 fmod-1-* ποντίκια. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, αυξάνεται η πιθανότητα η σχέση μεταξύ χόνδρου και υποχόνδριου οστού κατά τις νεώτερες ηλικίες να είναι κρίσιμη για την διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού. Η διατάραξη του μεταβολισμού του οστού και του χόνδρου στα νεότερα *bgn-10fmod-1-* ποντίκια θα μπορούσε να διαταράσσει το μεταβολισμό των ιστών της άρθρωσης και να προδιαθέτει τα ποντίκια σε όψιμης έναρξης φαινότυπο οστεοαρθρίτιδας που είχε προηγούμενα αναφερθεί σε μεγαλύτερης ηλικίας *bgn-10fmod-1-* ποντίκια, με σχηματισμό οστεοφύτων, σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού της κροταφογναθικής άρθρωσης και εκφυλισμό του χόνδρου (M. Embree et al, 2011).

Συνολικά, έδειξαν για πρώτη φορά ότι τα *Bgn* και *Fmod* είναι κριτικής σημασίας για την ακεραιότητα του υποχόνδριου οστού της κροταφογναθικής άρθρωσης και ίσως παίζουν ρόλο στο μεταβολισμό του υποχόνδριου οστού στα αρχικά στάδια της οστεοαρθρίτιδας σε αυτό το ζωικό μοντέλο (M. Embree et al, 2011).

### **A3) Μελέτη γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση μικροσυστοιχιών σε δείγματα οστού από την περιοχή του εγγύς μηριαίου ασθενών με οστεοαρθρίτιδα**

Σε μελέτη γονιδιακής έκφρασης, διερευνήθηκε η μοριακή βάση των αλλαγών που υφίσταται το οστό με εφαρμογή της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών σε δείγματα οστού από άτομα χωρίς ένδειξη αρθρικής νόσου (μάρτυρες) καθώς και από άτομα που θα υποβάλλονταν σε αρθροπλαστική για εκφυλιστική οστεοαρθρίτιδα ισχίου ή κάταγμα στον αυχένα του μηριαίου οστού λόγω οστεοπόρωσης. Τα δείγματα των πασχόντων από οστεοπόρωση συμπεριλήφθησαν, διότι έχει παρατηρηθεί μια ανάστροφη συσχέτιση αναφορικά με την οστική πυκνότητα ανάμεσα στην οστεοαρθρίτιδα και στη χαμηλής πυκνότητας νόσο, οστεοπόρωση. Τα δείγματα σπογγώδους οστού σε αυτή την μελέτη περιελάμβαναν όλα τα κυτταρικά στοιχεία του οστού, συμπεριλαμβανομένου του μυελού των οστών. Αυτό ήταν αντιπροσωπευτικό της γονιδιακής έκφρασης στο οστό με συνεισφορές από όλα τα διαφορετικά κύτταρα του μικροπεριβαλλοντός του (Horwood et al, 2007).

Συνολικά 150 διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια προσδιορίστηκαν στο πάσχον οστό και η διαφορική έκφραση 25 από αυτών επιβεβαιώθηκε με ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου. Ένας μεγάλος αριθμός των γονιδίων με τη μεγαλύτερη διαφορά στην γονιδιακή έκφραση έχουν γνωστό ή άγνωστο ρόλο στη λειτουργία και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, των οστεοκυττάρων και των οστεοκλαστών. Πολλά από αυτά τα γονίδια είναι στόχοι είτε του σηματοδοτικού μονοπατιού του WNT (*TWIST1*, *IBSP*, *S100A4*, *MMP25*, *RUNX2* και *CD14*) είτε του σηματοδοτικού μονοπατιού του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα TGF-β/ της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών BMP (*ADAMTS4*, *ADM*, *MEPE*, *GADD45B*, *COL4A1* και *FST*). Άλλα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια περιελάμβαναν ρυθμιστικά γονίδια ή γονίδια που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια του WNT (*WNT5B*, *NHERF1*, *CTNNB1* και *PTEN*) και του TGF-β/BMP (*TGFB1*, *SMAD3*, *BMP5* και *INHBA*). Επιπρόσθετα, μια ομάδα γονιδίων που εμπλέκονται στην λειτουργία των οστεοκλαστών (*GSN*, *PTK9*, *VCAM1*, *ITGB2*, *ANXA2*, *GRN*, *PDE4A* και *FOXP1*), προσδιορίστηκαν ως διαφορικά εκφρασμένα μεταξύ ανδρών και

γυναικών με οστεοαρθρίτιδα. Η διαφορετική έκφραση μεταξύ αυτών των ομάδων γονιδίων υποδηλώνει τροποποιημένη οστική αναδιοργάνωση και μπορεί εν μέρει να εξηγήσει τη διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δυο φύλων (Horwood et al, 2007).

Σημαντικό είναι ότι οι αλλαγές στην έκφραση της ομάδας γονιδίων που παίζουν ρόλο στη λειτουργία και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών υποδεικνύουν τροποποιημένη δραστηριότητα αυτών των κυττάρων στο πάσχον οστό, η οποία είναι σύμφωνη με τον αυξημένο όγκο οστού και τη μειωμένη εναπόθεση ασβεστίου που προηγουμένως αναφέρθηκαν. Για παράδειγμα, η *MEPE* (φωσφογλυκοπρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας), η οποία είναι υψηλά εκφρασμένη στους οστεοβλάστες και στα οστεοκύτταρα, φαίνεται να είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του οστικού σχηματισμού και της εναπόθεσης ασβεστίου. Στοχευμένη αποσιώπηση του *MEPE* έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε αύξηση του οστικού σχηματισμού και σε αυξημένη οστική μάζα (Gowen LC et al, 2003). Η έκφραση του *MEPE* βρέθηκε μειωμένη στο πάσχον οστό και το συγκεκριμένο εύρημα είναι σε συμφωνία με την αύξηση του όγκου του σπογγώδους οστού στην οστεοαρθρίτιδα (Horwood et al, 2007).

Το γονίδιο *MMP25* (αυξημένη έκφραση στο πάσχον οστό) κωδικοποιεί μια μεταλλοπρωτεϊνάση, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της *MMP2*, η οποία επιδρά στα οστεοκύτταρα, ενώ τα *MMP2*-/- ποντίκια παρουσιάζουν διαταραγμένα δίκτυα οστεοκυττάρων, τροποποιημένη οστική αναδιοργάνωση και ασβεστοποίηση καθώς και ένα περίπλοκο φαινότυπο, που περιλαμβάνει μειωμένο όγκο στα μακρά οστά (Inoue K et al, 2006). Η αυξημένη έκφραση του *MMP25* στο οστεοαρθρικό οστό είναι σύμφωνη με την αυξημένη δραστηριότητα της *MMP2* και τον αυξημένο οστικό όγκο (Horwood et al, 2007).

Υπήρχε επίσης μια ομάδα διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων που αναγνωρίστηκαν στο πάσχον οστό, τα οποία έχουν γνωστούς ή πιθανούς ρόλους στη λειτουργία των οστεοκλαστών. Ωστόσο, η συνολική αλλαγή στην έκφραση αυτών των γονιδίων σαν ομάδα δεν ήταν εξίσου συνεπής με την ομάδα γονιδίων με δράσεις συσχετιζόμενες με τους οστεοβλάστες. Για παράδειγμα, η αλλαγή στην έκφραση ενός υποσυνόλου αυτών των γονιδίων (*ADAMTS4*, *GADD45B*, *IGFBP3* και *CSTA*) είναι σύμφωνη με τη μειωμένη

δραστηριότητα οστεοκλαστών και τον αυξημένο οστικό όγκο στην οστεοαρθρίτιδα, ενώ η αλλαγή στην έκφραση ενός άλλου υποσυνόλου αυτών των συσχετιζόμενων με οστεοκλάστες γονιδίων (*ADAM8*, *STC1*, *CCR2*, *RAC2*, *CRYAB*, *CYP1B*, *CD14*, *PTEN*, *ANXA2* και *GSN*) υποδεικνύει αυξημένη δραστηριότητα οστεοκλαστών (Horwood et al, 2007). Αρχίζει να γίνεται ξεκάθαρο ότι ενώ οι οστεοβλάστες είναι στενά εμπλεκόμενοι στη λειτουργία και τη διαφοροποίηση της γενεαλογικής σειράς των οστεοκλαστών (Atkins et al, 2005), το αντίστροφο μπορεί επίσης να συμβαίνει (Kim et al, 2006), (Karsdal et al, 2005). Ως αποτέλεσμα η διαταραγμένη γονιδιακή έκφραση των οστεοβλαστών ή των οστεοκλαστών θα μπορούσε να οδηγήσει σε περίπλοκες αλλαγές στην επικοινωνία μεταξύ αυτών των κυτταρικών τύπων και στη συμπεριφορά τους στην οστική ανακατασκευή. Ως εκ τούτου, η διαφορική έκφραση ενός υποσυνόλου γονιδίων που συσχετίζονται με τους οστεοκλάστες και η αυξημένη δραστηριότητα αυτών είναι σύμφωνη με τα αυξημένα επίπεδα οστικού ανασχηματισμού που έχουν παρατηρηθεί στο οστεοαρθρικό οστό και ίσως με ένα καθαρό κέρδος υπό-ασβεστοποιημένου οστού και όχι με απώλεια οστικού όγκου όπως παρατηρείται στην οστεοπόρωση (Horwood et al, 2007).

Σημαντικές σχέσεις μεταξύ της οστικής αναδιοργάνωσης και της αγγειογένεσης επίσης αναδύονται και έτσι οι διαταραχές στα αγγειογενετικά μοριακά μονοπάτια θα μπορούσαν να συμβάλλουν στις αλλαγές στο πάσχον οστό. Σε συμφωνία με ένα ρόλο στην αυξημένη αγγειογένεση στο οστό, που οδηγεί σε αυξημένο οστικό όγκο και πιθανόν σε αυξημένο μεταβολισμό, είναι η αυξημένη έκφραση της ομάδας των γονιδίων με αναγνωρισμένες προ-αγγειογενετικές λειτουργίες (*MMP25*, *S100A4*, *FOSB*, *TFF3*, *CTSG* και *LTB*) και η μειωμένη έκφραση μιας ομάδας γονιδίων, η οποία επηρεάζει αρνητικά την αγγειογένεση (*HIG2*, *ADAMTS4*, *ANGPTL4*, *STC1*, *KLF6*, *IGFBP3*, *TIMP4* και *GDF15*) (Horwood et al, 2007).

Επιπρόσθετα, ένα υποσύνολο αυτών των γονιδίων με ρόλους στους οστεοβλάστες, ιδιαίτερα αυτών που κωδικοποιούν εκκρινόμενες ουσίες της κυτταρικής επιφάνειας και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, συμπεριλαμβανομένων των *ADM*, *IBSP*, *MMP25*, *STC1*, *IGFBP3*, *WNT5B*, *FST*, *TGFB1*, *BMP5* και *INHBA*, έχει δυνητικά χονδρογενείς λειτουργίες. Η τροποποιημένη έκφραση πολλών από αυτών είναι συνεπής με την πρόταση

ότι η τροποποιημένη έκφραση αυτών των γονιδίων στους οστεοβλάστες στο μικροπεριβάλλον του υποχόνδριου οστού θα μπορούσε να παρεμβαίνει στο μεταβολισμό των χονδροκυττάρων ή του χόνδρου (Horwood et al, 2007). Για παράδειγμα, το *ADM*, το οποίο έχει ελαττωμένη έκφραση στο οστό στην οστεοαρθρίτιδα, επάγει την χονδρογένεση (Cornish et al, 2009). Ελαττωμένα επίπεδα της *ADM* θα μπορούσαν να έχουν αρνητική επίδραση στον μεταβολισμό των χονδροκυττάρων/ χόνδρου (Horwood et al, 2007).

**Πίνακας 2: Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια στο οστεοαρθρικό οστό (Horwood et al, Arthritis Research & Therapy 2007)**

<b>Οστική αναδιοργάνωση, οστεοβλάστες: Αυξημένη ρύθμιση στο οστεοαρθρικό οστό</b>	
<b><i>S100A4</i></b>	Αρνητικός ρυθμιστής της εναπόθεσης ασβεστίου
<b><i>MMP25</i></b>	Μεταλλοπρωτεϊνάση που ενεργοποιεί την MMP2
<b>Οστική αναδιοργάνωση, οστεοβλάστες: Μειωμένη ρύθμιση στο οστεοαρθρικό οστό</b>	
<b><i>MEPE</i></b>	Πρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας με υψηλή έκφραση στα οστεοκύτταρα
<b><i>IBSP</i></b>	Κύρια συνιστώσα του οστεύνα που θεωρείται ότι ξεκινά και ρυθμίζει την εναπόθεση ασβεστίου
<b><i>MT2A</i></b>	Πρωτεΐνες μεταλλοθειονίνης με ρόλους στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και στην εναπόθεση ασβεστίου
<b><i>ADM</i></b>	Η adrenomedullin διεγείρει την οστεοβλαστική δραστηριότητα. Επίσης, αλληλεπιδρά με και επηρεάζει τον IGF1 και τον TGF-β.
<b><i>STC1</i></b>	Η stanniocalcin εμποδίζει την πρόσληψη ασβεστίου και έχει ανασταλτική επίδραση στην οστική αύξηση κατά την ανάπτυξη.

<b>IGFBP3</b>	Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί, παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και τον οστικό σχηματισμό.
<b>GADD45B</b>	Ποντίκια με έλλειμμα στην πρωτεΐνη που κωδικοποιεί, έχουν ελαττωματική εναπόθεση ασβεστίου.
<b>ADAMTS4</b>	Μεταλλοπρωτεϊνάση που εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας.
<b>LTF</b>	Η λακτοτρανσφερίνη είναι ένας αναβολικός οστικός παράγοντας.
<b>DF</b>	Η αδιψίνη εμποδίζει την οστεοβλαστογένεση
<b>Οστική αναδιοργάνωση, οστεοκλάστες: Αυξημένη ρύθμιση στο οστεοαρθρικό οστό</b>	
<b>ADAM8</b>	Διεγερτικός ρόλος στον σχηματισμό και τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών.
<b>CCR2</b>	Υποδοχέας του (CCL)2, που προωθεί τη στρατολόγηση και τη σύντηξη των μονοκυττάρων/πρόδρομων οστεοκλαστών.
<b>RAC2</b>	Μέλος της οικογένειας Rho-GTPase. Εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και στην προσκόλληση των οστεοκλαστών στο οστό.
<b>CD14</b>	Δείκτης μονοκυττάρων/πρόδρομων οστεοκλαστών. Ποντίκια με έλλειψη CD14 έχουν αυξημένη οστική μάζα.
<b>ANXA2</b>	Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των πρόδρομων οστεοκλαστών μέσω της παραγωγής GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) και RANKL (receptor activator of nuclear factor-κB ligand)
<b>GSN</b>	Έλλειψη Gelsolin στα ποντίκια εμποδίζει την συναρμολόγηση ποδοσωμάτων στους οστεοκλάστες και οδηγεί σε αυξημένη οστική μάζα.

<b>ITGB2</b>	Μόριο προσκόλλησης σημαντικό στις διακυτταρικές επαφές κατά τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των οστεοκλαστών
<b>Οστική αναδιοργάνωση, οστεοκλάστες: Μειωμένη ρύθμιση στο οστεοαρθρικό οστό</b>	
<b>IGFBP3</b>	Η υπερέκφραση του στα ποντίκια αυξάνει τον αριθμό των οστεοκλαστών και την οστική απορρόφηση.
<b>STC1</b>	Η Stanniocalcin καταστέλλει τη δραστηριότητα των οστεοκλαστών
<b>PTEN</b>	Η υπερέκφραση του καταστέλλει τη διεγερθείσα από το RANKL μεταγωγή σήματος κατά την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών
<b>FOXP1</b>	Μεταγραφικός καταστολέας με ρόλο στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των μονοκυττάρων.
<b>PDE4A</b>	Μειωμένη έκφραση κατά τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα/οστεοκλάστες
<b>Ρυθμιστές και συμμετέχοντες στο μονοπάτι του WNT: Αυξημένη ρύθμιση στο οστεοαρθρικό οστό</b>	
<b>WNT5B</b>	WNT προσδέτης με ρόλους στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και των χονδροκυττάρων.
<b>CTNNB1</b>	Ποντίκια με έλλειψη β-κατενίνης στους οστεοβλάστες αναπτύσσουν σοβαρή οστεοπενία με αυξημένη οστεοκλαστογένεση και διαταραγμένη οστεοβλαστογένεση.
<b>AKT3</b>	Μέλος της οικογένειας της AKT κινάσης. Παίζει ρόλο στη ρύθμιση της διάρκειας ζωής των οστεοβλαστών.
<b>NHERF1</b>	Διαμεσολαβεί στη σηματοδότηση του υποδοχέα της παραθορμόνης. Αλληλεπιδρά με την β-κατενίνη ενδυναμώνοντας τις επιπτώσεις της PTH στην WNT σηματοδότηση στο οστό.



<b>Ρυθμιστές και συμμετέχοντες στο μονοπάτι WNT: Μειωμένη ρύθμιση στο οστεοαρθρικό οστό</b>	
<b>FZD3</b>	WNT5B συνυποδοχέας
<b>PTEN</b>	Διαμορφώνει/ ανταγωνίζεται την WNT σηματοδότηση. Ρόλους στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών.
<b>APC</b>	Απώλεια του στα ποντίκια οδηγεί σε αυξημένη οστική μάζα.
<b>AXIN2</b>	Αρνητική ρύθμιση της ωρίμανσης των οστεοβλαστών μέσω της διαμόρφωσης της σηματοδότησης WNT.
<b>Ρυθμιστές και συμμετέχοντες στο μονοπάτι TGF-β/BMP: Αυξημένη ρύθμιση στο οστεοαρθρικό οστό</b>	
<b>ACVR1</b>	Υποδοχέας των BMP και ακτιβίνης A. Μετάλλαξη στον υποδοχέα οδηγεί σε έκτοπη οστεογένεση.
<b>SMAD3</b>	Σημαντικός μεσολαβητής της σηματοδότησης του TGF-β και ρυθμιστής της οστεοβλαστογένεσης και του οστικού σχηματισμού.
<b>ID1</b>	Μεταγραφικός παράγοντας με ρόλους στον οστικό σχηματισμό καθώς και στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών.
<b>RUNX2</b>	Μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στην προώθηση της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών.
<b>Ρυθμιστές και συμμετέχοντες στο μονοπάτι TGF-β/ BMP: Μειωμένη ρύθμιση στο οστεοαρθρικό οστό</b>	
<b>TGFB1</b>	Αυξητικός παράγοντας με ρόλο κλειδί στη ρύθμιση της οστικής ανάπτυξης και του μεταβολισμού.
<b>INHBA</b>	Μέλος της οικογένειας TGF-β. Μπορεί να δράσει ως αναστολέας ή ενεργοποιητής του οστικού σχηματισμού και της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών.

<b>BMP5</b>	Σηματοδοτικό μόριο που εμπλέκεται στη σκελετική ανάπτυξη και έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση οστεοαρθρίτιδας
<b>FST</b>	TGF-β/BMP ανταγωνιστής που εμποδίζει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών.

Μια άλλη σημαντική παρατήρηση από αυτή την μελέτη είναι ότι πολλά από τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια που προσδιορίστηκαν στο οστό με ρόλους στους οστεοβλάστες, στους οστεοκλάστες και στα οστεοκύτταρα, ήταν γονίδια στόχοι των μονοπατιών του WNT ή του TGF-β/BMP. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε σε αναγνώριση επιπρόσθετων ομάδων διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων, τα οποία είναι συνιστώσες ή τροποποιητικά γονίδια των παραπάνω μονοπατιών και τα οποία είναι επομένως πιθανόν να παίζουν ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Και τα δύο μονοπάτια επηρεάζουν την οστική μάζα και την οστική αναδιοργάνωση, ελέγχοντας τη λειτουργία και τη διαφοροποίηση και των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών (Hopwood et al, 2007).

Η σηματοδότηση WNT, από άποψη οστικής μάζας και οστικής αναδιοργάνωσης, είναι μια πολύ περίπλοκη διαδικασία, η οποία βασίζεται στην συνεργασία ενός μεγάλου αριθμού συνδετών, των υποδοχέων τους, των επικρατουςών ανταγωνιστών και συγκεκριμένων συνδυασμών β-κατενίνης / συμπλόκων μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι τελικά ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων στόχων. Έχει ενδιαφέρον ότι το μόνο γονίδιο που κωδικοποιεί ένα WNT συνδέτη, το *WNT5B*, η έκφραση του οποίου ήταν αυξημένη στην συγκεκριμένη μελέτη, έχει επίσης βρεθεί ότι έχει αυξημένη έκφραση κατά την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών *in vitro*. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το *WNT5B* είναι γνωστό ότι έχει και διεγερτικές και ανασταλτικές επιδράσεις στα κύτταρα του οστού και του χόνδρου ανάλογα με τον υποδοχέα πρόσδεσης στην κυτταρική επιφάνεια (Hurson CJ et al, 2007). Μαζί με το *WNT5B* υπήρχαν αρκετά άλλα σημαντικά γονίδια συσχετιζόμενα με το WNT μονοπάτι, τα οποία είχαν τροποποιημένη έκφραση στο οστεοαρθρικό οστό. Το γονίδιο για τον συνυποδοχέα του *WNT5B*, *FZD3* και το γονίδιο για τον εξωκυττάριο ανταγωνιστή του WNT, *SFRP5*, είχαν χαμηλή έκφραση στους πάσχοντες σε σχέση με τους μάρτυρες, υποδεικνύοντας αυξημένη WNT σηματοδότηση. Η χαμηλή έκφραση των γονιδίων *PTEN*, *APC* και *AXIN2* και η αυξημένη έκφραση των *CTNNB1*, *AKT3* και *NHERF1* είναι

επίσης σε συμφωνία με αυξημένη WNT σηματοδότηση (Hopwood et al, 2007). Το *CTNNB1* κωδικοποιεί την β-κατενίνη, η οποία είναι ο κεντρικός μεσολαβητής της κανονικής WNT σηματοδότησης (Logan and Nusse, 2004), ενώ τα γονιδιακά προϊόντα των *PTEN*, *APC*, *AXIN2*, *AKT3* και *NHERF1* ρυθμίζουν την δραστηριότητα της β-κατενίνης.

Όπως η σηματοδότηση WNT, η TGF-β/BMP σηματοδότηση είναι περίπλοκη με μια μεγάλη οικογένεια συνδετών, υποδοχέων και ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μορίων να εμπλέκονται στο μονοπάτι, ασκώντας και διεγερτικές και ανασταλτικές επιδράσεις στην οστική αναδιοργάνωση. Αρκετά ρυθμιστικά γονίδια και γονίδια συνιστώσες του TGF-β/BMP μονοπατιού που επηρεάζουν τη λειτουργία των οστεοβλαστών, την οστική αναδιαμόρφωση και την ασβεστοποίηση των οστών, βρέθηκαν τροποποιημένα στο πάσχον οστό. Αυτά περιλαμβάνουν τα *TGFB1*, *INHBA*, *ACVR1*, *BMP5*, *FST* και *SMAD3* (Hopwood et al, 2007).

Η β-κατενίνη, η *SMAD3* και ο *RUNX2* πιθανόν παίζουν σημαντικό ρόλο στις διαφορές μεταξύ των μονοπατιών είτε μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων είτε ως σύμπλοκα με μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας TCF/LEF στον πυρήνα (Jian et al, 2006), (Reinhold and Naski, 2007), (Labbe et al, 2000), (Kahler and Westendorf, 2003). Ο *RUNX2* κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που παίζει ρόλο στη μεσολάβηση και των δυο σηματοδοτικών μονοπατιών και είναι ουσιώδης στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και στη σκελετική ανάπτυξη (Gaur et al, 2005). Στη μελέτη παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του *RUNX2* στο πάσχον οστό, η οποία είναι σύμφωνη με την αυξημένη διαφοροποίηση και δραστηριότητα των οστεοβλαστών (Hopwood et al, 2007).

Επίσης τα προϊόντα μερικών διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων, όπως τα *TWIST1* (twist homologue 1), *FOXF1* (forkhead box F1), *ID1* (inhibitor of DNA binding 1), *HDAC4* (histone deacetylase 4) και *SMAD3*, αποδείχθηκε ότι τροποποιούν την έκφραση του *RUNX2* ή αλληλεπιδρούν με το *RUNX2* και τροποποιούν τη λειτουργία του (Hopwood et al, 2007). Η *SMAD3* είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής της ρύθμισης των μηχανικών ιδιοτήτων και της σύστασης του οστού από τον TGF-β (Balooch et al, 2005). Ο TGF-β καταστέλλει τον *RUNX2* και ένας από τους τρόπους είναι μέσω της επιστράτευσης της αποακετυλάσης των ιστονών *HDAC4* από τη *SMAD3*

(Horwood et al, 2007). Ωστόσο, η υπερέκφραση του *SMAD3* έχει αναφερθεί ότι επάγει την έκφραση του *RUNX2* και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Kaji H et al, 2006). Είναι σημαντικό ότι αρκετά από τα γονίδια με τη μεγαλύτερη διαφορά στην έκφραση που προσδιορίστηκαν στη μελέτη είναι στόχοι του *RUNX2* και της *SMAD3*, όπως τα *GADD45B*, *ADAMTS4* και *MEPE* (Horwood et al, 2007).

Άλλα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια ήταν τα γονίδια που κωδικοποιούν εκκρινόμενα μόρια (*ADM*, *ANGPTL4*, *STC1*, *CORT*, *IGFBP3* και *MIF*), μόρια κυτταρικής επιφάνειας (*SELL*, *ICAM3*, *SELP*, *CRIM1*, *CLECSF6*, *CLECSF2*, *CCR2* και *SLC14A1*), ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μόρια (*RAB20*, *YWHAG*, *RAC2*, *NHERF1*, *GNA11* και *SNX9*), πρωτεϊνικές κινάσες (*AKT3* και *PRKCD*), πρωτεΐνες δέσμησης ιόντων ασβεστίου και μετάλλων (*S100A4*, *S100A6*, *MT1L*, *MT2A* και *MT1G*), μεταγραφικούς παράγοντες (*TWIST1*, *FMR2*, *KLF6*, *NR4A2* και *DEC1*) και εξωκυττάρια μόρια με ενζυμικό (*ADAMTS4*, *MMP25*, *ADAM8*, *TIMP4*, *GALNT4* και *CTSG*) και δομικό (*TGFBI*, *IBSP*, *MEPE*, *MFAP3L* και *COL4A1*) ρόλο (Horwood et al, 2007).

Οι μοριακοί μηχανισμοί, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την υψηλότερη συχνότητα της νόσου στις γυναίκες δεν είναι γνωστοί. Τα γονίδια μπορεί να λειτουργούν διαφορετικά στα 2 φύλα, σε διαφορετικά σημεία του σώματος και σε διαφορετικά χαρακτηριστικά της νόσου (Spector and MacGregor, 2004). Έχει ενδιαφέρον ότι από τις σχετικά μικρές διαφορές μεταξύ ανδρών και γυναικών που εντοπίστηκαν στο οστό σε αυτή την μελέτη, υπήρχε ένας σημαντικός αριθμός γονιδίων που εμπλέκονταν στη λειτουργία των οστεοκλαστών (π.χ. *ANXA2*, *GSN*, *ITGB2*, *FOXP1* και *PDE4A*) και των οστεοβλαστών (π.χ. *LTF*, *DF* και *TGFB1*) και ως εκ τούτου στην οστική αναδιοργάνωση. Συνολικά, η διαφορετική έκφραση αυτών των γονιδίων είναι σε συμφωνία με τον αυξημένο οστικό μεταβολισμό στις γυναίκες με οστεοαρθρίτιδα συγκριτικά με τους άνδρες υποδεικνύοντας ένα μηχανισμό πρόκλησης της νόσου και ίσως εν μέρει αιτιολογεί την υψηλότερη συχνότητα οστεοαρθρίτιδας στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες (Horwood et al, 2007).

Μερικά από τα γονίδια με τη μεγαλύτερη διαφορά στην έκφραση μεταξύ των πασχόντων γυναικών και ανδρών, αποτελούν συνιστώσες του σηματοδοτικού μονοπατιού *WNT*, όπως το *WNT5B* και οι μεταγραφικοί

παράγοντες *EAF2* και *CTBP2*. Επιπρόσθετα, τα *MMP25* και *ITGB2* είναι γονίδια-στόχοι του μονοπατιού του WNT, υποδεικνύοντας μια διαφορά μεταξύ των 2 φύλων στο μονοπάτι του WNT, η οποία μπορεί να έχει αντίκτυπο στο μικροπεριβάλλον του οστού στην οστεοαρθρίτιδα (Horwood et al, 2007). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις συσχέτισης μεταξύ του μονοπατιού του WNT και του μονοπατιού των οιστρογόνων μέσω λειτουργικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της β-κατενίνης και του α υποδοχέα των οιστρογόνων (Kouzmenko et al, 2004). Μερικά γονίδια στη μελέτη συμπεριλαμβανομένων των *WNT5B*, *ITGB2*, *GSN*, *VCAM1*, *LTF* και *DF*, επηρεάζονται από τα οιστρογόνα, παρέχοντας ένα πιθανό μηχανισμό με τον οποίο θα μπορούσε να εξηγηθεί η διαφορετική έκφραση των γονιδίων ανάμεσα στις γυναίκες και τους άνδρες (Horwood et al, 2007).

#### **A4) Μελέτη γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα οστού από τη λαγόνια ακρολοφία πασχόντων από οστεοαρθρίτιδα**

Η λαγόνια ακρολοφία είναι μια σκελετική περιοχή με υψηλό μεταβολισμό. Οι λαγόνιες ακρολοφίες από άτομα με οστεοαρθρίτιδα έχουν αυξημένη οστική πυκνότητα, αυξημένο πάχος φλοιού, αυξημένο όγκο και ποσοστό σπογγώδους οστού, καθώς και αυξημένο πλάτος δοκίδων (Raymaekers et al, 1992), (Boyde et al, 1995), (Gevers et al, 1989). Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των δειγμάτων του σπογγώδους οστού από τη λαγόνια ακρολοφία των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα που συλλέχτηκαν σε χειρουργικές επεμβάσεις ασθενών που υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική ισχίου λόγω οστεοαρθρίτιδας, ηλικιωμένων που υπεβλήθησαν σε αρθροπλαστική για υποκεφαλικό κάταγμα του μηριαίου αυχένα (μάρτυρες) και νεότερων δοτών που υπεβλήθησαν σε αρθρόδεση σπονδυλικής στήλης λόγω δυσκοπότητας (μάρτυρες), ερευνήθηκαν μέσω μικροσυστοιχιών ολιγονουκλεοτιδίων. Τα δείγματα συλλέχτηκαν από ασθενείς με τελικού σταδίου οστεοαρθρίτιδα και οι παρατηρηθείσες διαφορές στη γονιδιακή έκφραση θα μπορούσαν να είναι δευτερεύουσες της νόσου. Ωστόσο, αυτό είναι απίθανο αφού χρησιμοποίησαν οστό από μια θέση που βρίσκεται σε απόσταση από την προσβεβλημένη άρθρωση και έχει μικρή λειτουργία μεταφοράς βάρους. Για την επαλήθευση των πληροφοριών από τις μικροσυστοιχίες, εφαρμόστηκαν δοκιμασίες RT-PCR (Sanchez-Sabate et al, 2009).

Με τη βοήθεια των μικροσυστοιχιών ελέχθησαν 8327 γονίδια και αναγνωρίστηκαν 83 των οποίων τα επίπεδα έκφρασης διέφεραν τουλάχιστον κατά 1.5 φορές στην ομάδα με οστεοαρθρίτιδα. Συγκρίσεις των πληροφοριών από τη RT-PCR μεταξύ της ομάδας με οστεοαρθρίτιδα και των δυο ομάδων δοτών έδειξαν διαφορική έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στις λειτουργίες των κυττάρων του οστού στην ομάδα των πάσχόντων από οστεοαρθρίτιδα. Τα γονίδια που αναγνωρίστηκαν, όπως τα *CCL2*, *FOS*, *PRSS11*, *DVL2*, *AKT1*, *CA2*, *BMP6*, *OMD*, *MMP2*, *TGFBR3*, *FLT1*, *BMP1* και *TNFRS11B*, έχουν γνωστούς ρόλους στις δραστηριότητες των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών. Τα επίπεδα κολλαγόνου και οστεοκαλσίνης ή οι τοπικοί αυξητικοί παράγοντες, όπως οι ινσουλινομορφοί αυξητικοί παράγοντες τύπου I και II και ο TGF- $\beta$ , αυξήθηκαν, ενώ οι πρωτεογλυκάνες ήταν μειωμένες στα δείγματα οστών από αυτή τη σκελετική περιοχή στους πάσχοντες από οστεοαρθρίτιδα. Ως εκ τούτου, οι βιοχημικές αλλαγές σε αυτό τον ιστό έχουν προταθεί ότι υπόκεινται των αλλαγών στη μικροαρχιτεκτονική του πάσχοντος οστού και των μηχανικών ιδιοτήτων του (Sanchez-Sabate et al, 2009).

Το γονίδιο *PRSS11* κωδικοποιεί μια εκκρινόμενη πρωτεάση και η γονιδιακή του έκφραση (επίπεδα mRNA και πρωτεϊνικά επίπεδα) είναι αυξημένη στον αρθρικό χόνδρο των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα (Hu et al, 1998). Η παραγωγή του έχει αποδοθεί στους οστεοβλάστες στα τελικά στάδια διαφοροποίησης και στα ώριμα οστεοκύτταρα που ενσωματώνονται στο οστό. Στα ποντίκια η δραστηριότητα του εμποδίζει τη σηματοδότηση του TGF- $\beta$  (Oka C et al, 2004), ενώ τα επίπεδα των πρωτεϊνών TGF- $\beta$ 1 και TGF- $\beta$ 2 είναι υψηλότερα στα δείγματα του πάσχοντος οστού από ανατομικές περιοχές που βρίσκονται σε απόσταση από την προσβεβλημένη άρθρωση (Hering S et al, 2001). Ως εκ τούτου τα υψηλότερα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης του *PRSS11* ίσως λειτουργούν ως αντισταθμιστικός μηχανισμός στην οστεοαρθρίτιδα με το *PRSS11* να ρυθμίζει τα επίπεδα αυτών των αυξητικών παραγόντων μέσω της πρωτεολυτικής του δραστηριότητας.

Το γονίδιο *FOS* κωδικοποιεί τον C-FOS, που αποτελεί μια συνιστώσα της AP-1 (activator protein-1), η οποία ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση ειδικά στους οστεοκλάστες. Ποντίκια χωρίς το γονίδιο *Fos* αναπτύσσουν οστεοπέτρωση (Janssens and Van Hul, 2002), η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη σκελετική μάζα λόγω ελαττωμάτων στη λειτουργία των οστεοκλαστών. Έχει

ενδιαφέρον ότι οι ασθενείς με οστεοπέτρωση βρίσκονται σε κίνδυνο για ανάπτυξη οστεοαρθρίτιδας, υποστηρίζοντας τη σχέση μεταξύ της αυξημένης σκελετικής μάζας και του κινδύνου ανάπτυξης οστεοαρθρίτιδας (Stricklan and Berry,2005). Ως εκ τούτου, η μειωμένη έκφραση του *FOS* στο οστεοαρθρικό οστό θα μπορούσε να αντανακλά την μειωμένη δραστηριότητα των οστεοκλαστών (Sanchez-Sabate et al, 2009).

Η *AKT1* είναι μια από τις ισομορφές της *AKT* πρωτεΐνης, επίσης γνωστή ως πρωτεϊνική κινάση Β, η οποία παίζει ουσιώδη ρόλο στην προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στην παρεμπόδιση της απόπτωσης. Στη μελέτη το *AKT1* είχε αυξημένη έκφραση που μάλλον οδηγεί σε αύξηση της οστικής μάζας (Sanchez-Sabate et al, 2009).

Μια ομάδα 6 γονιδίων συμπεριλαμβανομένων των *ADFP*, *FHL2*, *PCCA*, *PTGER2*, *TGFB3* και *SOCS3* αναγνωρίστηκαν ως διαφορεικά ρυθμισμένα στα δείγματα ασθενών με οστεοαρθρίτιδα, αλλά η έλλειψη σημαντικών διαφορών στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των ασθενών και των ηλικιωμένων δεν επιτρέπει την ταυτοποίηση αυτών των γονιδίων ως σχετιζόμενων με τη νόσο. Ωστόσο, μερικά από αυτά ίσως παίζουν κάποιο ρόλο στην ασθένεια (Sanchez-Sabate et al, 2009). Το γονίδιο *ADFP* κωδικοποιεί ένα πρωτεϊνικό δείκτη συσσώρευσης λιπιδίων. Αρχικά η *ADFP* πρωτεΐνη περιγράφηκε στα λιποκύτταρα, αλλά βρίσκεται σε διάφορα κύτταρα, όπως οι ινοβλάστες και τα μακροφάγα (Heid et al,1998). Επιπλέον, ανιχνεύθηκε μια αύξηση των επιπέδων mRNA του *PCCA* στα δείγματα οστού ασθενών με οστεοαρθρίτιδα. Το *PCCA* κωδικοποιεί την α υπομονάδα του ετεροδιμερούς μιτοχονδριακού ενζύμου προπιονύλο-CoA καρβοξυλάση. Το σπογγώδες οστό της κεφαλής του μηριαίου περιέχει υψηλά επίπεδα λίπους και λιπαρών οξέων. Αν και οι ρόλοι των *ADFP* και *PCCA* στην οστική αναδιοργάνωση δεν είναι καθιερωμένοι, η αυξημένη έκφραση αυτών των γονιδίων στο πάσχον οστό υποστηρίζει την υπόθεση ότι αλλαγές στον μεταβολισμό των λιπιδίων μπορεί να υποκρύπτουν συστηματική διαταραχή (Sanchez-Sabate et al, 2009).

Η υπερέκφραση του *FHL2* αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των οστεοβλαστών, όπως και την εναπόθεση ασβεστίου στα οστά (Gunther et al,2005), (Lai et al,2006). Η *SOCS3*, ένα μέλος της οικογένειας των αναστολέων των κυττοκινών, έχει προταθεί ως σημαντικός ρυθμιστής της

οστικής αναδιοργάνωσης, ρυθμίζοντας την οστεοκλαστογένεση (Ohishi et al, 2005). Το γονίδιο *TGFB2* είχε αυξημένη έκφραση και στους πάσχοντες από οστεοαρθρίτιδα και στους ηλικιωμένους (Sanchez-Sabate et al, 2009). Διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν υψηλά επίπεδα του ομολόγου γονιδίου στους οστεοβλάστες παρουσιάζουν ελαττωματική εναπόθεση ασβεστίου στα οστά, το οποίο οδηγεί σε εξαρτώμενη από την ηλικία απώλεια οστικής μάζας (Erlebacher and Derynck, 1996).

Επίσης, αναγνωρίστηκε μια ομάδα γονιδίων συμπεριλαμβανομένων των *BMP1*, *FLT1*, *MMP2*, *TGFBR3* και *TNFRSF11B*, για τα οποία τα επίπεδα mRNA είναι σημαντικά υψηλότερα στο οστεοαρθρικό οστό από ότι στα δείγματα των ηλικιωμένων δοτών.

Η υψηλότερη έκφραση του *BMP1* ίσως συμβάλλει στην αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου στη νόσο. Η έκφραση του γονιδίου *TNFRSF11B*, το οποίο κωδικοποιεί τον εκκρινόμενο παράγοντα οστεοπροτεγερίνη (osteoprotegerin), ήταν υψηλότερη στους πάσχοντες σε σχέση με τους ηλικιωμένους (Sanchez-Sabate et al, 2009). Η οστεοπροτεγερίνη εμποδίζει τη διαφοροποίηση, την επιβίωση και τη σύντηξη των πρόδρομων κυττάρων των οστεοκλαστών, καταστέλλει την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών και προωθεί την απόπτωση τους (Wada et al, 2006). Το γονίδιο *FLT1* κωδικοποιεί τον υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα 1 (VEGFR1) και εκφράζεται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους του οστού, συμπεριλαμβανομένων των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών (Deckers et al, 2000). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, η έκφραση του τροποποιείται κατά τη γήρανση, αφού παρουσίασε σχετικά χαμηλά επίπεδα *FLT1* mRNA στα δείγματα των ηλικιωμένων συγκριτικά με τα δείγματα των πασχόντων (Sanchez-Sabate et al, 2009). Τέλος, η *TGFBR3*, γνωστή επίσης ως betaglycan, λειτουργεί προσδένοντας τον TGF-b και μετά τον μεταφέρει στον υποδοχέα τύπου II (Eickelberg et al, 2002). Η έκφραση του *TGFBR3* σε επίπεδο mRNA ήταν υψηλότερη στα δείγματα των πασχόντων από ότι στους ηλικιωμένους δότες, υποδεικνύοντας ένα ρόλο του γονιδίου στην τροποποιημένη TGF-b σηματοδότηση στη νόσο (Sanchez-Sabate et al, 2009).

#### **A5) Γονιδιωματική μελέτη μεγάλης έκτασης σε υποχόνδριο οστό πασχόντων από οστεοαρθρίτιδα**



Οι Whole-genome μικροσυστοιχίες αποτελούν μια συνήθη τεχνική για τη ταυτόχρονη μελέτη της συμπεριφοράς πολλών γονιδίων και εφαρμόστηκαν για πρώτη φορά σε δείγματα από το εξωτερικό μέρος της κνήμης(έξω κνημιαίο πλατώ), σε δείγματα από το εσωτερικό μέρος της κνήμης(έσω κνημιαίο πλατώ) πασχόντων από οστεοαρθρίτιδα γονάτου και σε δείγματα από μάρτυρες χωρίς τη νόσο. Τα χαρακτηριστικά του έσω κνημιαίου πλατώ των δειγμάτων των πασχόντων περιελάμβαναν απώλεια χόνδρου, σχηματισμό κύστεων στον χόνδρο, σκλήρυνση οστού και πάχυνση της υποχόνδριας οστικής πλάκας, ενώ το έξω κνημιαίο πλατώ ήταν σχετικά φυσιολογικό. Από την ανάλυση προσδιορίστηκαν 972 γονίδια με διαφορεική έκφραση εκ των οποίων 420 είχαν αυξημένη ρύθμιση και 552 μειωμένη ρύθμιση στα δείγματα από το εσωτερικό μέρος σε σχέση με αυτά από το εξωτερικό μέρος της κνήμης. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν καινούργια γονίδια συμπεριλαμβανομένων του γονιδίου της λεπτίνης (*LEP*) και του γονιδίου της περιοστίνης (*POSTN*) (Chou et al, 2013).

Συγκεκριμένα, 42 γονίδια σχετίζονται με την ανώμαλη μορφολογία των οστών (π.χ.*COL12A1*, *TNF*), 7 γονίδια σχετίζονται με ανώμαλη μορφολογία των κολλαγόνων ινιδίων (π.χ.*COL5A1*, *COL5A2*), 24 γονίδια αφορούν το λιπώδη ιστό (π.χ.*WNT10B*, *CIDEA*), 21 γονίδια αφορούν την οστική πυκνότητα (π.χ.*SOST*, *LIPE*), 69 γονίδια αφορούν την αγγειογένεση (π.χ.*ANGPTL*, *CCL2*), 303 γονίδια σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (π.χ.*ITGA11*, *NMB*, *GRB14*, *BTG2*), 48 γονίδια σχετίζονται με την ποσότητα συνδετικού ιστού (π.χ.*ADAM12*, *CIDEC*), 175 γονίδια εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση (π.χ.*FN1*, *PLAC8*), 176 γονίδια εμπλέκονται στην κίνηση των κυττάρων (π.χ.*COL7A1*, *FZD4*), 218 γονίδια σχετίζονται με την κυτταρική νέκρωση (π.χ.*WISP1*, *ADIPOQ*) και 14 γονίδια εμπλέκονται στην εναπόθεση ασβεστίου (mineralization of cells π.χ. *BMP7*, *CHRD2*) (Chou et al, 2013).

Η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών επιβεβαιώθηκε με ποσοτική RT-PCR στα δείγματα των πασχόντων για 86 επιλεγμένα γονίδια. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PCR, 77 γονίδια είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δείγματα από το εξωτερικό και στα δείγματα από το εσωτερικό μέρος της κνήμης. Με βάση την ανάλυση IPA (ingenuity pathway analysis), προσδιορίστηκαν βιολογικές λειτουργίες που εμπλέκονται

στην παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας στο οστό. Πολλά από τα λειτουργικά δίκτυα που προσδιορίστηκαν σε αυτή την μελέτη συσχετίζονται με διεργασίες στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του συνδετικού ιστού (Chou et al, 2013).

Στην προηγούμενη μελέτη τους, εκτίμησαν την έκφραση 61 γονιδίων και συσχέτισαν τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης με τον οστικό όγκο. Η έκφραση των 45 από τα 61 γονίδια στο υποχόνδριο οστό ήταν στενά συσχετιζόμενη με την μεταβολή της οστικής δομής. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται τα *ADAMTS1*, *ASPN*, *BMP6*, *BMPER*, *CCL2*, *CCL8*, *COL5A1*, *COL6A3*, *COL7A1*, *COL16A1*, *FRZB*, *GDF10*, *MMP3*, *OGN*, *OMD*, *POSTN*, *PTGES*, *TNFSF11*, *WNT1* καθώς και η αναλογία *OPG* προς *RANKL*. Σημαντικές συσχετίσεις παρατηρήθηκαν μεταξύ της αναλογίας *OPG/RANKL* και των οστικών παραμέτρων συμπεριλαμβανομένων του επί τις εκατό οστικού όγκου, της οστικής δομής, καθώς και του πάχους και του χώρου των δοκίδων (Chou et al, 2013).

Πολλά από τα γονίδια που προσδιορίστηκαν ότι έχουν σημαντικά διαφορετική ρύθμιση με την βοήθεια των μικροσυστοιχιών παίζουν ρόλο στην παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας, της αρθρίτιδας ή του οστικού σχηματισμού, συμπεριλαμβανομένων 7 από τα 10 γονίδια με την μεγαλύτερη αυξορύθμιση (*POSTN*, *ASPN*, *COL6A3*, *COL3A1*, *OGN*, *DIO2*, *TNFSF11*) και 2 από τα 10 γονίδια με την μεγαλύτερη μειορύθμιση (*LEP*, *APOB*) (Chou et al, 2013).

**Πίνακας 3: Κορυφαία 10 γονίδια με αυξημένη και μειωμένη ρύθμιση, συγκρίνοντας δείγματα οστού από το έξω κνημιαίο πλατώ με δείγματα οστού από το έσω κνημιαίο πλατώ (Chou et al, Arthritis Research & Therapy 2013)**

<b>Γονίδια με αυξημένη έκφραση στο έσω κνημιαίο οστό</b>	<b>Γονίδια με μειωμένη έκφραση στο έσω κνημιαίο οστό</b>
<i>IL11</i> - Interleukin-11	<i>LEP</i> - Leptin
<i>POSTN</i> - Periostin, osteoblast specific factor	<i>APOB</i> -Apolipoprotein B
<i>ASPN</i> -Asporin	<i>ADH1B</i> - Alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide
<i>COL6A3</i> - Collagen, type VI, alpha 3	<i>CCL8</i> -Chemokine (C–C motif) ligand 8

<i>TUBB3</i> -Tubulin, beta 3	<i>TUSC5</i> -Tumor suppressor candidate 5
<i>COL3A1</i> -Collagen, type III, alpha 1	<i>KLB</i> - Klotho beta
<i>OGN</i> -Osteoglycin	<i>NPR3</i> -Natriuretic peptide receptor C
<i>DIO2</i> - Deiodinase, iodothyronine, type II	<i>PLIN1</i> - Perilipin 1
<i>PPEF1</i> -Protein phosphatase, EF-hand calcium binding domain 1	<i>PCK1</i> -Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1
<i>TNFSF11</i> -Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	<i>MYO16</i> - Myosin XVI

Έχει ενδιαφέρον ότι κατά την ανάλυση των μονοπατιών των γονιδίων με την μεγαλύτερη αυξορύθμιση και των γονιδίων με την μεγαλύτερη μειορύθμιση, αναγνωρίστηκε ένα νέο σηματοδοτικό δίκτυο, το οποίο γενικά χαρακτηρίζεται από αυξορύθμιση των γονιδίων που σχετίζονται με την εναπόθεση ασβεστίου στα οστά ή με το κολλαγόνο, όπως τα *COL3A1*, *COL6A3*, *BMP1*, *BMP7*, *POSTN*, *WISP1*, *HTRA1*, *SOST* και *ITGA11* και από μειορύθμιση των γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό μεταβολισμό, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή την κυτταρική διαφοροποίηση, όπως τα *NMB*, *LEP*, *CHRD2*, *GRB14*, *CIDEC*, *CIDEA*, *BTG2*, *PLAC8* και *PRDM16*. Επιπρόσθετα, τα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια αυτού του δικτύου περιελάμβαναν το *ANGPTL1*, το οποίο εμπλέκεται στην αγγειογένεση (Chou et al, 2013).

Μέσω της IPA κατάφεραν επίσης να αναγνωρίσουν τη συμμετοχή του δικτύου πρωτεϊνών που συμβάλλει στον μεταβολισμό των λιπιδίων και του δικτύου πρωτεϊνών που συμβάλλει στον μεταβολισμό των ανόργανων στοιχείων τα οποία περιελάμβαναν 29 και 22 διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια αντίστοιχα. Αυτά τα δίκτυα περιελάμβαναν τα *PLINE*, *LIPE*, *DGAT2*, *ADRB1*, *NPY1R*, *HCAR3* και *P2RRY14* και υπέδειξαν ότι η περιοχή του έσω κνημιαίου πλατώ χαρακτηριζόταν από μια κατάσταση χαμηλής ενεργειακής παραγωγής που περιελάμβανε χαμηλό ποσοστό μεταβολισμού ανόργανων στοιχείων. Αυτά τα αποτελέσματα είναι συμβατά με ένα χαμηλό ποσοστό οστικής αναδιοργάνωσης σε αυτή την περιοχή (Chou et al, 2013).

Σύμφωνα με το υποθετικό μοντέλο της παθογένειας της οστεοαρθρίτιδας που προτάθηκε από τους Burr και Gallant, ο μηχανικός φόρτος στις αρθρώσεις αυξάνει την οστική αναδιοργάνωση στο αρχικό στάδιο της νόσου (Burr και Gallant, 2012). Στη μελέτη παρατηρήθηκε αυξορύθμιση του SOST (Chou et al, 2013). Η SOST είναι ένας αναστολέας της σηματοδότησης του Wnt που απαντά στο μηχανικό φόρτο στην εγγύς κνήμη του αρουραίου και σχετίζεται με αλλαγές στην οστική μάζα (Macias et al, 2013). Επιπρόσθετα, αρκετά γονίδια που σχετίζονται με την διαφοροποίηση και την δραστηριότητα των οστεοβλαστών, των οστεοκλαστών και των οστεοκυττάρων προσδιορίστηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη, όπως τα *ASPN* (regulator of osteoblast collagen mineralization), *WNT5A* (αγωνιστής του σηματοδοτικού μονοπατιού WNT στους οστεοβλάστες και τα οστεοκύτταρα) και *VCAN* (ρυθμίζει την έκφραση του TGFβ στους οστεοκλάστες). Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι ο μηχανικός φόρτος παίζει σημαντικό ρόλο στις δομικές αλλαγές του ανθρωπίνου υποχόνδριου οστού, ξεκινά την οστική αναδιοργάνωση και συμβάλλει στην παθογένεια της ΟΑ.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα τους θα μπορούσαν να προσφέρουν ένα καινούργιο μοριακό μηχανισμό που να εξηγεί τις αλλαγές στην οστική αναδιοργάνωση κατά την ανάπτυξη της νόσου, ο οποίος βασίζεται σε ένα δίκτυο που ρυθμίζει η κινάση AKT, η οποία παίζει ζωτικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως ο μεταβολισμός, η απόπτωση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η μεταγραφή και η κυτταρική μετανάστευση (Ikegami et al, 2011). Στα αρχικά στάδια της ΟΑ, η υπερέκφραση της LEP ίσως αυξάνει την φωσφορυλίωση της AKT (Yang and Barouch, 2007), η οποία θα δώσει το έναυσμα στο σηματοδοτικό μονοπάτι για να αυξήσει την οστική αναδιοργάνωση. Στα τελικά στάδια της οστεοαρθρίτιδας, η αυξορύθμιση της POSTN μπορεί να εμποδίζει την φωσφορυλίωση της AKT (Kim et al, 2011) και με αυτό τον τρόπο να μειώνει τον κυτταρικό μεταβολισμό, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση. Με αυτό τον τρόπο η οστική αναδιοργάνωση θα μειωθεί. Η διαφορική έκφραση της λεπτίνης (χαμηλή στα δείγματα από το έσω κνημιαίο πλατώ, αλλά ισχυρή στα δείγματα από το έξω κνημιαίο πλατώ) και της περιοστίνης (υψηλή στα δείγματα από το έσω κνημιαίο πλατώ, αλλά όχι στα δείγματα από το έξω κνημιαίο πλατώ) στα

δείγματα των πασχόντων από οστεοαρθρίτιδα επιβεβαιώθηκε και με ανοσοιστοχημεία (Chou et al, 2013).

## **B. Μελέτες γονιδιακής έκφρασης στον αρθρικό υμένα**

Την τελευταία δεκαετία η προσοχή έχει στραφεί στη σημασία της φλεγμονής του αρθρικού υμένα στην οστεοαρθρίτιδα. Έχει αποδειχθεί ότι η φλεγμονή συμβάλλει στα συμπτώματα των ασθενών (οίδημα στις αρθρώσεις και άλγος λόγω φλεγμονής), στα σημεία (συλλογή) και στην πρόοδο της ασθένειας (Sellam and Berenbaum, 2010), εμπλέκεται νωρίς στην διαδικασία της νόσου (Benito et al, 2005) και θεωρείται ότι είναι δευτερεύουσα στις οστεοχονδρικές θραύσεις και στους φλεγμονώδεις/ καταβολικούς παράγοντες που εισέρχονται στην αρθρική κοιλότητα (Martel-Pelletier and Pelletier, 2010). Οι ιστολογικές αλλαγές στον υμένα περιλαμβάνουν την υπερτροφία και την υπερπλασία των κυττάρων του με μια αύξηση στον αριθμό των αρθρικών επενδυτικών κυττάρων που συχνά συνοδεύεται από διήθηση μακροφάγων και λεμφοκυττάρων είτε διάχυτη είτε σε περιαγγειακές συναθροίσεις (Sellam and Berenbaum, 2010), (Scanzello and Goldring, 2012). Η φλεγμονή είναι περιορισμένη κυρίως σε περιοχές παρακείμενες του παθολογικά κατεστραμμένου χόνδρου και οστού (Ayrat et al, 2005).

### **B1) Μελέτη γονιδιακής έκφρασης μεγάλης κλίμακας σε αρθρικό υμένα άρθρωσης γονάτου ασθενών με οστεοαρθρίτιδα**

Η μελέτη είναι η πρώτη κατά την οποία προφίλ γονιδιακής έκφρασης από τον αρθρικό υμένα πασχόντων από οστεοαρθρίτιδα ελήφθησαν χρησιμοποιώντας τεχνολογία cDNA μικροσυστοιχιών μεγάλης κλίμακας. Συγκεκριμένα ανέλυσαν τα προφίλ γονιδιακής έκφρασης από δείγματα υμένα 43 ασθενών με οστεοαρθρίτιδα, 10 ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και 8 ασθενών χωρίς ρευματοειδή αρθρίτιδα ή οστεοαρθρίτιδα. Προσδιορίστηκαν 21 γονίδια με ταυτόχρονα σημαντικές διαφορές στην έκφραση μεταξύ της ομάδας ασθενών με οστεοαρθρίτιδα και των άλλων δύο ομάδων (Kato et al, 2007).

Τα 21 γονίδια ομαδοποιήθηκαν σε 7 κατηγορίες σύμφωνα με προηγούμενα ευρήματα. 8 γονίδια κωδικοποιούσαν ένζυμα/ ενισχυτές ενζύμων/αναστολείς ενζύμων: *PPP2R5C* (protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma isoform), *PGK1* (phosphoglycerate kinase), *SORD* (sorbitol dehydrogenase), *EXT1* (exostoses 1), *HS6ST* (heparan sulfate 6 sulfotransferase), *HARSL* (histidyl-tRNA synthetase-like), *LIMK2* (LIM domain kinase 2) και *GSTT1* (glutathione S-transferase). 4 γονίδια κωδικοποιούσαν πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας: *FN1* (fibronectin), *FBLN3* (fibulin-3), *P4HA2* [procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), a polypeptide II] και *COL3A1* (collagen type III, a1). 3 γονίδια κωδικοποιούσαν υποδοχείς/ πρωτεΐνες σηματοδότησης: *IL1R1* (interleukin-1 receptor), *TBCC* (tubulin-folding cofactor C) και *CXCL2* (chemokine, CXC motif, ligand 2). Επιπλέον, 3 γονίδια κωδικοποιούσαν, αντίστοιχα, ένα καταστολέα ανάπτυξης/ καταστολέα όγκου, μια ριβοσωμική πρωτεΐνη και ένα μεταγραφικό παράγοντα: *BCSC-1* (breast cancer suppressor candidate 1), *RPL15* (60S ribosomal protein L15) και *TCF17* (transcription factor 17). Επιπρόσθετα, 3 γονίδια είχαν άγνωστη λειτουργία: *APEX* (APEX nuclease), *PCBP1* (poly(rC) binding protein 1) και *EVER1* (Lak-4p) (Kato et al, 2007).

Στη μελέτη αποδείχθηκε για πρώτη φορά ότι η γονιδιακή έκφραση του *IL1R1* στον υμένα των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα είναι υψηλότερη από ότι στους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και τους ασθενείς χωρίς ρευματοειδή αρθρίτιδα ή οστεοαρθρίτιδα. Η πρωτεΐνη *IL1R1* είναι ένας επιφανειακός κυτταρικός υποδοχέας της *IL1-a* και της *IL1-b*. Η *CXCL2* είναι μέλος των χημειοκινών, οι οποίες ρυθμίζουν την επιστράτευση των λευκοκυττάρων και επάγονται από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες και παθογόνα ερεθίσματα.

Επιπλέον, η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι αρκετά από τα 21 γονίδια συσχετίζονται με την πρόοδο της νόσου και την κλινική εικόνα. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των *EXT-1* και *HS6ST* αυξήθηκαν με την σοβαρότητα της νόσου και το επίπεδο μεταβλητότητας της γονιδιακής έκφρασης των *PPP2R5C* και *GSTT1* επηρέασε τη σοβαρότητα της νόσου. Όσον αφορά την κλινική εικόνα, μερικά γονίδια συσχετίστηκαν με κάποιο/κάποια από τα 4 κλινικά χαρακτηριστικά: σχηματισμός οστεοφύτων, ύδραρθρο, εναπόθεση κρυστάλλων και υμενίτιδα. Συγκεκριμένα, 7 γονίδια

συσχετίστηκαν με σχηματισμό οστεοφύτων: *HARSL*, *P4HA2*, *PGK1*, *SORD*, *EXT1*, *HS6ST* και *LIMK2*, 2 γονίδια συσχετίστηκαν με την παρουσία υμενίτιδας: *PCBP1* και *GSTT1*, 7 γονίδια συσχετίστηκαν με ύδραρθρο: *BCSC-1*, *PPP2R5C*, *IL1R1*, *TBCC*, *EVER1*, *CXCL2* και *HARSL*, ενώ κανένα γονίδιο δεν συσχετίστηκε με εναπόθεση κρυστάλλων (Kato et al, 2007).

## **B2) Μελέτη προτύπων γονιδιακής έκφρασης αρθρικών κυττάρων από τις φυσιολογικές και φλεγμονώδεις περιοχές του αρθρικού υμένα πασχόντων από οστεοαρθρίτιδα**

Ο σκοπός της μελέτης ήταν η σύγκριση του προτύπου γονιδιακής έκφρασης των αρθρικών κυττάρων από τις φλεγμονώδεις περιοχές του αρθρικού υμένα με αυτό των κυττάρων από τις φυσιολογικές/αντιδραστικές περιοχές του υμένα στον ίδιο ασθενή. Συγκεκριμένα αρθρικοί ιστοί ελήφθησαν από 12 πάσχοντες από οστεοαρθρίτιδα γόνατος κατά την ολική αρθροπλαστική και οι βιοψίες καλλιεργήθηκαν ξεχωριστά για 7 ημέρες. Μικροσυστοιχίες εφαρμόστηκαν στις φυσιολογικές/αντιδραστικές και στις φλεγμονώδεις περιοχές. Με την εφαρμογή του Western blot και της ανοσοιστοχημείας επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών. Ανάμεσα στις 2 περιοχές 896 γονίδια ήταν διαφορεικά εκφρασμένα. Τα βασικά μονοπάτια συσχετιζόταν με τη φλεγμονή, το μεταβολισμό του χόνδρου, τη σηματοδότηση Wnt και την αγγειογένεση. Αυτή η μελέτη είναι η πρώτη που προσδιόρισε πρότυπα διαφορετικής έκφρασης μεταξύ 2 περιοχών του αρθρικού υμένα στον ίδιο ασθενή (Lambert et al, 2013).

### **Μονοπάτι φλεγμονής:**

Η φλεγμονή του αρθρικού υμένα προωθείται από ένα μεγάλο αριθμό διαλυτών μεσολαβητών. Μεταξύ αυτών, η IL-1β και ο TNF-α είναι οι δυο σημαντικότερες κυττοκίνες που εμπλέκονται στην παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας (Scanzello and Goldring, 2012). Οι μεσολαβητές της φλεγμονής μπορούν να επάγουν την παραγωγή τους, τη σύνθεση MMPs και άλλων πρωτεϊνών, αλλά και να διεγείρουν τα χονδροκύτταρα, τα κύτταρα του αρθρικού υμένα, όπως επίσης και τα λεμφοκύτταρα για να παράγουν άλλες κυττοκίνες (π.χ.IL-6, IL-8, IL-15, IL-17, leukemia inhibitory factor) και την προσταγλαδίνη E2 (PGE2) (Loeser et al,2012),( Honorati et al,2002).

Στους ασθενείς στα αρχικά στάδια της νόσου, η έκφραση των χημειοκινών στον αρθρικό υμένα έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την παρουσία αρθρικής φλεγμονής (Scanzello et al, 2011) και η έκφραση του CCL19 και του υποδοχέα του, CCR7, έχουν συσχετιστεί με πιο σοβαρά συμπτώματα (Scanzello et al, 2010). Πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει τη φλεγμονή του υμένα με τις *alarmins*. Οι *alarmins* S100A8 και S100A9 έχουν κρίσιμο ρόλο στην ενεργοποίηση των κυττάρων του υμένα και στην καταστροφή του χόνδρου στην οστεοαρθρίτιδα και τα αυξημένα επίπεδα τους ίσως προβλέπουν την καταστροφή της άρθρωσης (Van Lent et al, 2012).

Στη συγκεκριμένη μελέτη επιβεβαίωσαν την αυξορύθμιση ενός μεγάλου αριθμού κυττοκινών και χημειοκινών, όπως οι IL-6, IL-8, CXCL5, CXCL6, CXCL16, CXCL2, CXCL1. Αυτοί οι μεσολαβητές ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες: φλεγμονώδεις κυττοκίνες, χημειοκίνες, ένζυμα. Επιπρόσθετα, επιβεβαίωσαν την αυξορύθμιση 2 γονιδίων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον: του *TREM1* (triggering receptor expressed on myeloid cells-1) και του *S100A9* (Lambert et al, 2013).

Ένας μεγάλος αριθμός δεδομένων υποδεικνύουν ένα σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης *TREM1* στη ρύθμιση της φλεγμονής (Ford and McVicar, 2009). Η πρωτεΐνη *TREM1* είναι ένας επιφανειακός κυτταρικός υποδοχέας που μοιάζει με ανοσοσφαιρίνη. Ο φυσικός του προσδέτης είναι άγνωστος, αλλά η ενεργοποίηση του οδηγεί στην παραγωγή πολλών προ-φλεγμονωδών κυττοκινών και χημειοκινών. Αυτή η απάντηση μπορεί με τη σειρά της να ενισχύσει τις φλεγμονώδεις απαντήσεις. Η έκφραση του υποδοχέα *TREM1* ήταν αυξημένη στη φλεγμονώδη περιοχή σε σύγκριση με την φυσιολογική /αντιδραστική περιοχή του αρθρικού υμένα, υποδεικνύοντας ένα πιθανό ρόλο στην υμενίτιδα. Επιπλέον, ο υποδοχέας *TREM1* ήταν απών από τις φυσιολογικές/αντιδραστικές περιοχές, υποδεικνύοντας μια εστιακή έκφραση του παράγοντα αυτού στη φλεγμονώδη περιοχή του αρθρικού υμένα στη νόσο (Lambert et al, 2013).

Η πρωτεΐνη *S100A9* παίζει ζωτικό ρόλο στην φλεγμονή του υμένα και στην καταστροφή του χόνδρου. Στο χόνδρο η έκφραση της περιορίζεται στα υπερτροφικά χονδροκύτταρα και παίζει σπουδαίο ρόλο στην ασβεστοποίηση της μεσοκυττάριας ουσίας του χόνδρου. Αυξημένα επίπεδα της έχουν βρεθεί στο αρθρικό υγρό πασχόντων από οστεοαρθρίτιδα και ρευματοειδή αρθρίτιδα



(Baillet et al, 2010). Η διαφορική έκφραση του TREM1 και της S100A9 στις βιοψίες του αρθρικού υμένα στην οστεοαρθρίτιδα επαληθεύθηκε με την εφαρμογή ανάλυσης Western blot και στη συνέχεια με ανοσοιστοχημεία (Lambert et al, 2013).

### **Μονοπάτι μεταβολισμού του χόνδρου**

Στη μελέτη παρατηρήθηκε μια ανισορροπία μεταξύ των γονιδίων του αναβολισμού και των γονιδίων του καταβολισμού με τα γονίδια του καταβολισμού να έχουν μεγαλύτερη έκφραση. Στην οστεοαρθρίτιδα αυτή η ανισορροπία παρατηρείται στο χόνδρο, ενώ πρόσφατα δεδομένα υπέδειξαν ότι η υμενίτιδα ίσως επιταχύνει τον καταβολισμό του αρθρικού χόνδρου και ίσως συμβάλλει στην πρόοδο της χονδροπάθειας μέσω της παραγωγής μεγάλης ποσότητας MMPs. Πράγματι, τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι οι MMP3 και MMP9 είχαν αυξημένη ρύθμιση στη φλεγμονώδη περιοχή σε σχέση με την φυσιολογική/αντιδραστική περιοχή. Οι καθεψίνες είναι ένζυμα αποθηκευμένα στα λυσοσώματα των χονδροκυττάρων και όταν απελευθερωθούν, προκαλούν διάσπαση του κολλαγόνου τύπου 2 και των πρωτεογλυκανών. Οι καθεψίνες H και S είχαν αυξημένη ρύθμιση. Επίσης, παρατηρήθηκε αυξημένη ρύθμιση της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών 6 (BMP6), η οποία εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του χόνδρου και του οστού στη αρθρίτιδα. Αντίθετα, το ένζυμο του αναβολισμού με την μεγαλύτερη ρύθμιση ήταν η συνθετάση-1 του υαλουρονικού (HAS1) (Lambert et al, 2013).

### **Μονοπάτι αγγειογένεσης:**

Η νεοαγγείωση είναι ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό του φλεγμονώδους αρθρικού υμένα και είναι αποτέλεσμα ανισορροπίας μεταξύ προ-αγγειογενετικών και αντί-αγγειογενετικών παραγόντων (Bonnet and Walsh, 2005). Η κινητήριος δύναμη της νεοαγγείωσης ίσως είναι η υμενίτιδα (Ashraf and Walsh, 2008). Ως εκ τούτου, η αγγειογένεση και η φλεγμονή είναι δυο βασικές διαδικασίες στενά συσχετιζόμενες που ίσως επηρεάζουν την πρόοδο της νόσου και το βασικό της σύμπτωμα, τον πόνο (Walsh et al, 2007). Τα πρώτα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα κύτταρα του αρθρικού υμένα από την φλεγμονώδη περιοχή παράγαν περισσότερες προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες (IL-6 και IL-8), περισσότερο VEGF και λιγότερη θρομβοσπονδίνη 1 (TSP) σε σύγκριση με τα κύτταρα του υμένα από τη φυσιολογική/αντιδραστική περιοχή, υποδεικνύοντας μια ανισορροπία μεταξύ των προ-

αγγειογενετικών και αντί-αγγειογενετικών παραγόντων προς όφελος των προ-αγγειογενετικών. Επιπρόσθετα, η παραγωγή του VEGF είχε ισχυρά θετική συσχέτιση με την έκκριση IL-6 και IL-8, ενώ παρατηρήθηκε μια σημαντικά αρνητική συσχέτιση μεταξύ των TSP-1 και IL-8. Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι υπάρχει ένας σύνδεσμος μεταξύ της φλεγμονής και της αγγειογένεσης στον αρθρικό υμένα (Lambert et al, 2013).

Ποικίλοι βασικοί μεσολαβητές της αγγειογένεσης ήταν διαφορετικά εκφρασμένοι ανάμεσα στις περιοχές του υμένα. Γονίδια, όπως το *AQP 9* και το *DNER* (Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor) φάνηκαν να έχουν σημαντικά αυξημένη ρύθμιση (Lambert et al, 2013). Οι ακουαπορίνες είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως κανάλια για τη μεταφορά νερού διαμέσου της μεμβράνης και εμπλέκονται στην κυτταρική μετανάστευση και την αγγειογένεση (Nico and Ribatti, 2010). Έχει αναφερθεί ότι το mRNA του *AQP9* ανιχνεύθηκε στον υμένα ασθενών με ύδραρθρο λόγω οστεοαρθρίτιδας και η έκφραση του ήταν ισχυρά επαγόμενη από τον TNF-α στα κύτταρα του αρθρικού υμένα, υποδεικνύοντας ότι η *AQP9* μπορεί να σχετίζεται με την υμενίτιδα (Nagahara et al, 2010).

Επίσης, έδειξαν για πρώτη φορά την αυξορύθμιση και σε γονιδιακό και σε πρωτεϊνικό επίπεδο της γλυκοπρωτεϊνικής ορμόνης STC-1 (stanniocalcin 1), η οποία παίζει θετικό ρόλο στην αγγειακή εκβλάστηση μέσω του μονοπατιού VEGF/VEGFR2 (Law and Wong, 2013). Η STC-1 θα μπορούσε λοιπόν να είναι βασικός μεσολαβητής της νεοαγγείωσης του αρθρικού υμένα, η οποία παρατηρείται στην υμενίτιδα (Lambert et al, 2013).

Τα αποτελέσματα του Western blot και της ανοσοιστοχημείας ήταν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών.

#### ***Μονοπάτι του Wnt.***

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Wnt ήταν διαφορετικά ενεργοποιημένο στις βιοψίες από φυσιολογικές/αντιδραστικές περιοχές σε σύγκριση με τις βιοψίες από τις φλεγμονώδεις περιοχές. Τα γονίδια *WNT5A* και *LRP5* (low density lipoprotein receptor-related protein 5) είχαν σημαντικά αυξημένη ρύθμιση. Αντίθετα, τα γονίδια *FZD2* (frizzled homolog 2), *DKK3* (dickkopf homolog 3) και *WNT5B* είχαν σημαντικά μειωμένη ρύθμιση. Ο Wnt-5a συμμετείχε στην επαγόμενη από την IL-1β έκφραση των MMPs και στη διαφοροποίηση των

χονδροκυττάρων (Ge et al, 2011) υποδεικνύοντας ότι μπορεί να εμπλέκεται στην καταστροφή του χόνδρου (Lambert et al, 2013).

**Άλλα γονίδια:**

Άλλα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια στην φλεγμονώδη περιοχή σε σχέση με την φυσιολογική/αντιδραστική περιοχή του αρθρικού υμένα που δεν έχουν συσχετιστεί ακόμα με την παθογένεια της νόσου είναι: Το γονίδιο *HSD11B1* (Hydroxysteroid (11-Beta) Dehydrogenase 1), το *SLCO* (solute carrier organic anion transporter family), τα microRNA (*MIR1275*, *199A2*, *221* και *302c*), τα οποία είχαν αυξημένη έκφραση, καθώς και το *CRIP2* (cysteine-rich protein 2), το *LOXL1* (lysyl oxidase-like 1) και το *AHNAK*, τα οποία είχαν μειωμένη έκφραση (Lambert et al, 2013).

Πίνακας 4: Γονίδια με διαφορετική έκφραση μεταξύ των φυσιολογικών/ αντιδραστικών και των φλεγμονωδών περιοχών του υμένα (Lambert et al, Arthritis & Rheumatism 2013)		
Μονοπάτι	Αυξημένη ρύθμιση	Μειωμένη ρύθμιση
<b>Φλεγμονή</b>	Κυττοκίνες ( <i>IL-8</i> , <i>IL-6</i> , <i>TNFRSF21</i> , <i>IFI30</i> , <i>TNFAIP6</i> , <i>IRF8</i> )-Χημειοκίνες ( <i>CXCL5</i> , <i>CXCL6</i> , <i>CXCL16</i> , <i>CXCL2</i> , <i>CXCL1</i> )-Ένζυμα ( <i>ALOX5AP</i> , <i>PLD1</i> , <i>ALOX5</i> , <i>PTGES</i> , <i>PLCB1</i> , <i>SOD2</i> , <i>TBXAS1</i> , <i>PI3</i> , <i>PLA2G4A</i> )-Άλλα ( <i>TREM1</i> , <i>S100A9</i> , <i>OSM</i> , <i>PPARG</i> )	■
<b>Αναβολισμός</b>	<i>HAS1</i> , <i>BMP6</i> , <i>COLL22A1</i>	<i>COL1A2</i> , <i>VIM</i> , <i>MATN2</i> , <i>HABP4</i> , <i>HAPLN1</i> , <i>HAS3</i> , <i>COL16A1</i> , <i>CILP</i> , <i>COL6A3</i> , <i>GPC4</i> , <i>ACAN</i>

<b>Καταβολισμός</b>	<i>MMP9, MMP3, CTSH, ADAMDEC1, CTSS</i>	-
<b>Αγγειογένεση</b>	<i>STC1, PF4V1, EDNRB, AQP9, HBEGF, BDKRB1, RCAN1, ECGF1, DNER, RCAN1, BDKRB2, PECAM1</i>	<i>PDGFC, RNH1</i>

### **B3) Σύγκριση προτύπων γονιδιακής έκφρασης σε αρθρικό υμένα πασχόντων από οστεοαρθρίτιδα σε διαφορετικά στάδια**

Στη μελέτη, 19 δείγματα αρθρικού υμένα χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση, συμπεριλαμβανομένων 10 δειγμάτων από 10 ασθενείς με πρώιμη οστεοαρθρίτιδα γονάτου και 9 δείγματα από 9 ασθενείς με τελικού σταδίου νόσο με σκοπό τη διερεύνηση των αλλαγών κατά την εμφάνιση και την ανάπτυξη της οστεοαρθρίτιδας. Συνολικά 419 γονίδια ήταν διαφορετικά εκφρασμένα μεταξύ των αρχικών και των τελικών σταδίων της νόσου εκ των οποίων 112 γονίδια είχαν αυξημένη ρύθμιση και 307 είχαν μειωμένη ρύθμιση. Αυτά τα γονίδια συσχετίζονται με την ανοσολογική απάντηση, την ανάπτυξη του χόνδρου, τη γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών, τη μυϊκή ανάπτυξη, το μονοπάτι του Wnt και το μονοπάτι του Toll-like receptor (TLR) (Ma et al, 2014).

Τα γονίδια που σχετίζονταν με την ανοσολογική απάντηση περιλαμβάνουν τα *POU2AF1, IGL@, IGJ, PAX5, TNFRSF17, IGHM, MIF, IGKV1-5, TNFSF11 (RANKL), ILF2 (NFAT), LAX1, IGHD, MS4A1 (CD20), IGKV4-1, FAIM3, IGKV3-20, CD79A, CD19* και *IGKC*. Αυτά τα γονίδια είχαν μειωμένη ρύθμιση στα δείγματα των πασχόντων από τελικού σταδίου οστεοαρθρίτιδα. Ως εκ τούτου, η αυξημένη έκφραση τους στα αρχικά στάδια της νόσου θα μπορούσε να παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος στην παθογένεια της νόσου. Η πρωτεΐνη *POU2AF1* είναι ένας ειδικός για τα B-κύτταρα μεταγραφικός συνενεργοποιητής, ενώ η πρωτεΐνη *TNFRSF17* είναι ένας παράγοντας ωρίμανσης των B-κυττάρων. Τα *MS4A1 (CD20)*, *CD19* και *CD79a* είναι αντιγόνα που εκφράζονται κυρίως στα B-κύτταρα (Ma et al,

2014). Ο μεταγραφικός παράγοντας PAX5 ελέγχει την διαφοροποίηση των B κυττάρων και προωθεί την μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν το CD79a (Ig-α) (Chung et al,2012).

Μερικά γονίδια που έχει βρεθεί ότι συσχετίζονται με την ανάπτυξη του χόνδρου, όπως τα *HOXA11* και *RUNX2* είχαν μειωμένη ρύθμιση στο τελικό στάδιο της νόσου (Ma et al, 2014). Σύμφωνα με αποτελέσματα πρόσφατων ερευνών οι N-γλυκάνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη και την πρόοδο της νόσου (Matsushashi et al, 2011). Οι γλυκάνες των γλυκοπρωτεϊνών συνήθως βρίσκονται στην εξωκυττάρια μεμβράνη, στον ορό και στην κυτταρική επιφάνεια. Στην μελέτη, μια ομάδα γονιδίων που σχετίζονται με την γλυκοζυλίωση συμπεριλαμβανομένων των *B3GNT9*, *MAN2A1*, *ALG8*, *SERP1* είχαν μειωμένη ρύθμιση στο τελικό στάδιο της νόσου γεγονός που υποδεικνύει ότι η μείωση της έκφρασης αυτών των γονιδίων ίσως συμβάλλει στην εκφύλιση του χόνδρου (Ma et al, 2014).

Παράλληλα, η μυϊκή αδυναμία είναι ένας προγνωστικός παράγοντας της έναρξης της νόσου και σχετίζεται με την πρόοδο της (Roos et al,2010). Τα επίπεδα έκφρασης μερικών γονιδίων (π.χ.*MYL6*, *CAV2*, *LAMA5*) που σχετίζονται με τη μυϊκή ανάπτυξη ήταν μειωμένα στο τελικό στάδιο της νόσου.

Τέλος, τα γονίδια με διαφορετική έκφραση *DAAM2*, *FZD6*, *CSNK1E*, *CAMK2G* και *TCF7L1* εμπλέκονταν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του Wnt, ενώ τα *PIK3CG*, *MAPK13*, *TLR5* θα μπορούσαν να συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του Toll. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η οικογένεια των υποδοχέων Toll εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την πρόοδο της οστεοαρθρίτιδας (Ma et al, 2014).

## **Γ. Μελέτες γονιδιακής έκφρασης στον αρθρικό χόνδρο**

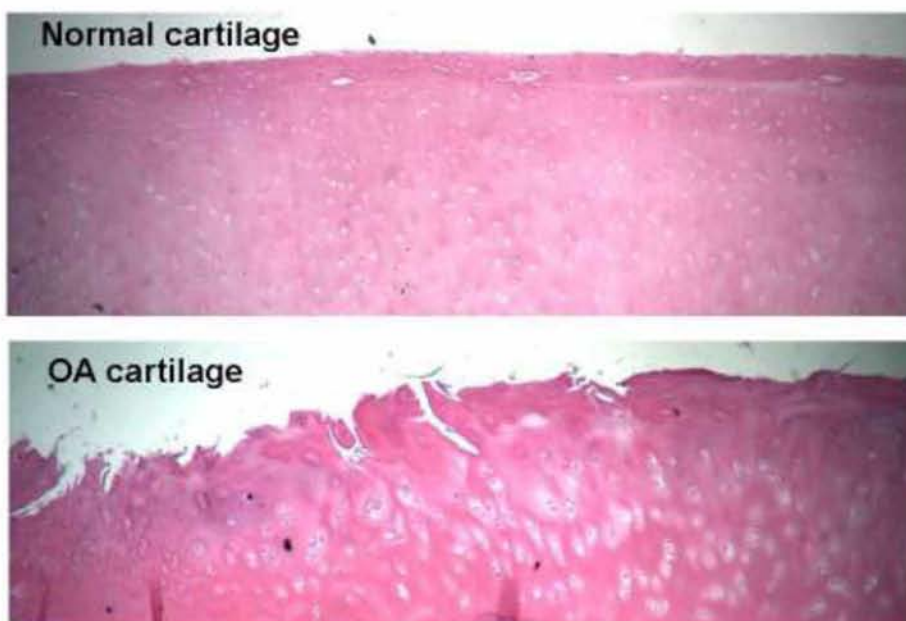
Ο φυσιολογικός χόνδρος είναι ένας αδιαφανής, λευκός, ελαστικός, λείος, στιλπνός και υγρός ιστός, ο οποίος καλύπτει τα οστικά άκρα και επιτρέπει την ομαλή, με ελάχιστη τριβή, κίνηση των αρθρικών επιφανειών. Ο χόνδρος έχει ιδιότητες που του επιτρέπουν να δέχεται φορτία και να απορροφά κραδασμούς. Το 60%-80% του συνολικού όγκου του αρθρικού χόνδρου αποτελείται από ύδωρ, ενώ από το ξηρό βάρος του το 50% αποτελείται από

κολλαγόνο και το υπόλοιπο 50% από χονδροκύτταρα και από άλλες ενώσεις του εξωκυττάρου χώρου, όπως πρωτεογλυκάνες, λιπίδια, ανόργανα άλατα. Μικροσκοπικά, ο αρθρικός χόνδρος απαρτίζεται από κύτταρα και θεμέλια ουσία, ενώ στερείται τελείως αγγείων και νεύρων. Ο ώριμος αρθρικός χόνδρος αποτελείται από 4 στοιβάδες: Την επιφανειακή, τη μεταβατική ή μέση, την ακτινωτή ή εν τω βάθει και την αποπιτανωμένη (Κορρές, Λυρίτης, Σουκάκος, 2010).

Στην οστεοαρθρίτιδα, αρχικά παρατηρείται απώλεια των επιφανειακών στιβάδων του αρθρικού χόνδρου, που ακολουθείται από αύξηση του αριθμού των χονδροκυττάρων των υπολοίπων στιβάδων. Η αντοχή του χόνδρου μειώνεται και εμφανίζονται κάθετες ρωγμές. Οι ίνες κολλαγόνου λόγω διάσπασης των πρωτεογλυκανών, χάνουν την αντοχή τους και αναδεικνύονται στην επιφάνεια του χόνδρου σαν θύσανοι από λεπτά ινίδια (ινοποίηση, fibrillation του χόνδρου). Νεόπλαστα αγγεία διαπερνούν τη μεταβατική, αποπιτανωμένη ζώνη, η οποία υφίσταται μικρορωγμές που ο οργανισμός προσπαθεί να επουλώσει με αγγειοβριθή, ινοχόνδρινο συνδετικό ιστό. Ο μεταβολισμός στα αρχικά στάδια είναι αυξημένος και παρατηρείται αύξηση της δραστηριότητας των χονδροκυττάρων στη σύνθεση πρωτεογλυκανών, προκειμένου να αντιρροπήσουν τις μεγάλες απώλειες (Κορρές, Λυρίτης, Σουκάκος, 2010).

Ωστόσο, με την εξέλιξη της νόσου ο αρθρικός χόνδρος αδυνατεί να αντιρροπήσει τις βλάβες. Τα αυξημένα σε μέγεθος και αριθμό χονδροκύτταρα, μη μπορώντας να έχουν επαρκή διατροφή, υφίστανται αυτολυτική ενζυμική καταστροφή για να εξασφαλίσουν ενέργεια και διατροφή στα εναπομείναντα κύτταρα. Η συνολική μεταβολική δραστηριότητα των χονδροκυττάρων μειώνεται και η σύνθεση πρωτεογλυκανών υπολείπεται της αποδόμησης. Η απώλεια όλο και περισσότερης θεμέλιας ουσίας απογυμνώνει τα κολλαγόνα ινίδια, τα οποία χάνουν την αντοχή τους και κατακερματίζονται. Τα κύτταρα αδυνατούν να συνθέσουν υψηλής διαφοροποίησης κολλαγόνο τύπου 2 και παράγουν κολλαγόνο τύπου 1. Ο αρθρικός χόνδρος είναι υπεραιμικός, υπερπλάσσεται και σχηματίζει λάχνες. Τα τελικά στάδια της νόσου χαρακτηρίζονται από πλήρη εξαφάνιση του αρθρικού χόνδρου (Κορρές, Λυρίτης, Σουκάκος, 2010).

## Histology of Human Normal and Osteoarthritic Cartilage



Ο φυσιολογικός χόνδρος έχει λεία αρθρική επιφάνεια, ενώ ο πάσχων χόνδρος παρουσιάζει ινοποίηση, ρωγμές στην αρθρική επιφάνεια και ομαδοποίηση κυττάρων στην επιφανειακή ζώνη

Εικόνα 3: <http://www.med.nyu.edu/medicine/labs/abr>

### Γ1) Ανάλυση μεγάλης έκτασης της γονιδιακής έκφρασης σε πρώιμη πειραματική οστεοαρθρίτιδα

Στο πειραματικό ζωικό μοντέλο που αντιστοιχεί σε μετατραυματική οστεοαρθρίτιδα στους ανθρώπους, προκλήθηκε χειρουργικά φθορά του χόνδρου σε 5 αρουραίους, ενώ 4 εβδομάδες μετά το χειρουργείο, το μοντέλο προσομοίαζε την πρώιμη οστεοαρθρίτιδα στους ανθρώπους. Η χειρουργική επαγωγή επιτεύχθηκε με διατομή του πρόσθιου χιαστού συνδέσμου και μερική έσω μηνισκεκτομή στο δεξιό γόνατο. Εικονική επέμβαση πραγματοποιήθηκε σε 5 επιπλέον ζώα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Και οι δύο ομάδες υποβλήθηκαν σε αναγκαστική κινητοποίηση 3 φορές την εβδομάδα για ένα μήνα. Το RNA εκχυλίστηκε άμεσα από τα αρθρικά χονδροκύτταρα των ομόπλευρων (δεξιών) οστεοαρθριτικών, των ετερόπλευρων (αριστερών) και των ψευδοχειρουργημένων γονάτων. Στη συνέχεια μικροσυστοιχίες χρησιμοποιήθηκαν για να αξιολογηθούν οι αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης σε μεγάλη έκταση του γονιδιώματος. Τα πρότυπα έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων με διαφορεική έκφραση, συμπεριλαμβανομένων των *Col2a1*, *Mmp13*, *Adamts5*, *Ctsc*, *Ptges* και *Cxcr4* επιβεβαιώθηκαν με RT-PCR, ανοσοφθορισμό ή ανοσοιστοχημεία στις 2, 4 και 8 εβδομάδες μετεγχειρητικά (Appleton et al, 2007).

Η σύγκριση των δειγμάτων σύστοιχου χόνδρου με τα δείγματα από τους ποντικούς που υπεβλήθησαν σε εικονικό χειρουργείο, αποκάλυψε 1,619 διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια με αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης κατά 1.5 φορές, 722 με αλλαγές κατά 2 φορές, 135 με αλλαγές κατά 4 φορές και 20 με αλλαγές κατά 8 φορές. Η σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων ετερόπλευρου χόνδρου με τα δείγματα των μαρτύρων έδειξε 398 διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια με αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης κατά 1.5 φορές, 91 με αλλαγές κατά 2 φορές και 10 με αλλαγές κατά 4 φορές. Κανένα γονίδιο δεν είχε τροποποιημένα επίπεδα έκφρασης κατά 8 φορές. Επίσης, 354 από τα 398 γονίδια που ήταν διαφορετικά ρυθμισμένα στον ετερόπλευρο χόνδρο, είχαν διαφορετική ρύθμιση και στον σύστοιχο χόνδρο στους αρουραίους με την νόσο και η πλειοψηφία αυτών είχε αλλάξει προς την ίδια κατεύθυνση, δηλαδή ή αυξήθηκε ή μειώθηκε η έκφραση και στα δύο. Η μόνη εξαίρεση ήταν τα επίπεδα του *Ptgs2* (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2) και του *Masp1* (Mannose-binding lectin-associated serine protease 1), η έκφραση των οποίων μειώθηκε στον ετερόπλευρο χόνδρο και αυξήθηκε στον σύστοιχο χόνδρο. Οι διαφορές στη γονιδιακή έκφραση μεταξύ δειγμάτων ετερόπλευρου χόνδρου και δειγμάτων μαρτύρων μπορεί να οφείλονται στην τροποποιημένη εμβιομηχανική (τροποποιημένος φόρτος στην ετερόπλευρη άρθρωση) ή σε συστηματικούς παράγοντες (π.χ. μεσολαβητές της φλεγμονής) που κυκλοφορούν καθώς η νόσος εξελίσσεται στον σύστοιχο χόνδρο (Appleton et al,2007).

Από τα απορρυθμισμένα γονίδια με γνωστές λειτουργίες, 52% εμπλέκονταν στον μεταβολισμό, 25% στην κυτταρική επικοινωνία, 12% στην κυτταρική διαφοροποίηση και 11% στη μεταγραφή. Η εκτίμηση ειδικών ταξινομήσεων έδειξε ότι η διαφορετική ρύθμιση των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, συνιστώσες του κυτταροσκελετού, υποδοχείς, συνδέτες, αυξητικούς παράγοντες, κυττοκίνες, πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, πρωτεολυτικά ένζυμα και αποπτωτικούς παράγοντες, συμβαίνει στην πρώιμη πειραματική οστεοαρθρίτιδα. Έχει ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα έκφρασης των περισσότερων απορρυθμισμένων γονιδίων που ανήκουν στις κατηγορίες των μορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, των συνδετών, των κυττοκινών, των αυξητικών παραγόντων και των πρωτεολυτικών ενζύμων, ήταν αυξημένα (Appleton et al,2007).



Η τροποποιημένη παραγωγή των συνιστωσών της εξωκυττάριας ουσίας είναι συχνή στον πάσχοντα χόνδρο και παρατηρήθηκε στα δείγματα του σύστοιχου χόνδρου. Αυτή περιελάμβανε αυξήσεις στα επίπεδα διαφόρων τύπων κολλαγόνου, πολλά από τα οποία, όπως για παράδειγμα το *Col1a1*, δεν εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στον υγιή χόνδρο, αλλά ήταν αυξημένα κατά 2-4 φορές στα δείγματα από το σύστοιχο χόνδρο. Τα *Cspg2* (Versican), *Lum* (lumican) και *Sdc1* (syndecan 1) είχαν επίσης αυξημένη ρύθμιση. Ωστόσο, το *Col2a1* δεν ήταν σημαντικά απορυθμισμένο (Appleton et al, 2007).

Παρατήρησαν επίσης αυξημένη έκφραση μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως των *Ptges* (prostaglandin E synthase), *Ptgs2* (αυξημένη έκφραση, αλλά όχι σε σημαντικό επίπεδο) και *Tnfrsf25*, πρωτεασών (π.χ. *Mmp2*, *Mmp13* και *Adamts5*) και γονιδίων του αναβολισμού (κολλαγόνων, *Cspg2* και *Lum*). Πολλές άλλες ομάδες γονιδίων ήταν απορυθμισμένες, όπως μέλη του άξονα των IGF (insulin-like growth factor) στον οποίο για παράδειγμα ήταν αυξημένα τα επίπεδα πρωτεϊνών που προσδένουν τους IGF, οι οποίες απομονώνουν τους IGFs και εμποδίζουν την επιρροή τους στο αναβολισμό των χονδροκυττάρων. Δραματική αλλαγή παρατηρήθηκε επίσης στην έκφραση του *Ccl2* (αύξηση κατά 19 φορές στον σύστοιχο χόνδρο). Επιπλέον, παράγοντες της σηματοδότησης των χημειοκινών, συμπεριλαμβανομένων των *Cxcr4*, *Cklf1* και *Cx3cl* φαίνεται να εμπλέκονται στη φθορά του χόνδρου (Appleton et al, 2007).

Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεασών, συμπεριλαμβανομένων των *Adamts5*, *Mmp2* και *Mmp13*, όπως και τα *Chi3l1* [Chitinase 3-Like 1 (Cartilage Glycoprotein-39)] και *Tgfb2* ήταν αυξημένα στον σύστοιχο χόνδρο των αρουραίων με την νόσο (Appleton et al, 2007).

Τα γονίδια *Ctss* (Cathepsin S), *Reln* (Reelin), *Mmp13*, *Tgm2* (Transglutaminase 2), *Ecm1* (Extracellular matrix protein 1) και το *Fcgr3* (Fc receptor, IgG, low affinity III), *Ltbp2* (Latent transforming growth factor  $\beta$  binding protein 2) και το *Phex* (Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked) που είχαν αυξημένη ρύθμιση στον σύστοιχο χόνδρο, έχουν αυξημένη ρύθμιση κατά τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων. Το επίπεδο της έκφρασης του *Cxcr4* που είναι αυξημένο κατά την διαφοροποίηση των

χονδροκυττάρων, ήταν αυξημένο και στον σύστοιχο χόνδρο 4 εβδομάδες μετά το χειρουργείο (Appleton et al,2007).

Η RT-PCR επιβεβαίωσε τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των *Mmp13*, *Adamts5*, *Ptgs2*, *Ptges* και *Ccl2* καθώς και νέων γονιδίων συμπεριλαμβανομένων του *Ednra* (Endothelin Receptor Type A), που ρυθμίζει τη σηματοδότηση μέσω της ενδοθηλίνης 1 (Preece et al,2003) και του *Kitl* (Kit ligand), το οποίο ενεργοποιεί το πρωτοογκογονίδιο *c-kit* (Lasczkowski et al, 2002) στο σύστοιχο χόνδρο. Τα αυξημένα επίπεδα mRNA των *Ctsc* (καθεψίνη C) και *Cxcr4* στις 4 εβδομάδες επίσης επαληθεύτηκαν με την εφαρμογή RT-PCR. Η ανοσοιστοχημεία επιβεβαίωσε τα δεδομένα για τα δύο γονίδια και έδειξε ότι το επίπεδο έκφρασης της καθεψίνης C ήταν αυξημένο στο σύστοιχο χόνδρο στις 2, 4 και 8 εβδομάδες μετεγχειρητικά σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Ωστόσο, το επίπεδο έκφρασης της CXCR4 δεν ήταν αυξημένο μέχρι τις 4 εβδομάδες μετεγχειρητικά και αυξήθηκε περαιτέρω στις 8 εβδομάδες (Appleton et al,2007).

## **Γ2) Συγκριτική ανάλυση των προφίλ γονιδιακής έκφρασης σε άθικτες και σε κατεστραμμένες περιοχές ανθρώπινου οστεοαρθρικού χόνδρου**

Δείγματα αρθρικού χόνδρου ελήφθησαν από ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα γονάτου κατά το χειρουργείο ολικής αντικατάστασης με σκοπό την ανάλυση των διαφορών μεταξύ των προφίλ γονιδιακής έκφρασης των χονδροκυττάρων από διαφορετικές περιοχές της ίδιας άρθρωσης γονάτου. Τα δείγματα χόνδρου με λεία επιφάνεια και αρχιτεκτονική υαλώδους χόνδρου και χωρίς ινοποίηση ορίστηκαν ως άθικτη περιοχή του οστεοαρθρικού χόνδρου, ενώ τα δείγματα με σχισμές, διάφορες συστάδες κυττάρων και ινοποίηση ορίστηκαν ως κατεστραμμένες περιοχές του οστεοαρθρικού χόνδρου. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των προφίλ γονιδιακής έκφρασης των περιοχών του άθικτου και του κατεστραμμένου χόνδρου. Συγκεκριμένα, 5 ζεύγη άθικτων και κατεστραμμένων περιοχών αξιολογήθηκαν με ανάλυση μικροσυστοιχιών ολιγονουκλεοτιδίων και αναγνωρίστηκαν 114 γονίδια εκ των οποίων 35 γονίδια είχαν μεγαλύτερη έκφραση στις άθικτες περιοχές σε σχέση με τις κατεστραμμένες και 79 γονίδια είχαν μεγαλύτερη έκφραση στις κατεστραμμένες σε σχέση με τις άθικτες (Sato et al,2006).

Τα ακόλουθα γονίδια είχαν υψηλή έκφραση στην άθικτη περιοχή του χόνδρου (Sato et al, 2006). Το ETS1 (*ETS1-v-Ets-1 erythroblastosis virus E26*

oncogene homolog) είναι μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων Ets και μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση πολλών MMPs (Wasylyk et al, 1991) (Sun and Yokota, 2001). Το *GUCY1A3* (soluble guanylate cyclase 1a3 subunit) λειτουργεί ως βασικός υποδοχέας για το νιτρικό οξύ. Το *GPC5* (glypican 5) κωδικοποιεί μια πρωτεογλυκάνη, η οποία λειτουργεί σαν συν-υποδοχέας για διάφορους αυξητικούς παράγοντες που προσδένουν ηπαρίνη (Saunders et al, 1997). Τα *APOD* κωδικοποιεί την απολιποπρωτεΐνη D, η οποία είναι μέλος της οικογένειας μεταφορικών πρωτεϊνών που δεσμεύουν προγεστερόνη και αραχιδονικό οξύ (Morais Cabral et al, 1995). Το *FGF13* (fibroblast growth factor 13) κωδικοποιεί μια ενδοκυττάρια πρωτεΐνη, η οποία δεν μπορεί να ενεργοποιήσει κανένα FGF υποδοχέα (Goldfarb, 2005). Το *MMP2* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη MMP-2, η οποία είναι ένζυμο που αποικοδομεί κολλαγόνο. Το *CHRD2* (chordin-like 2) κωδικοποιεί ένα αναστολέα της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών που εκφράζεται κατά προτίμηση στα χονδροκύτταρα του αναπτυσσόμενου χόνδρου και του χόνδρου στην οστεοαρθρίτιδα (Nakayama et al, 2004). Το *C4BPA* (complement component 4 binding protein a subunit) κωδικοποιεί μια ρυθμιστική πρωτεΐνη του κλασσικού μονοπατιού του συμπληρώματος. Το γονίδιο *VIT* (Vitrin) κωδικοποιεί πρωτεΐνη της οικογένειας του παράγοντα von Willebrand και ίσως λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ των ινών κολλαγόνου και του δικτύου του υαλουρονικού (Mayne et al, 1999).

Τα ακόλουθα γονίδια είχαν αυξημένη έκφραση στην κατεστραμμένη περιοχή του χόνδρου (Sato et al, 2006). Το γονίδιο *SOX11* (Sex determining region Y-type high mobility group box 11) παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδιοργάνωση των ιστών, συμπεριλαμβανομένης της κρανιοπροσωπικής και σκελετικής ιστικής αναδιοργάνωσης (Sock et al, 2004). Το γονίδιο *CCND1* κωδικοποιεί την κυκλίνη D1, η οποία είναι βασική συνιστώσα του πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων στην αυξητική πλάκα (Beier et al, 2001). Το γονίδιο *PSAT* (Phosphoserine aminotransferase 1) κωδικοποιεί ένα ένζυμο που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της L-σερίνης και τα επίπεδα mRNA για το *PSAT* φαίνεται ότι έχουν αυξημένη ρύθμιση στις κατεστραμμένες περιοχές του χόνδρου για την υποστήριξη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Baek et al, 2003). Το γονίδιο *P4HA3* (Prolyl 4-hydroxylase a polypeptide III) κωδικοποιεί ένα πολυπεπτιδίο το οποίο αποτελεί συνιστώσα της 4-υδροξυλάσης της προλίνης

που είναι ένζυμο κλειδί στην σύνθεση του κολλαγόνου (Kukkola et al, 2003). Το γονίδιο *UCP2* (Uncoupling protein 2) κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αποσύζευξης 2, η οποία είναι ένας μεταφορέας μιτοχονδριακών ανιόντων που επίσης προστατεύει το κύτταρο από τον επαγόμενο από το οξειδωτικό στρες κυτταρικό θάνατο (Teshima et al, 2003). Το *GALNTL1* (UDP-N-acetyl-a-D-galactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1) κωδικοποιεί ένα ένζυμο που καταλύει την αρχική αντίδραση της βιοσύνθεσης των Ο-συνδεσμένων ολιγοσακχαριτών. Το *S100A4* (S100 calcium binding protein A4) εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τις μετάστασεις όγκων (Sherbet and Lakshmi, 1998). Το *DSCR1* (Down syndrome critical region gene 1) δρα σαν ένας αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης της καλσινευρίνης, η οποία είναι γνωστό ότι διεγείρει την χονδρογένεση (Fuentes et al, 2000), (Tomita et al, 2002). Το *TREM1* (Triggering receptor expressed on myeloid cells 1) παίζει ρόλο στην οξεία φλεγμονή, ενώ το *TNFAIP6* (Tumor necrosis factor a-induced protein 6) εμποδίζει την ενεργοποίηση των MMPs (Maier et al, 1996), (Wisniewski et al, 1996). Το *CRLF1* (Cytokine receptor-like factor 1) εκφράζεται στα χονδροκύτταρα και τους οστεοβλάστες και παίζει ρόλο στο σχηματισμό χόνδρου και οστού (Clancy et al, 2003). Το *PTGES* (Prostaglandin E synthase) κωδικοποιεί τη συνθετάση της προσταγλαδίνης E, η οποία εμπλέκεται στο ανοσοποιητικό σύστημα και την άμυνα. Το *ADAM12* και το *EPB41L3* (Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3), το οποίο κωδικοποιεί μια δομική πρωτεΐνη που προσδένει τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, είχαν επίσης αυξημένη έκφραση στις κατεστραμμένες περιοχές του χόνδρου (Sato et al, 2006). Το *TGFBI* (Transforming growth factor a-induced 68 kd) ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις κυτάρου-κολλαγόνου στο χόνδρο (Hashimoto et al, 1997). Το *CLEC3B* (C-type lectin domain family 3, member B) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας που προσδένει το πλασμινογόνο, η οποία παίζει ρόλο στην ιστική αύξηση και αναδιοργάνωση (Iba et al, 2001).

Από τα 114 γονίδια που αναγνωρίστηκαν, κανένα δεν συσχετιζόταν με την απόπτωση. Τα *CCND1*, *PSAT* και *S100A4* είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Είναι ενδιαφέρον ότι 3 γονίδια που κωδικοποιούν κολλαγόνο, τα *COL1A1*, *COL1A2* και *COL5A1*, καθώς και 4 ένζυμα βιοσύνθεσης κολλαγόνου, *P4HA3*, *LOXL2*, *LEPREL1*, *LOXL3* ήταν

εκφρασμένα σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στα χονδροκύτταρα από την κατεστραμμένη περιοχή του χόνδρου σε σχέση με αυτά από την άθικτη περιοχή (Sato et al, 2006). Επιπλέον, 4 πρωτεάσες (DKFZP586H2123, ADAMTS6, ADAM12, PRSS11) είχαν αυξημένη έκφραση στις κατεστραμμένες περιοχές του χόνδρου. Ωστόσο, η MMP-2, η οποία μπορεί να αποδομήσει εξωκυττάρια ουσία, είχε αυξημένη έκφραση στις άθικτες περιοχές του χόνδρου (Sato et al,2006). Συγκεκριμένα το γονίδιο *PRSS11* έχει αναφερθεί ότι ενισχύει την εκφύλιση του χόνδρου μέσω πέψης βασικών συνιστωσών του χόνδρου (Tsuchiya et al,2005) , ενώ τα SNPs του *ADAM12* σχετίζονται με την πρόοδο της οστεοαρθρίτιδας γόνατος (Valdes et al,2004).

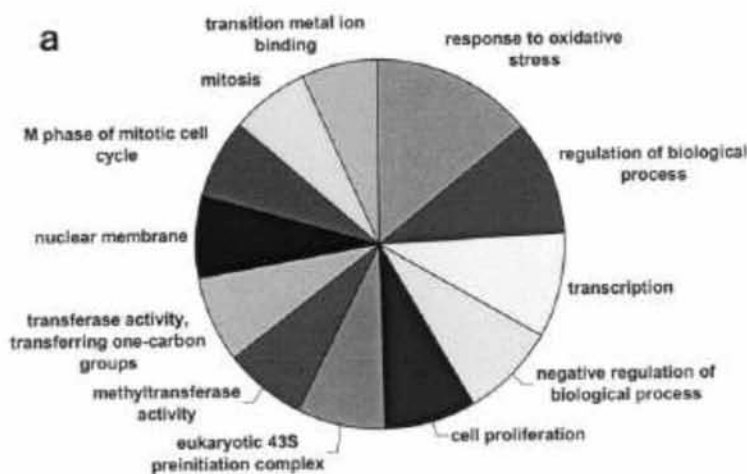
Η υψηλή έκφραση των *NGFB* (Nerve growth factor beta), *IGFBP3* (Insulin-like growth factor-binding protein 3), *IGFBP4* και *HSPG2* (Heparan Sulfate Proteoglycan 2) στην κατεστραμμένη περιοχή, όπως επίσης και η υψηλή έκφραση των *MMP13* και *HAPLN1* (Hyaluronan and proteoglycan link protein 1) στην άθικτη περιοχή του χόνδρου ήταν σε συμφωνία με άλλες μελέτες σύγκρισης άθικτων και κατεστραμμένων περιοχών του χόνδρου της πάσχουσας από οστεοαρθρίτιδα άρθρωσης. Ωστόσο, δεν παρατήρησαν έκφραση του γονιδίου *NTRK1* (Neurotrophic Tyrosine Kinase, Receptor, Type 1) ή διαφορετική έκφραση των *IGFBP5*, *BCL2* (B-Cell CLL/Lymphoma 2) και *SOX9* (Sato et al,2006).

Τέλος, RT-PCR εφαρμόστηκε για 8 γονίδια (*CHRD2*, *APOD*,*FGF13*, *TIMP3*, *S100A4*, *TGFB1*, *PTGES*, *TNFAIP6*) και τα αποτελέσματα ήταν σε συμφωνία με αυτά των μικροσυστοιχιών (Sato et al,2006).

### **Γ3) Προφίλ γονιδιακής έκφρασης μεγάλης κλίμακας σε ανθρώπινα δείγματα**

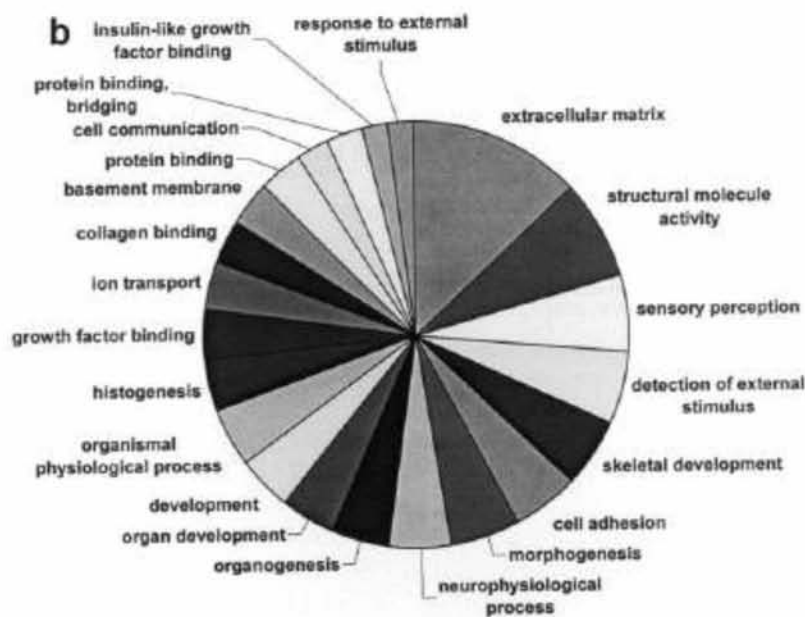
Η μελέτη αποτέλεσε το πρώτο εκτεταμένο προφίλ γονιδιακής έκφρασης χονδροκυττάρων φυσιολογικού χόνδρου, πρώιμου εκφυλιστικού χόνδρου, χόνδρου με ήπια οστεοαρθρίτιδα και χόνδρου με μέτρια/ σοβαρή όψιμη οστεοαρθρίτιδα. Για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης του mRNA με τεχνικές cDNA array και PCR, χρησιμοποιήθηκε χόνδρος από ανθρώπινους μηριαίους κονδύλους. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 18 δείγματα φυσιολογικού χόνδρου και 20 δείγματα χόνδρου με πρώιμη εκφύλιση, η λήψη των οποίων έγινε κατά την αυτοψία εντός 48 ωρών από τον θάνατο. Η λήψη

χόνδρου από ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα πραγματοποιήθηκε κατά την ολική αντικατάσταση γονάτου και συγκεκριμένα 21 δείγματα ελήφθησαν από ασθενείς με ήπια νόσο και 19 δείγματα από ασθενείς με μέτρια ή σοβαρή νόσο. Αναγνωρίστηκαν πολλά γονίδια με διαφορεική έκφραση και όπως αναμενόταν παρατηρήθηκε αυξορύθμιση των αναβολικών και καταβολικών γονιδίων. Ειδικότερα, η μειορύθμιση σημαντικών γονιδίων της οξειδωτικής άμυνας, όπως των γονιδίων για τα υπεροξειδία της δισμουτάσης 2 και 3 και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης 3, ήταν εμφανής. Επιπλέον, γονίδια που εμπλέκονται στην φαινοτυπική σταθερότητα των κυττάρων, ένα χαρακτηριστικό πολύ μειωμένο στον χόνδρο ασθενών με οστεοαρθρίτιδα, φάνηκαν να είναι κατασταλμένα (Aigner et al,2006).



Λειτουργικοί ρόλοι γονιδίων με μειωμένη ρύθμιση στον αρθρικό χόνδρο ασθενών με οστεοαρθρίτιδα τελικού σταδίου σε σύγκριση με τον φυσιολογικό.

Εικόνα 4: Aigner et al, 2006



Λειτουργικοί ρόλοι γονίδιων με αυξημένη ρύθμιση στον αρθρικό χόνδρο ασθενών με οστεοαρθρίτιδα τελικού σταδίου σε σύγκριση με τον φυσιολογικό

Εικόνα 5: Aigner et al, 2006

Για την εξέταση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης των χονδροκυττάρων, αρχικά επικεντρώθηκαν στη βασική λειτουργία αυτού του κυτταρικού τύπου, δηλαδή τη συντήρηση και τον μεταβολισμό της μεσοκυττάριας ουσίας του χόνδρου. Αρχικά, ερευνήθηκαν γονίδια που εμπλέκονται στον αναβολισμό. Τα κολλαγόνα τύπου II και III είχαν σημαντική αυξορύθμιση στον περιφερικό και κεντρικό χόνδρο με οστεοαρθρίτιδα, ενώ το κολλαγόνο τύπου I (*COL1A1*, *COL1A2*) είχε επίσης αυξημένη ρύθμιση. Τα κολλαγόνα τύπου VI (*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*), IX (*COL9A2*, *COL9A3*) και XI (*COL11A1*, *COL11A2*) επίσης βρέθηκαν να έχουν σημαντικά αυξημένη ρύθμιση, αλλά σε μικρότερο βαθμό (Aigner et al, 2006).

Σε αντίθεση με τα κολλαγόνα, οι άλλες πρωτεΐνες της μεσοκυττάριας ουσίας είχαν γενικά μικρότερη αυξορύθμιση στα χονδροκύτταρα στην οστεοαρθρίτιδα εκτός από την fibromodulin (*FMOD*), την CILP (Cartilage intermediate-layer protein), τη φιμπρονεκτίνη (*FN1*), την τενασκίνη C (*TNC*) και την οστεονεκτίνη (*SPARC*). Μια άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν ότι οι περισσότερες από τις μη κολλαγονικές πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας ήταν πολύ πιο υψηλά εκφρασμένες στον φυσιολογικό αρθρικό χόνδρο από ότι τα κολλαγόνα (Aigner et al, 2006).

Η έκφραση του *SOX9*, ενός σημαντικού μεταγραφικού παράγοντα που σχετίζεται με την φαινοτυπική σταθερότητα των χονδροκυττάρων, ήταν

σημαντικά μειωμένη. Η ανάλυση με ποσοτική PCR επιβεβαίωσε την αυξημένη έκφραση των κολλαγόνων τύπου I, II και III, όπως και τη μειωμένη έκφραση του SOX9 στα δείγματα χόνδρου των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα (Aigner et al, 2006).

Συνολικά, μόνο 15 γονίδια ήταν διαφορετικά ρυθμισμένα σε σημαντικό βαθμό μεταξύ των δειγμάτων φυσιολογικού χόνδρου και των δειγμάτων πρώιμου εκφυλιστικού χόνδρου. Ωστόσο, τα γονίδια με σημαντική διαφορική έκφραση ανάμεσα στα χονδροκύτταρα φυσιολογικού χόνδρου και στα χονδροκύτταρα από ασθενείς με προχωρημένο στάδιο οστεοαρθρίτιδας ήταν πολλά περισσότερα. Ενώ πολυάριθμα γονίδια που εμπλέκονται στον σχηματισμό της εξωκυττάριας ουσίας είχαν αυξημένη ρύθμιση, πολλά γονίδια που εμπλέκονται στην οξειδωτική άμυνα, συγκεκριμένα τα *GPX3* (Glutathione peroxidase 3), *SOD2* (superoxide dismutase), *SOD3* (Superoxide Dismutase 3, Extracellular) και *TXNIP* (Thioredoxin-interacting protein) είχαν μειωμένη ρύθμιση. Τα ευρήματα αναφορικά με την έκφραση των *GPX3* και *SOD2* επιβεβαιώθηκαν με ποσοτική PCR (Aigner et al, 2006).

Η ισχυρή μειωμένη έκφραση βασικών συνιστωσών της οξειδωτικής κυτταρικής άμυνας είναι μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση δεδομένου ότι το οξειδωτικό στρες αυξάνεται στα χονδροκύτταρα στην οστεοαρθρίτιδα. Η μεγάλη μειωμένη έκφραση των ενζύμων αυτών είναι μάλλον μια σημαντική αιτία για την αυξημένη συσσώρευση οξειδωτικώς κατεστραμμένων μορίων μέσα στα κύτταρα. Επιπλέον, η μειωμένη έκφραση των εξωκυττάριας ισομορφών των *SOD3* και *GPX3* ίσως οδηγεί σε αύξηση των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου στον εξωκυττάρια χώρο και ίσως ενισχύουν με αυτό τον τρόπο την καταστροφή της μεσοκυττάριας ουσίας του χόνδρου (Aigner et al, 2006), (Tiku et al, 1999).

Άλλα ενδιαφέροντα ευρήματα αφορούσαν τα γονίδια της οικογένειας *tob* (transducer of ERBB2) /*btg* (B cell translocation gene) και συγκεκριμένα τα *tob1*, *btg1* και *btg2* (Aigner et al, 2006). Η μειωμένη έκφραση αυτών των γονιδίων ταιριάζει με το σενάριο των κυτταρικών βιολογικών αλλαγών που συμβαίνουν στον αρθρικό χόνδρο στην νόσο (Matsuda et al, 2001), (Gebauer et al, 2005). Τα μόρια της οικογένειας *btg/tob* πιστεύεται ότι εμπλέκονται στην σταθεροποίηση του φαινοτύπου των κυττάρων και στην αναστολή της πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας, οι οποίες είναι αμφότερα ανεστραμμένες



στα χονδροκύτταρα στην οστεοαρθρίτιδα. Για τα γονίδια *tob1* και *btg2* τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν με qPCR (Aigner et al, 2006).

Μια άλλη ομάδα γονιδίων με διαφορεική ρύθμιση περιελάμβανε πολυάριθμα γονίδια που κωδικοποιούν κυττοκίνες ή γονίδια που εμπλέκονται στην σηματοδότηση με κυττοκίνες. Πολλά γονίδια που σχετίζονται με το μονοπάτι της IL-1, όπως για παράδειγμα τα γονίδια *IL1B*, *IL6*, *IL-8* και *LIF* (leukemia inhibitory factor), δεν είχαν αυξημένη ρύθμιση όπως αναμενόταν, αλλά μειωμένη ρύθμιση στα χονδροκύτταρα στην οστεοαρθρίτιδα. Επιπρόσθετα, ο λειτουργικός ανταγωνιστής /scavenger υποδοχέας τύπου II είχε μειωμένη ρύθμιση. Ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης σχετικών γονιδίων ήταν πολύ χαμηλά σε όλα τα δείγματα, το οποίο δικαιολογεί μια προειδοποίηση σχετικά με την αξιοπιστία των δεδομένων παρά την στατιστική σημαντικότητα (Aigner et al, 2006).

Τέλος, οι συγκρίσεις των γονιδίων που ήταν διαφορεικά εκφρασμένα μεταξύ των δειγμάτων χόνδρου ασθενών με ήπια οστεοαρθρίτιδα και αυτών με μέτρια ή σοβαρή νόσο, έδειξαν ότι μόνο 14 γονίδια πληρούσαν τα κριτήρια διαφορεικής έκφρασης. Η ομοιότητα αυτή ίσως αντανάκλα το γεγονός ότι όλες οι περιοχές του χόνδρου σε μια άρθρωση εκτίθενται στους ίδιους παράγοντες, όπως οι κυττοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες, οι οποίοι εκκρίνονται από τα κύτταρα του αρθρικού υμένα και διαχέονται στο χόνδρο διαμέσου της αρθρικής κοιλότητας (Aigner et al, 2006).

### Πίνακας 5: Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια (Aigner et al, Arthritis Rheum, 2006)

Στον πρώιμο εκφυλιστικό χόνδρο σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα	<b><i>PLRG1</i></b> (Pleiotropic regulator 1), <b><i>FN1</i></b> (Fibronectin 1), <b><i>SNAI2</i></b> (Snail homolog 2), <b><i>DSIPI</i></b> (Delta sleep-inducing peptide, immunoreactor), <b><i>KDEL</i></b> (endoplasmic reticulum protein retention receptor 2), <b><i>PTP4A2</i></b> (Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2), <b><i>ADAM8</i></b> (A disintegrin and metalloproteinase domain 8), <b><i>FUS</i></b> (Fused in sarcoma), <b><i>RAB1A</i></b> (RAB1A, member RAS oncogene family), <b><i>COPS6</i></b> (COP9 subunit 6), <b><i>TRADD</i></b> (Tumor necrosis factor receptor I-
--	--

	<p>associated death domain), <b>VIP</b> (macroglobulin family protein VIP), <b>RALY</b> (RNA binding protein), <b>RABAC1</b> (Rab acceptor 1)</p>
<p>Στο χόνδρο με μέτρια/σοβαρή τελικού σταδίου οστεοαρθρίτιδα σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα</p>	<p><b>COL1A1</b>, <b>SELH</b> (Selenoprotein H), <b>TNC</b>, <b>COL3A1</b>, <b>COL2A1</b>, <b>COL5A1</b>, <b>IL1R2</b>, <b>FN1</b>, <b>PRSS11</b> [Protease, serine, 11 (IGF binding)], <b>COL1A2</b>, <b>SPARC</b> (osteonectin), <b>CRTAC1</b> (Cartilage acidic protein 1), <b>COL6A2</b> (Collagen, type VI, α2), <b>CILP</b> (Cartilage intermediate-layer protein), <b>COL11A1</b>, <b>COL6A1</b>, <b>FMOD</b>, <b>CASP10</b> (Caspase 10, apoptosis-related cysteine), <b>CHI3L2</b> (Chitinase 3–like 2), <b>TIMP1</b> (Tissue inhibitor of metalloproteinases 1), <b>GPX3</b> (Glutathione peroxidase 3), <b>C/EBP</b> (CCAAT/enhancer binding protein), <b>TXNIP</b> (Thioredoxin-interacting protein), <b>MMP3</b>, <b>SCD4</b> (Stearoyl-CoA desaturase 4), <b>SHMT</b> (Serine hydroxymethyltransferase 2), <b>MT1E</b> (Metallothionein 1E), <b>DUSP1</b> (Dual-specificity phosphatase 1), <b>C17</b> (Cytokine-like protein C17), <b>BTG2</b> (BTG family, member 2), <b>MT1G</b> (Metallothionein 1G), <b>IGFBP6</b>, <b>MT1X</b> (Metallothionein 1X), <b>TOB1</b> (Transducer of ERBB2, 1), <b>GLUL</b> (Glutamate-ammonia ligase), <b>NNMT</b> (Nicotinamide N-methyltransferase), <b>SOD2</b> (Superoxide dismutase 2, mitochondrial)</p>
<p>Στο χόνδρο με μέτρια/σοβαρή τελικού σταδίου οστεοαρθρίτιδα σε σχέση με το χόνδρο με ήπια οστεοαρθρίτιδα</p>	<p><b>JAG1</b> (Jagged 1), <b>CKLiK</b> (CamKI-like protein kinase), <b>FN1</b>, <b>COL1A1</b>, <b>PRSS11</b>, <b>P11</b> (26 serine protease), <b>TNC</b>, <b>CKB</b> (Creatine kinase, brain), <b>CRTAC1</b> (Cartilage acidic protein 1), <b>COL5A1</b>, <b>ATP1A1</b> (ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, α1 polypeptide), <b>C17</b> (Cytokine-like protein C17), <b>CLEC</b> (C-type lectin, superfamily member 1), <b>ERp18</b> (Endoplasmic reticulum thioredoxin superfamily member, 18 kd)</p>

#### **Γ4) Μελέτη γονιδιακής έκφρασης χονδροκυττάρων στις διάφορες ζώνες του οστεοαρθρικού χόνδρου**

Όπως προαναφέρθηκε με βάση τα ιστολογικά του χαρακτηριστικά, ο αρθρικός χόνδρος πάνω από την αποπιτανωμένη στοιβάδα χωρίζεται σε 3 διακριτές στοιβάδες, την επιφανειακή, τη μέση και την εν τω βάθει, στις οποίες η μορφολογία και η πυκνότητα των χονδροκυττάρων διαφέρουν. Η σύνθεση της εξωκυττάριας ουσίας επίσης διαφέρει μεταξύ των ζωνών. Ενώ η επιφανειακή ζώνη είναι πλούσια σε κολλαγόνα, η μέση και η εν τω βάθει ζώνες περιέχουν περισσότερες πρωτεογλυκάνες από την επιφανειακή ζώνη (Mow and Hung, 2003). Ο μεταβολισμός των χονδροκυττάρων επίσης διαφέρει μεταξύ των ζωνών (Fukui et al, 2008).

Ο σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός του μεταβολισμού των χονδροκυττάρων στις αντίστοιχες ζώνες του οστεοαρθρικού χόνδρου. Έτσι δείγματα χόνδρου ελήφθησαν από μακροσκοπικά ακέραιες περιοχές και τα προφίλ γονιδιακής έκφρασης των χονδροκυττάρων προσδιορίστηκαν με μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων, οι οποίες εστιάστηκαν σε 527 γονίδια τα οποία σχετίζονται με τα χονδροκύτταρα και 11 housekeeping γονίδια. Τα δείγματα χόνδρου ελήφθησαν από 4 ασθενείς με τελικού σταδίου οστεοαρθρίτιδα γόνατος κατά την χειρουργική επέμβαση και συγκεκριμένα από την περιοχή του πλευρικού μηριαίου κονδύλου που φέρει το βάρος (Fukui et al, 2008).

Η RT-PCR ανάλυση εφαρμόστηκε σε επιλεγμένα γονίδια για να επιβεβαιώσει τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μικροσυστοιχιών όσον αφορά την έκφραση τους στο χόνδρο ασθενών με οστεοαρθρίτιδα και στο χόνδρο μαρτύρων. Συγκεκριμένα, 16 δείγματα οστεοαρθρικού χόνδρου και 13 δείγματα χόνδρου μαρτύρων χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση και σε κάθε δείγμα ο χόνδρος διαχωρίστηκε σε 3 ζώνες με την χρήση LCM (Fukui et al, 2008).

Επιπλέον, επέλεξαν 26 γονίδια λαμβάνοντας υπόψη την διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των ζωνών ( $\geq 2$  φορές μεταξύ οποιονδήποτε ζωνών), τις εντάσεις σήματος και τη σχετικότητα όσον αφορά την παθολογία της νόσου και αυτά τα γονίδια κατηγοριοποιήθηκαν σε 3 ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελούταν από 13 γονίδια που κωδικοποιούν συνιστώσες του αρθρικού χόνδρου. Η δεύτερη ομάδα περιείχε 8 γονίδια τα οποία εκφράζονται

κατά την υπερτροφική αλλαγή των χονδροκυττάρων και γονίδια που εκφράζονται στους οστεοβλάστες. Τα γονίδια που κωδικοποιούν μεταλλοπρωτεϊνάσες οι οποίες θα μπορούσαν να προωθούν τον εκφυλισμό του χόνδρου τοποθετήθηκαν στην τρίτη ομάδα. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μικροσυστοιχιών και της RT-PCR συγκρίθηκαν σε αυτές τις 3 ομάδες αντίστοιχα (Fukui et al, 2008).

Η ανάλυση με μικροσυστοιχίες έδειξε ότι περίπου 40% των γονιδίων που εξετάστηκαν ήταν εκφρασμένα σε σημαντικά διαφορετικά επίπεδα μεταξύ των ζωνών. Αυτή διακύμανση ανά ζώνη θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει την διαφορά στον κυτταρικό μεταβολισμό μεταξύ των ζωνών και τις αλλαγές που προκαλούνται λόγω της νόσου. Παρά τη διαφορά αυτή στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης, μια παρόμοια αλλαγή ανά ζώνη παρατηρήθηκε στο χόνδρο των μαρτύρων. Ως εκ τούτου, θεωρήθηκε ότι η έκφραση αυτών των γονιδίων ήταν ενισχυμένη (ή μειωμένη) εξίσου κατά μήκος των 3 ζωνών μέσω κάποιου μηχανισμού που εμπλέκεται στην νόσο (Fukui et al, 2008).

Συνολικά 198 γονίδια βρέθηκαν να εκφράζονται σε σημαντικά διαφορετικά επίπεδα μεταξύ των ζωνών. Η έκφραση 26 από αυτών αξιολογήθηκε με LCM (Laser capture microdissection) και RT-PCR, τα οποία επιβεβαίωσαν την εγκυρότητα των μικροσυστοιχιών (Fukui et al, 2008).

Η έκφραση των γονιδίων της μεσοκυττάριας ουσίας ήταν κυρίως ενισχυμένη στον πάσχοντα χόνδρο σε παρόμοια επίπεδα κατά μήκος των ζωνών, αλλά σε διαφορετικά μεγέθη μεταξύ των γονιδίων. Η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με τα οστά παρατηρήθηκε είτε στην επιφανειακή είτε στην εν τω βάθει ζώνη. Η έκφραση 5 γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεϊνάσες ήταν κυρίως ενισχυμένη στην επιφανειακή ζώνη, όπου υπήρχε συσχέτιση στην έκφραση τους γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία ενός κοινού ρυθμιστικού μηχανισμού για την έκφραση τους. Μεταξύ των 11 housekeeping γονιδίων, η έκφραση 4 από αυτών (ακτίνη,  $\beta 2$  μικροσφαιρίνη, φωσφογλυκερινική κινάση 1, υποδοχέας τρανσφερίνης) ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ των ζωνών (Fukui et al, 2008).

Η έκφραση 198 από τα 527 γονίδια που σχετίζονται με τα χονδροκύτταρα ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ κάθε 2 ζωνών του χόνδρου. Μεταξύ της επιφανειακής και της μέσης ζώνης, η έκφραση 93 γονιδίων διέφερε σημαντικά. Μεταξύ αυτών, 9 γονίδια είχαν 2 φορές μεγαλύτερη έκφραση στην

επιφανειακή ζώνη, ενώ άλλα 7 γονίδια είχαν 2 φορές μεγαλύτερη έκφραση στην μέση ζώνη. Συνολικά, 115 γονίδια ήταν εκφρασμένα σε σημαντικά διαφορετικά επίπεδα μεταξύ της μέσης και της εν τω βάθει ζώνης. Η έκφραση 12 από αυτών ήταν αυξημένη κατά 2 ή περισσότερες φορές στη μέση ζώνη, ενώ άλλα 9 γονίδια είχαν αυξημένη έκφραση κατά 2 ή περισσότερες φορές στην εν τω βάθει ζώνη. Μεταξύ αυτών των γονιδίων, η έκφραση της *MMP13* ήταν περισσότερο αυξημένη στην μέση ζώνη, ενώ η έκφραση του *WNT5B* ήταν πιο ενισχυμένη στην εν τω βάθει ζώνη (Fukui et al, 2008).

**Πίνακας 6: Σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ της επιφανειακής και της μέσης ζώνης (Fukui et al, Arthritis Rheum 2008)**

Μεγαλύτερη έκφραση στην επιφανειακή ζώνη	<i>CRABP2</i> (Cellular retinoic acid binding protein 2), <i>TNFAIP6</i> (Tumor necrosis factor a-induced protein 6), <i>MATN6</i> (Matrilin 4), <i>TNA</i> (Tetranectin), <i>WNT5B</i> , <i>MMP13</i> , <i>POSTN</i> , <i>DAF</i> (Decay-accelerating factor for complement), <i>TIMP3</i>
Μεγαλύτερη έκφραση στη μέση ζώνη	<i>COL10A1</i> , <i>LECT1</i> (Leukocyte cell-derived chemotaxin 1), <i>FGF13</i> , <i>CHAD</i> , <i>MATN3</i> , <i>ITM2A</i> (Integral membrane protein 2A), <i>MMP9</i>

**Πίνακας 7: Σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ της μέσης και της εν τω βάθει ζώνης (Fukui et al, Arthritis Rheum 2008)**

Μεγαλύτερη έκφραση στη μέση ζώνη	<i>MMP13</i> , <i>C3</i> , <i>FGF7</i> , <i>COL12A1</i> , <i>CHI3L1</i> (Chitinase-3-like 1), <i>LAMA4</i> , <i>MMP2</i> , <i>CHI3L2</i> , <i>FAP</i> (Fibroblast activation protein a), <i>TIMP1</i> , <i>GRM1</i> (Glutamate receptor metabotropic 1), <i>MMP3</i>
Μεγαλύτερη έκφραση στην εν τω βάθει ζώνη	<i>WNT5B</i> , <i>SPP1</i> (Secreted phosphoprotein 1), <i>IBSP</i> , <i>TNFRSF11B</i> , <i>MATN3</i> , <i>COL10A1</i> , <i>SLC26A2</i> , <i>TNFAIP6</i> , <i>PLOD2</i> (Procollagen-llysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2)

Η έκφραση 126 γονιδίων διέφερε σημαντικά μεταξύ της επιφανειακής και της εν τω βάθει ζώνης. Η έκφραση 25 από τα 126 γονίδια ήταν αυξημένη κατά 2 φορές ή περισσότερο στην επιφανειακή ζώνη. Η έκφραση του *MMP13* ήταν η πιο αυξημένη ακολουθούμενη από την έκφραση του *MMP2* και του *POSTN*. Εν τω μεταξύ, η έκφραση άλλων 23 γονιδίων ήταν αυξημένη κατά 2 φορές ή περισσότερο στην εν τω βάθει ζώνη. Η έκφραση του *COL10A1* ήταν η πιο αυξημένη (σχεδόν 30 φορές), ακολουθούμενη από τα *LECT1* (Leukocyte cell-derived chemotaxin 1), *MATN3*, *IBSP* (Integrin-binding sialoprotein) και *SPP1* (Secreted phosphoprotein 1) (Fukui et al,2008).

**Πίνακας 8: Σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ της επιφανειακής και της εν τω βάθει ζώνης (Fukui et al, Arthritis Rheum 2008)**

<b>Μεγαλύτερη έκφραση στην επιφανειακή ζώνη</b>	<i>MMP13, MMP2, POSTN, COL12A1, FAP, GRM1, MATN4, TMSB4X</i> (Thymosin, b4, X-linked), <i>CHI3L2, LAMA4, FGF7, ECM1, ADAMTS5, TNA, CHI3L1, ITGB5, THBS2, MMP11, TNC, IGFBP5, GADD45A, PLTP</i> (Phospholipid transfer protein)
<b>Μεγαλύτερη έκφραση στην εν τω βάθει ζώνη</b>	<i>COL10A1, LECT1, MATN3, IBSP, SPP1, CHAD, SLC26A2, GPC5</i> (Glypican 5), <i>ITM2A, TNFRSF11B, PLOD2, CILP, HAPLN1, GREM1</i> (Gremlin 1 homolog, cysteine knot superfamily), <i>FRZB</i> (Frizzled-related protein), <i>S100A1, COL2A1, COL11A1, AGC1</i> (Aggrecan 1, transcript variant 1), <i>COL2A1, COL9A2, CPE</i> (Carboxypeptidase E), <i>SPARC</i>

Όσον αφορά τα 13 γονίδια της μεσοκυττάριας ουσίας του χόνδρου, τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών ήταν γενικά σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της RT-PCR. Έκτος από το γονίδιο *CHI3L1*, η έκφραση όλων των γονιδίων ήταν ενισχυμένη στον οστεοαρθρικό χόνδρο. Επιπλέον, εντός του χόνδρου το επίπεδο της αύξησης ήταν παρόμοιο και στις 3 ζώνες, αλλά ο βαθμός της αύξησης της έκφρασης ήταν σημαντικά διαφορετικός μεταξύ των

γονιδίων. Για παράδειγμα, ενώ η έκφραση των *LECT1* και *TNC* ήταν αυξημένη κατά 40 και 220 φορές αντίστοιχα στον οστεοαρθρικό χόνδρο, η αύξηση της έκφρασης του *CHAD* (chondroadherin) ήταν μόνο κατά 2 φορές. Αυτό το εύρημα ίσως συνεπάγεται ένα μη αναγνωρισμένο, αλλά δυνητικά σημαντικό μηχανισμό για την εξέλιξη της νόσου (Fukui et al,2008).

Η σχετική μείωση της έκφρασης των *COL9A2* και *COL11A1* στον οστεοαρθρικό χόνδρο ίσως οδηγεί στην ευθραυστότητα του νεοσυντιθέμενου χόνδρου, το οποίο ίσως διευκολύνει την απώλεια της μεσοκυττάριας ουσίας του χόνδρου (Fukui et al,2008).

Για την ομάδα των σχετιζόμενων με τα οστά γονιδίων, τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών ήταν επίσης σε συμφωνία με αυτά της RT-PCR. Η έκφραση των *COL1A2*, *POSTN* και *TNA* (Tetranectin) ήταν πιο ενισχυμένη στην επιφανειακή ζώνη του οστεοαρθρικού χόνδρου. Εν τω μεταξύ, η έκφραση των *COL10A1*, *IBSP*, *SPARC* (secreted protein, acidic, cysteine-rich) και *WNT5B* ήταν υψηλότερη στην εν τω βάθει ζώνη. Αφού η έκφραση αυτών των γονιδίων στο χόνδρο των μαρτύρων ήταν πολύ χαμηλή, η έκφραση τους στις συγκεκριμένες ζώνες του οστεοαρθρικού χόνδρου δείχνει τη φαινοτυπική αλλαγή των χονδροκυττάρων σε αυτές τις περιοχές. Επίσης, μεγάλη διαφορά παρατηρήθηκε στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων οστεοαρθρικού χόνδρου. Για παράδειγμα, το επίπεδο έκφρασης του *COL10A1* στην εν τω βάθει ζώνη διέφερε περισσότερο από  $1 \times 10^4$  φορές μεταξύ των δειγμάτων. Το γεγονός ότι η έκφραση τους επάχθηκε είτε στην επιφανειακή ζώνη είτε στην εν τω βάθει ζώνη και όχι και στις δύο ίσως αντικατοπτρίζει την εμφάνιση διακριτικών φαινοτυπικών αλλαγών σε αυτές τις ζώνες (Fukui et al, 2008). 3 από τα γονίδια που εκφράζονται στην επιφανειακή ζώνη (*COL1A2*, *POSTN* και *TNA*) εκφράζονται από τους οστεοβλάστες (Wewer et al,1994), (Horiuchi et al,1999). Εν τω μεταξύ, τα γονίδια *COL10A1* και *WNT5B*, που εκφράζονται στην εν τω βάθει ζώνη, εκφράζονται χαρακτηριστικά στα χονδροκύτταρα που υφίστανται υπερτροφική αλλαγή (Church et al, 2002). Ως εκ τούτου ο φαινότυπος στην επιφανειακή ζώνη ίσως θα μπορούσε να συσχετίζεται με μια πτυχή της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, ενώ στην εν τω βάθει ζώνη με υπερτροφία των χονδροκυττάρων.

Τέλος, όσον αφορά τα γονίδια που κωδικοποιούν μεταλλοπρωτεϊνάσες, τα αποτελέσματα της RT-PCR ήταν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των

μικροσυστοιχιών για τα 5 γονίδια που εξετάστηκαν (*MMP2*, *ADAMTS5*, *MMP11*, *MMP13*, *MMP3*). Έχει ενδιαφέρον ότι η έκφραση 2 γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνάσες ή δεν ήταν τροποποιημένα (*ADAMTS5*) ή ήταν σχετικά μειωμένα (*MMP3*) στον οστεοαρθρικό χόνδρο σε σύγκριση με το χόνδρο των μαρτύρων. Ειδικότερα, η έκφραση των *MMP11* και *MMP13* ήταν πολύ ενισχυμένη στον οστεοαρθρικό χόνδρο έως και πάνω από 40 φορές σε σύγκριση με τον χόνδρο των μαρτύρων. Η έκφραση αυτών των γονιδίων ήταν πιο ενισχυμένη στην επιφανειακή ζώνη. Στην οστεοαρθρίτιδα, ο εκφυλισμός του χόνδρου αρχίζει από την επιφάνεια. Ως εκ τούτου, οι πρωτεΐνάσες θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνες για την έναρξη της εκφύλισης της μεσοκυττάριας ουσίας σε αυτή την περιοχή. Επιπλέον, η διαπίστωση ότι υπήρχε συσχέτιση στην έκφραση τους στην επιφανειακή ζώνη υπονοεί ότι αυτές οι πρωτεΐνάσες θα μπορούσαν να λειτουργούν συνεργικά σε ορισμένες περιπτώσεις για να προκαλέσουν εκφυλισμό του χόνδρου. Αυτή η συσχέτιση ίσως υποδεικνύει την παρουσία ενός κοινού ρυθμιστικού μηχανισμού για την έκφραση τους (Fukui et al, 2008).

#### **Γ5) Γονιδιωματική μελέτη μεγάλης έκτασης σε δείγματα αρθρικού χόνδρου από πάσχοντες από οστεοαρθρίτιδα γονάτου**

Αυτή η μελέτη ήταν η πρώτη που αποτέλεσε μια ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε ανθρώπινο οστεοαρθρικό χόνδρο σε σύγκριση με χόνδρο από μάρτυρες χωρίς μακροσκοπικά και μικροσκοπικά σημεία της νόσου. Συγκεκριμένα, οι βιοψίες χόνδρου προερχόταν από 5 πάσχοντες από την νόσο και 8 μάρτυρες χωρίς προηγούμενο ιστορικό οστεοαρθρίτιδας και μακροσκοπικά άθικτο χόνδρο. Το RNA που απομονώθηκε από τις βιοψίες υποβλήθηκε σε ανάλυση με whole-genome μικροσυστοιχίες. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μικροσυστοιχιών επαλήθευσαν τα δεδομένα των προηγούμενων ερευνών αναφορικά με την αυξημένη έκφραση αρκετών γονιδίων στον οστεοαρθρικό χόνδρο, αλλά οδήγησαν και στην εύρεση νέων γονιδίων που σχετίζονται με την νόσο (Karlsson et al, 2010).

Τα γονίδια με την αυξημένη έκφραση ( $\geq 60\%$  των τροποποιημένων γονιδίων) στον οστεοαρθρικό χόνδρο κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, την απόπτωση, την κυτταρική προσκόλληση, τον κυτταροσκελετό, την οστεοποίηση, την πρωτεόλυση, τη διαφοροποίηση και την παράγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, χημειοκίνες, κυττοκίνες και



ένζυμα. Από την άλλη πλευρά, ο αριθμός των γονιδίων με αυξημένη και μειωμένη ρύθμιση στον οστεοαρθρικό και στον φυσιολογικό χόνδρο ήταν ο ίδιος για τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στις τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, την μεταγωγή σήματος και μεταγραφικούς παράγοντες (Karlsson et al, 2010).

Είναι γνωστό ότι αρκετά γονίδια που συσχετίζονται με την οστική διαφοροποίηση έχουν αυξημένη ρύθμιση στην οστεοαρθρίτιδα. Τα αποτελέσματα τους περιελάμβαναν επιπρόσθετα γονίδια που συσχετίζονται με τον οστικό σχηματισμό, τα οποία είχαν αυξημένη έκφραση στον οστεοαρθρικό χόνδρο, όπως τα *CLEC3B*, *CDH11*, *GPNMB* [Glycoprotein (Transmembrane) Nmb], *CLEC3A*, *CHST11*, *MSX1* και *MSX2*. Κανένα γονίδιο με γνωστή λειτουργία στην προώθηση του οστικού σχηματισμού δεν εμφάνισε υψηλότερη έκφραση στο φυσιολογικό χόνδρο σε σχέση με τον οστεοαρθρικό. Όσον αφορά τα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα, η έκφραση του *MMP19* ήταν αυξημένη κατά 13.6 φορές στον οστεοαρθρικό χόνδρο. Άλλα ένζυμα με αυξημένη έκφραση στον οστεοαρθρικό χόνδρο περιλαμβάνουν τα *ADCY7*, *HSD3B7*, *RNASE1*, *PDE4B* και *ACP5*. Αυξητικοί παράγοντες με αυξημένη έκφραση στον οστεοαρθρικό χόνδρο περιλαμβάνουν τους FGF1 και LTBP1 (Karlsson et al, 2010).

Ενισχυμένη παραγωγή μεσοκυττάριας ουσίας στον οστεοαρθρικό χόνδρο ανιχνεύθηκε μέσω της αυξημένης έκφρασης αρκετών γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν συνιστώσες της μεσοκυττάριας ουσίας σε σύγκριση με το φυσιολογικό χόνδρο. Μεταξύ αυτών, 10 γονίδια που δεν είχαν προηγουμένως συσχετιστεί με την νόσο. Αρκετά γονίδια που κωδικοποιούν κολλαγόνο, συμπεριλαμβανομένων των *COL13A1*, *COL14A1*, *COL15A1* και *COL8A2* έδειξαν σημαντικά αυξημένη μεταγραφή. Άλλα γονίδια, που σχετίζονται με την μεσοκυττάρια ουσία και ήταν υπερεκφρασμένα, περιλαμβάνουν τα *LAM4*, *ECM1*, *FBLN5*, *ECM2*, *SPON2* και *EFEMP1*. Μεταγραφικοί παράγοντες, όπως οι *TBX15*, *HOXA11*, *DLX5* και *ZBTB16* είχαν μειωμένη ρύθμιση στον οστεοαρθρικό χόνδρο. Επιπλέον, αρκετές κυττοκίνες, συμπεριλαμβανομένων των *TNFRSF12A* και *TNFRSF21* και των χημειοκινών, όπως τα *CXCL2*, *CXCL14*, *CCL4* και *CXCL3*, είχαν αυξημένη έκφραση στον οστεοαρθρικό χόνδρο (Karlsson et al, 2010).

Το *COL8A2*, κωδικοποιεί ένα κολλαγόνο βραχείας αλύσου που ανήκει σε μια υποομάδα non-fibrillar κολλαγόνων (Karoog et al,1988). Αυτή η ομάδα αποτελείται από τα κολλαγόνα τύπου VIII και X, που παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες στην δομή και πιθανώς στη λειτουργία (Muragaki et al,1992). Το κολλαγόνο τύπου VIII φαίνεται να εκκρίνεται από κύτταρα που πολλαπλασιάζονται ταχέως, το οποίο ίσως εξηγεί την αυξημένη έκφραση του στον οστεοαρθρικό χόνδρο (Karlsson et al,2010).

Το κολλαγόνο τύπου XIV είναι ένα σχετιζόμενο με τα ινίδια κολλαγόνο, το οποίο χρησιμεύει ως πρωτεΐνη προσκόλλησης (Watt et al,1992). Εξαιτίας της υψηλότερης έκφρασης του στον πάσχοντα χόνδρο, ίσως είναι σημαντικό για τις αρχικές εκφυλιστικές αλλαγές του. Το *COL15A1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με εξέχουσα έκφραση σε νεοσχηματισμένα αιμοφόρα αγγεία, γεγονός που υποδεικνύει ένα πιθανό ρόλο στην αγγειογένεση. Η αυξημένη έκφραση του στον πάσχοντα χόνδρο είναι σε συμφωνία με την αυξημένη έκφραση άλλων γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση, όπως τα *RUNX1*, *CXCL2/Gro-β*, *CCL4* και *CCL2* (Karlsson et al,2010).

Το *COL13A1* κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II, η οποία δρα σε περιοχές κυτταρικής προσκόλλησης (Sasaki et al, 2002). Η υπερέκφραση του κολλαγόνου τύπου XIII στους σκελετικούς ιστούς μετά την γέννηση έχει σαν αποτέλεσμα ανώμαλα αυξημένη οστική μάζα, υποδεικνύοντας ότι η υπερέκφραση που εντοπίζεται στον οστεοαρθρικό χόνδρο ίσως καταλήγει σε διαφοροποίηση προς τον υπερτροφικό φαινότυπο (Ylonen et al, 2005). Αυτό είναι σε συμφωνία με την αυξημένη έκφραση γνωστών δεικτών για την υπερτροφία και τον οστικό σχηματισμό που είναι γνωστό ότι συσχετίζονται με την νόσο.

Το *SPON1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, την f-σπονδίνη, η οποία έχει συσχετιστεί με την οστεοαρθρίτιδα. Το *SPON1* συν-εκφράζεται με υπερτροφικούς δείκτες και έχει προταθεί ότι δρα in situ σε αλλοιωμένες περιοχές ενεργοποιώντας τον TGF-β και επάγοντας την εκφύλιση του χόνδρου μέσω μονοπατιών που εμπλέκονται στην παραγωγή προσταγλαδίνης E2 (Atour et al, 2009). Το *SPON1* είχε αυξημένη έκφραση στον οστεοαρθρικό χόνδρο (Karlsson et al, 2010). Μια άλλη συνιστώσα της εξωκυττάριας ουσίας, η οποία αποδείχθηκε ότι είχε πολύ αυξημένη ρύθμιση

στην νόσο ήταν το *FBLN5*, το οποίο είναι γνωστό ότι εκφράζεται σε αναπτυσσόμενο χόνδρο (Aspberg et al,1999).

Άλλα γονίδια με αυξημένη ρύθμιση στον πάσχοντα χόνδρο τα οποία σχετίζονται με τον οστικό σχηματισμό περιλαμβάνουν τα *CDH11*, *CLEC3B*, *GPNMB* και 2 γονίδια της οικογένειας *Msx* (*MSX1*, *MSX2*). Ένα άλλο γονίδιο που έδειξε αυξημένη έκφραση στον πάσχοντα χόνδρο ήταν το *CHST11*, το οποίο κωδικοποιεί την χονδροϊτίνη 4-σουλφοτρανσφεράση (Karlsson et al, 2009). Τα ποντίκια με έλλειψη της πρωτεΐνης παρουσιάζουν αυξητικές πλάκες με λιγότερα κύτταρα και χωρίς οργάνωση, επιτάχυνση της ωρίμανσης των χονδροκυττάρων και ινοποίηση στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Επιπλέον, υπάρχει μείωση του περιεχομένου των γλυκοζαμινογλυκανών και ιδιαίτερα του περιεχομένου της *aggrecan* στις αυξητικές πλάκες (Kluppel et al,2005). Πολλές από αυτές τις ελλείψεις της αυξητικής πλάκας είναι χαρακτηριστικές των εκφυλιστικών αλλαγών που συμβαίνουν στο χόνδρο κατά τη νόσο. Τα αποτελέσματα τους επιβεβαιώνουν την εμπλοκή του *CHST11* στην οστεοαρθρίτιδα. Η υψηλότερη έκφραση αυτού του γονιδίου στον οστεοαρθρικό χόνδρο ίσως εξηγεί σε ένα βαθμό ή είναι το αποτέλεσμα του τροποποιημένου αναπτυξιακού φαινοτύπου των χονδροκυττάρων.

Η έλλειψη ισορροπίας των *MMPs* είναι ίσως το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου. Το *MMP19* γονίδιο ήταν πιο εκφρασμένο στην εν τω βάθει ζώνη του αρθρικού χόνδρου σε σύγκριση με τον φυσιολογικό χόνδρο (Karlsson et al, 2010). Η *MMP19* δεν διασπά κολλαγόνο τύπου I, αλλά αποικοδομεί την *aggrecan* με διάσπαση σε διαφορετική θέση σε σύγκριση με άλλες *MMPs* (Murphy et al, 1999). Ένα άλλο γονίδιο που δεν είχε προηγουμένως συσχετιστεί με τον χόνδρο ή τη νόσο, αλλά έδειξε σημαντικά αυξημένη έκφραση στον οστεοαρθρικό χόνδρο ήταν το *TFPI2*. Έχει αποδειχτεί ότι η *TFPI2* μειώνει την ικανότητα των κολλαγενασών *MMP1* και *MMP13* να διασπούν το κολλαγόνο, καθώς και τη δραστηριότητα των *MMP2* και *MMP9* και ως εκ τούτου η υψηλότερη έκφραση του στον οστεοαρθρικό χόνδρο ίσως δρα ενάντια στην εκφύλιση της εξωκυττάριας ουσίας (Karlsson et al, 2010).

Από τα γονίδια που δεν είχαν προηγουμένως συσχετιστεί με τη νόσο, έχει ενδιαφέρον να σημειωθεί η αυξημένη έκφραση του *SGPP1* στον οστεοαρθρικό χόνδρο. Η *SGPP1* ρυθμίζει την βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων

και είναι γνωστό ότι η *SGPP1* αποφωσφορυλιώνει την *S1P*, έχοντας ως αποτέλεσμα την σύνθεση κεραμιδίου και τελικά οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Επιπρόσθετα, η πιο υψηλή έκφραση του *SGPP1* εντοπίζεται στους ιστούς με μεγάλη αγγείωση του νεφρού και του πλακούντα, ενώ knockdown του γονιδίου έχει σαν αποτέλεσμα την σημαντική αντίσταση στην αναστολή της αύξησης (Johnson et al, 2003). Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου στον οστεοαρθρικό χόνδρο ίσως να οδηγεί σε αρκετά χαρακτηριστικά της νόσου, όπως η απόπτωση, η αγγειογένεση και ο πολλαπλασιασμός.

Η *LIF* είναι μια κυττοκίνη της οποίας η μεταγραφή ενισχύεται σημαντικά από τη διέγερση της ιντερλευκίνης-1β γεγονός που έως ένα βαθμό ίσως εξηγεί την υψηλότερη έκφραση του γονιδίου *LIF* που ανιχνεύθηκε στον οστεοαρθρικό χόνδρο (Fan et al, 2005). Είναι επίσης γνωστό ότι το *LIF* διεγείρει την απορρόφηση των πρωτεογλυκανών στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και οι αναστολείς του *LIF* θα μπορούσαν να είναι αποτελεσματικοί στην θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Lotz et al, 1992). Η υψηλότερη έκφραση του *LIF* στον οστεοαρθρικό χόνδρο που φάνηκε στην μελέτη καθιστά τους αναστολείς μια πιθανή θεραπεία και στην οστεοαρθρίτιδα.

Το γονίδιο *LTBP1*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη 1 πρόσδεσης στον TGF-β εμπλέκεται στην δέσμευση και την ενεργοποίηση των περισσοτέρων TGF-β στο οστό. Προηγούμενα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ποντίκια με έλλειψη *LTBP3* έχουν αρκετά σκελετικά ελαττώματα, όπως τροποποιημένο σχήμα κρανίου, οστεοσκλήρυνση και οστεοαρθρίτιδα, αλλαγές που πιθανόν οφείλονται σε μειωμένα επίπεδα TGF-β στον οστίτη ιστό (Koli et al, 2008). Τα αποτελέσματα της μελέτης είναι σε συμφωνία με αυτά τα δεδομένα, δείχνοντας ότι τα γονίδια *LTBP* δεν εμπλέκονται μόνο στην οστεοαρθρίτιδα στα ποντίκια, αλλά και στους ανθρώπους (Karlsson et al, 2010). Ένα άλλο γονίδιο σε αυτή την κατηγορία που είχε αυξημένη έκφραση στον οστεοαρθρικό ιστό ήταν το *FGF1*. Είχε προηγουμένως αποδειχθεί ότι η HBGF-I (heparin binding growth factor), πρόδρομος της *FGF1*, είναι ένα ισχυρό αγγειογόνο πεπτιδίο και υπερεκφράζεται στην ρευματοειδή αρθρίτιδα (Sano et al, 1990). Η αυξημένη έκφραση του *FGF1* στον οστεοαρθρικό χόνδρο ίσως εξηγεί σε κάποιο βαθμό την αγγείωση που έχει ανιχνευτεί στην οστεοαρθρίτιδα.

Το γονίδιο *TNFRSF12A*, το οποίο σχετίζεται με τις κυττοκίνες φάνηκε να έχει αυξημένη ρύθμιση στον οστεοαρθρικό χόνδρο (Karlsson et al, 2010). Η πρωτεΐνη *TNFRSF12A* έχει αναγνωριστεί ότι είναι ένας υποδοχής *TWEAK* (TNF-like weak inducer of apoptosis) και έχει αναφερθεί ότι επάγει την απόπτωση και την έκφραση των φλεγμονωδών κυττοκινών (Schneider et al, 1999), (Wiley et al, 2001). Η *TNFRSF12A* έχει περαιτέρω αποδειχθεί ότι εκφράζεται γύρω από της βλάβες στο χόνδρο και η αυξημένη έκφραση και των δύο γονιδίων *TNFRSF12A* και *TNFRSF21* ίσως εξηγεί σε κάποιο βαθμό την αυξημένη απόπτωση στον οστεοαρθρικό χόνδρο (Goto et al, 2008).

Για να επιβεβαιώσουν τα προφίλ γονιδιακής έκφρασης που ελήφθησαν από την ανάλυση των μικροσυστοιχιών, η έκφραση των 7 πιο διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων από τις μικροσυστοιχίες αναλύθηκε και με real-time PCR. Η ανάλυση real-time PCR έδειξε το ίδιο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης με την ανάλυση με μικροσυστοιχίες και για τα 7 γονίδια (*MMP9*, *CLEC3B*, *COL13A1*, *TFPI2*, *RGS1*, *CXCL2*, *TNFRSF12A*). Μεταξύ των γονιδίων των οποίων η έκφραση επαληθεύτηκε με την εφαρμογή RT-PCR, τα *CXCL2* και *TFPI2* είχαν την μεγαλύτερη διαφορική έκφραση ανάμεσα στον οστεοαρθρικό και στον φυσιολογικό χόνδρο, επομένως ήταν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μικροσυστοιχιών (Karlsson et al, 2010).

Η επαλήθευση με ανοσοιστοχημεία έδειξε ότι η έκκριση *MMP19* και κολλαγόνου τύπου VIII στον φυσιολογικό χόνδρο ήταν περιορισμένη στην επιφάνεια του χόνδρου, ενώ και οι δύο πρωτεΐνες εκκρινόταν σε αφθονία στην οστεοαρθρίτιδα (Karlsson et al, 2010).

#### **Γ6) Προφίλ γονιδιακής έκφρασης σε προσβεβλημένες και άθικτες περιοχές του χόνδρου στην ίδια άρθρωση**

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 5 ασθενείς με αρθρίτιδα γόνατος χρησιμοποιώντας μια νέα τεχνική εξαγωγής RNA και μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων ολόκληρου του γονιδιώματος. Ένα υποσύνολο 411 μεταγράφων φάνηκε να έχει διαφορική έκφραση, εκ των οποίων 342 είναι γνωστά γονίδια. Από αυτά, 6 γονίδια είχαν αυξημένη ρύθμιση στην προσβεβλημένη περιοχή του χόνδρου και των 5 ασθενών, συμπεριλαμβανομένων των *IGFBP-3*, *WISP-1*, *AQP-1*, *DNER*, *DAF* (decay accelerating factor), *IF I* (complement factor I). Επιπλέον, 36 γονίδια είχαν αυξημένη ρύθμιση και στους 4 και 159 στους 3 από τους 5 ασθενείς. Κανένα

γονίδιο δεν βρέθηκε να έχει μειωμένη ρύθμιση στην πάσχουσα περιοχή του χόνδρου και στους 5 ασθενείς, αλλά 14 γονίδια είχαν μειωμένη ρύθμιση σε 4 από τους 5 ασθενείς και 127 γονίδια σε 3 από τους 5 ασθενείς. Συνολικά, 201 γονίδια είχαν αυξημένη ρύθμιση στις προσβεβλημένες περιοχές του οστεοαρθρικού χόνδρου, ενώ 141 γονίδια είχαν μειωμένη ρύθμιση (Geyer et al, 2008).

Η RT-PCR εφαρμόστηκε στα 6 γονίδια με αυξημένη ρύθμιση για να επαληθεύσει τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε RNA από 5 επιπρόσθετα ζεύγη δειγμάτων προσβεβλημένου και άθικτου χόνδρου. Η έκφραση των γονιδίων ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ των δυο περιοχών, δηλαδή τα αποτελέσματα της PCR ήταν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών. Για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών για τις προσβεβλημένες περιοχές του χόνδρου σε πρωτεϊνικό επίπεδο, εφαρμόστηκε ανοσοιστοχημεία χρησιμοποιώντας αντισώματα εναντίον των AQP-1, WISP-1 και DAF. Η αυξημένη έκφραση του AQP-1 στον προσβεβλημένο ιστό περιοριζόταν στα χονδροκύτταρα των επιφανειακών περιοχών, ενώ η WISP-1 ήταν όλο και περισσότερο εκφρασμένη από τα χονδροκύτταρα κατά μήκος του προσβεβλημένου χόνδρου. Η έκφραση της DAF είχε επίσης τάση να είναι πιο εμφανής στις επιφανειακές περιοχές του προσβεβλημένου χόνδρου (Geyer et al, 2008).

Η έκφραση της IGFBP-3, η οποία προσδένει τους IGFs και ίσως αναστέλλει την αύξηση μέσω πρόσδεσης με τον IGF-1 (Martin and Baxter, 1986), έχει αναφερθεί ότι είναι αυξημένη στην οστεοαρθρίτιδα σε σύγκριση με τον υγιή χόνδρο (Iwanaga et al, 2005). Οι IGFbps διατηρούν την τοπική διαθεσιμότητα του IGF. Η IGFBP-3 επίσης βρέθηκε ότι σχηματίζει ένα σύμπλοκο μαζί με την φιμπρονεκτίνη και διατηρεί τον IGF-I στην μεσοκυττάρια ουσία γύρω από τα χονδροκύτταρα (Martin et al, 2002). Ως εκ τούτου οι IGFbps που παράγονται τοπικά, φαίνεται να δρουν ως αυτοκρινείς και/ή παρακρινείς ρυθμιστές της δραστηριότητας του IGF και με θετικό και με αρνητικό τρόπο. Επιπλέον, η αυξημένη παραγωγή της IGFBP-3 ίσως να μην εξηγείται μόνο από την επιρροή της φιμπρονεκτίνης, αλλά και από τις φλεγμονώδεις κυττοκίνες, όπως η IL-1 και ο TNF- $\alpha$  (Olney et al, 1995), όπως και από την προσταγλαδίνη E2

(DiBattista et al, 1996) , η οποία μπορεί επίσης να αυξήσει την έκφραση της IGFBP-3.

Η WISP-1 είναι μέλος της (CCN) οικογένειας των αυξητικών παραγόντων του συνδετικού ιστού, που υπερεκφράζονται στο νεφροβλάστωμα (Brigstock, 2003). Αναφορικά με το μυοσκελετικό σύστημα, η WISP-1 ασκεί σημαντική επιρροή στην οστική ανάπτυξη. Η WISP-1 λειτουργεί ως ένας παράγοντας που ενισχύει την οστεογένεση, προωθώντας τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων, ενώ καταστέλλει την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων *in vitro* (French et al, 2004). Η έκφραση του mRNA του WISP-1 έχει αναφερθεί σε μια σειρά χονδροκυττάρων που προερχόταν από χονδροσάρκωμα. Ο ρόλος της WISP-1 στην διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων φάνηκε να είναι πιο ειδικός στο στάδιο της εναπόθεσης ασβεστίου της ενδοχόνδριας οστεοποίησης (Yanagita et al, 2007). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η WISP-1 εκφράζεται επίσης από τα χονδροκύτταρα στην οστεοαρθρίτιδα *in vivo*, τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η WISP-1 ίσως εμπλέκεται την οστεοποίηση του χόνδρου, συμβάλλοντας στην τοπική οστεοπύρωση και τον σχηματισμό οστεοφύτων (Geyer et al, 2008).

Όσον αφορά την AQP-1 μέτρια έκφραση της έχει παρατηρηθεί σε φυσιολογικό αρθρικό χόνδρο, αλλά ήταν περιορισμένη στις βαθύτερες στοιβάδες του χόνδρου κοντά στο υποχόνδριο οστό (Mobasher and Marples, 2004). Στη μελέτη, η έκφραση της δεν περιοριζόταν στις βαθύτερες στοιβάδες, αλλά αυξημένο staining παρατηρήθηκε προς την επιφάνεια και ήταν πιο εμφανές στις περιοχές με επιφανειακή βλάβη σε σύγκριση με τα άθικτα τμήματα του χόνδρου. Η έκφραση της AQP-1 στο χόνδρο ίσως εξαρτάται από την υποκείμενη νόσο. Μπορεί λοιπόν η έκφραση της AQP-1 να συμβάλλει στην μεταβολή της εξαρτώμενης από το νερό ομοιόστασης των κυττάρων και της μεσοκυττάριας ουσίας, μια διεργασία-κλειδί στην παθοφυσιολογία της πρώιμης οστεοαρθρίτιδας (Geyer et al, 2008) .

Η DNER είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται ειδικά στα κύτταρα του αναπτυσσόμενου και του ώριμου κεντρικού νευρικού συστήματος (Eiraku et al, 2002). Έχει ενδιαφέρον ότι η DNER προσδένεται με τον Notch-1 στις διακυτταρικές επαφές και ενεργοποιεί τη σηματοδότηση Notch *in vitro*. Είναι γνωστό ότι η οικογένεια των πρωτεϊνών notch ελέγχει την μοίρα των κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους (Eiraku et al, 2005). Σε μοντέλο

ποντικού, ο Notch-1 εμπλεκόταν σε περίπλοκες αλληλεπιδράσεις κατά την οστεοποίηση και στην επιμήκυνση της αυξητικής πλάκας, στην οποία ο Notch-1 περιοριζόταν στα υπερτροφικά χονδροκύτταρα. Ο Notch-1 εκφράζεται επίσης στον αρθρικό χόνδρο των ποντικών, στον οποίο η σηματοδότηση του προτάθηκε ότι καθορίζει τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων (Hayes et al, 2003). Αφού οι τομείς του EGF έχουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία των πρωτεογλυκανών του χόνδρου, η DNER ίσως συμβάλλει στην ανεπαρκή προσπάθεια αναδιαμόρφωσης της μεσοκυττάριας ουσίας στην οστεοαρθρίτιδα.

Οι DAF και IF (conglutinogen-activating factor) ανήκουν στο σύστημα του συμπληρώματος. Η DAF, γνωστή και ως CD55, είναι μια ρυθμιστική πρωτεΐνη επιφανείας, η οποία προστατεύει τα κύτταρα από την μεσολαβούμενη από το συμπλήρωμα λύση. Μπορεί να προσδεθεί με τα C3b και C4b και να αποσυνδέσει την C3 κονβερτάση και του κλασσικού και του εναλλακτικού μονοπατιού (Lublin and Atkinson, 1989). Επιπλέον, η DAF έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε πάσχοντα χόνδρο από ανθρώπινη άρθρωση και άρθρωση χοίρου, ενώ η ρύθμιση της ήταν αυξημένη σε σχέση με τον φυσιολογικό χόνδρο (Davies et al, 1994). Η DAF εκφράζεται στην αρθρική επένδυση (synovial lining layer) και στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και στην οστεοαρθρίτιδα, όπως επίσης και στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα της άρθρωσης (Tarkowski et al, 1992). Η IF απενεργοποιεί την C3b του συμπληρώματος και σε αντίθεση με την DAF, δεν φαίνεται να σχετίζεται με τη μεμβράνη.

Τέλος, έχει ενδιαφέρον ότι στους 4 από τους 5 ασθενείς παρατηρήθηκε αύξηση της ρύθμισης του κολλαγόνου τύπου 1 και τα αποτελέσματα αυτά ίσως δείχνει για ακόμα μια φορά την προσπάθεια των χονδροκυττάρων να αναδιαμορφώσουν την εξωκυττάρια ουσία (Geyer et al, 2008).

#### **Δ. Σύγκριση των ανωτέρω μελετών γονιδιακής έκφρασης**

Συγκρίνοντας τις προαναφερθείσες μελέτες γονιδιακής έκφρασης προκύπτει ότι 49 γονίδια είχαν διαφορετική έκφραση σε τουλάχιστον δύο ιστούς, εκ των οποίων 8 γονίδια ήταν διαφορετικά εκφρασμένα στο υποχόνδριο οστό, στον αρθρικό υμένα και στον αρθρικό χόνδρο, 25 γονίδια είχαν τροποποιημένη



έκφραση και στον αρθρικό χόνδρο και στο υποχόνδριο οστό, 9 γονίδια είχαν τροποποιημένη έκφραση και στον αρθρικό υμένα και στον αρθρικό χόνδρο, ενώ 7 διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια ήταν κοινά μεταξύ του υποχόνδριου οστού και του αρθρικού υμένα.

### Πίνακας 9: Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια σε:

<b>Υποχόνδριο οστό, αρθρικό υμένα και αρθρικό χόνδρο</b>	<i>COL1A2, COL3A1, COL6A3, MMP3, PTGES, WNT5B, FN1, HAPLN1</i>
<b>Υποχόνδριο οστό και αρθρικό υμένα</b>	<i>CCL19, RUNX2, STC1, MIF, COL16A1, WNT5A, TNFSF11 (RANKL)</i>
<b>Αρθρικό υμένα και αρθρικό χόνδρο</b>	<i>CTSS, CILP, CXCL2, MMP9, TNFAIP6, TREM1, IL8, IL6, DNER</i>
<b>Αρθρικό χόνδρο και υποχόνδριο οστό</b>	<i>ACP5, ADAM8, ADAMTS5, BTG2, CCL2, CCL4, COL1A1, COL5A1, COL6A2, COL9A2, COL11A2, HOXA11, IBSP, IGFBP3, MMP13, MMP2, WISP1, MATN3, POSTN, PRSS11, S100A4, TGFb2, TIMP1, FRZB, TNFRSF11B (OPG)</i>

### Συμπεράσματα

Συνολικά 49 γονίδια είχαν τροποποιημένη έκφραση σε τουλάχιστον 2 ιστούς. Τα γονίδια, τα οποία βρέθηκαν να έχουν τροποποιημένη έκφραση στο υποχόνδριο οστό, στον αρθρικό χόνδρο και στον αρθρικό υμένα των πασχόντων από οστεοαρθρίτιδα περιλαμβάνουν γονίδια που κωδικοποιούν κολλαγόνο (*COL1A2, COL3A1, COL6A3*) καθώς και το γονίδιο *MMP3*, το οποίο κωδικοποιεί τη μεταλλοπρωτεϊνάση 3 που εμπλέκεται στον καταβολισμό και στην οστική αναδιοργάνωση. Επιπλέον, το γονίδιο *PTGES* που κωδικοποιεί τη συνθάση της προσταγλαδίνης E, η οποία εμπλέκεται στη φλεγμονή και σχετίζεται με την μεταβολή της οστικής δομής καθώς και τα γονίδια *FN1* και *HAPLN1*, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, ήταν διαφορετικά εκφρασμένα και στους 3 ιστούς. Τέλος, το γονίδιο *WNT5B* κωδικοποιεί ένα μεσολαβητή του σηματοδοτικού μονοπατιού WNT, ο οποίος εμπλέκεται στη διαφοροποίηση

των οστεοβλαστών και των χονδροκυττάρων, και είχε μειωμένη ρύθμιση στις φλεγμονώδεις περιοχές του αρθρικού υμένα.

Τα γονίδια που είχαν τροποποιημένη έκφραση στο υποχόνδριο οστό και τον αρθρικό υμένα περιλαμβάνουν το γονίδιο *STC1*, το οποίο εμπλέκεται στην αγγειογένεση και την αναστολή της δραστηριότητας των οστεοκλαστών, το γονίδιο *MIF*, το οποίο κωδικοποιεί τον ανασταλτικό παράγοντα της μετανάστευσης των μακροφάγων, ο οποίος εμπλέκεται στην ανοσολογική απάντηση, το γονίδιο *CCL19* που κωδικοποιεί την χημειοκίνη 19 και το γονίδιο *COL16A1* που κωδικοποιεί το κολλαγόνο τύπου 16 alpha 1. Τα άλλα κοινά γονίδια μεταξύ των δύο ιστών είναι το γονίδιο *RUNX2*, το οποίο κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα *RUNX2*, ο οποίος εμπλέκεται στην προώθηση της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών μέσω του μονοπατιού TGFb/BMP και στην ανάπτυξη του χόνδρου, αποτελεί στόχο του σηματοδοτικού μονοπατιού WNT και παίζει ρόλο στη μεσολάβηση των δυο μονοπατιών. Τέλος, το γονίδιο *WNT5A*, είναι ένας αγωνιστής του σηματοδοτικού μονοπατιού WNT στους οστεοβλάστες και στα οστεοκύτταρα, ο οποίος συμμετέχει και στην διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, ενώ το γονίδιο *TNFSF11 (RANKL)* συμμετέχει στην ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών καθώς και στην ανοσολογική απάντηση.

Η πλειοψηφία των κοινών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων ανάμεσα στον αρθρικό υμένα και τον αρθρικό χόνδρο κωδικοποιούν μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως ιντερλευκίνες (*IL8*, *IL6*), χημειοκίνες (*CXCL2*), τον υποδοχέα *TREM1 (TREM1)* και την επαγόμενη από τον TNF-α πρωτεΐνη 6 (*TNFAIP6*). Τα γονίδια *CTSS* και *MMP9*, τα οποία εμπλέκονται στον καταβολισμό, το γονίδιο *CILP* που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της μεσοκυττάριας ουσίας του χόνδρου και το γονίδιο *DNER*, το οποίο εμπλέκεται στην αγγειογένεση είχαν επίσης τροποποιημένη έκφραση και στους δυο ιστούς.

Επιπλέον, 25 γονίδια ήταν διαφορικά εκφρασμένα και στον αρθρικό χόνδρο και στο υποχόνδριο οστό. Μεταξύ αυτών 5 γονίδια που κωδικοποιούν κολλαγόνα (*COL1A1*, *COL5A1*, *COL6A2*, *COL9A2*, *COL11A2*), 2 γονίδια που κωδικοποιούν μεταλλοπρωτεϊνάσες (*MMP13*, *MMP2*) και 2 γονίδια που

κωδικοποιούν χημειοκίνες (*CCL2*, *CCL4*). Τα γονίδια *ACP5*, *ADAM8*, *ADAMTS5*, *BTG2*, *HOXA11*, *IBSP*, *IGFBP3*, *WISP1*, *MATN3*, *POSTN*, *PRSS11*, *S100A4*, *TGFb2*, *TIMP1*, *FRZB*, *TNFRSF11B* (*OPG*) είχαν επίσης τροποποιημένη έκφραση και στους 2 ιστούς. Το γονίδιο *HOXA11* κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που εμπλέκεται στην ανάπτυξη του χόνδρου. Το γονίδιο *TIMP1* κωδικοποιεί τον ιστικό αναστολέα της μεταλλοπρωτεϊνάσης-1 και εμπλέκεται στη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των οστεοκλαστών. Το γονίδιο *BTG2* σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ το γονίδιο *POSTN* εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση καθώς και στη διαφοροποίηση και λειτουργία των οστεοβλαστών. Επιπλέον, το γονίδιο *ADAM8* έχει διεγερτικό ρόλο στο σχηματισμό και στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, το γονίδιο *ADAMTS5* εμπλέκεται στην πρωτεόλυση και στην οστική αναδιοργάνωση, ενώ το γονίδιο *WISP1* παίζει ρόλο στην οστική αναδιοργάνωση, την κυτταρική νέκρωση και την οστεοποίηση του χόνδρου.

Το γονίδιο *MATN3* εμπλέκεται στην ομοιόσταση και την ανάπτυξη του χόνδρου και του οστού. Το γονίδιο *S100A4* εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, είναι αρνητικός ρυθμιστής της εναπόθεσης ασβεστίου, αποτελεί στόχο του σηματοδοτικού μονοπατιού του WNT και έχει προ-αγγειογενετικές λειτουργίες. Το γονίδιο *IBSP* αποτελεί επίσης στόχο του σηματοδοτικού μονοπατιού του WNT και ρυθμίζει την εναπόθεση ασβεστίου, ενώ και το γονίδιο *FRZB* σχετίζεται με το μονοπάτι του WNT. Το γονίδιο *ACP5* κωδικοποιεί το ένζυμο όξινη φωσφατάση 5, το οποίο παίζει ρόλο στη διαφοροποίηση και την λειτουργία των οστεοκλαστών. Το γονίδιο *IGFBP3* επηρεάζει αρνητικά την αγγειογένεση, ενώ η υπερέκφραση της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί, παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και τον οστικό σχηματισμό. Τα γονίδια *PRSS11* και *TGFb2* εμπλέκονται στην σηματοδότηση μέσω TGF- $\beta$ . Τέλος, το *TNFRSF11B* (*OPG*) κωδικοποιεί ένα υποδοχέα κυττοκίνης, ο οποίος παίζει ρόλο στη λειτουργία και τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών.

Συνοψίζοντας τα 49 γονίδια που είχαν τροποποιημένη έκφραση σε τουλάχιστον 2 ιστούς της πάσχουσας από οστεοαρθρίτιδα άρθρωσης εμπλέκονται σε διεργασίες, όπως ο σχηματισμός, η διαφοροποίηση και η λειτουργία των οστεοκλαστών, η οστική αναδιοργάνωση, η οστική ανάπτυξη,

η διαφοροποίηση και η λειτουργία των οστεοβλαστών, η εναπόθεση ασβεστίου στα οστά, η φλεγμονή, η αγγειογένεση, η ανάπτυξη του χόνδρου, ο μεταβολισμός του χόνδρου, η διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, η σηματοδότηση μέσω WNT, η σηματοδότηση μέσω TGF- $\beta$ /BMP, η πρωτεόλυση, η ανοσολογική απάντηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική προσκόλληση, η κυτταρική μετανάστευση και η κυτταρική νέκρωση.

## Βιβλιογραφία

- Aigner Thomas, Katrin Fundel, Joachim Saas, Pia M. Gebhard, Jochen Haag, Tilo Weiss, Alexander Zien, Franz Obermayr, Ralf Zimmer and Eckart Bartnik. Large-Scale Gene Expression Profiling Reveals Major Pathogenetic Pathways of Cartilage Degeneration in Osteoarthritis. *Arthritis Rheum* Vol. 54, No. 11, November 2006, pp 3533–3544
- Altman RD. Early management of osteoarthritis. *Am J Manag Care* 2010 Mar; 16 Suppl Management: S41-7
- Appleton C. T. G., V. Pitelka, J. Henry and F. Beier<sup>1</sup>. Global Analyses of Gene Expression in Early Experimental Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* Vol. 56, No. 6, June 2007, pp 1854–1868
- Ashraf S, Walsh DA. Angiogenesis in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2008 Sep; 20(5):573-80
- Aspberg A, Adam S, Kostka G, Timpl R, Heinegard D. Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican. *J Biol Chem* 1999 Jul 16; 274(29):20444-9
- Atkins GJ, Kostakis P, Welldon KJ, Vincent C, Findlay DM, Zannettino AC. Human trabecular bone-derived osteoblasts support human osteoclast formation in vitro in a defined, serum-free medium. *J Cell Physiol* 2005 Jun; 203(3):573-82
- Attur MG, Palmer GD, Al-Mussawir HE, Dave M, Teixeira CC, Rifkin DB, et al. F-spondin, a neuroregulatory protein, is upregulated in osteoarthritis and regulates cartilage metabolism via TGF-beta activation. *FASEB J* 2009 Jan; 23(1):79-89

Ayral X, Pickering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis-- results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthritis Cartilage*.2005 May; 13(5):361-7

Baek JY, Jun Do Y, Taub D, Kim YH. Characterization of human phosphoserine aminotransferase involved in the phosphorylated pathway of L-serine biosynthesis. *Biochem J* 2003; 373:191–200.

Baillet A, Trocme C, Berthier S, Arlotto M, Grange L, Chenau J, et al. Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid arthritis from other inflammatory joint diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49(4):671-82.

Balooch G, Balooch M, Nalla RK, Schilling S, Filvaroff EH, Marshall GW, Marshall SJ, Ritchie RO, Derynck R, Alliston T: TGF-beta regulates the mechanical properties and composition of bone matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:18813-18818.

Beier F, Ali Z, Mok D, Taylor AC, Leask T, Albanese C, et al. TGFbeta and PTHrP control chondrocyte proliferation by activating cyclin D1 expression. *Mol Biol Cell* 2001; 12:3852–63.

Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64(9):1263-7.

Boissan M, Feger F, Guillosson JJ, Arock M. c-Kit and c-kit mutations in mastocytosis and other hematological diseases. *J Leukoc Biol* 2000; 67:135–48.

Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)*. 2005; 44(1):7-16.

Borzı RM, Mazzetti I, Cattini L, Uguccioni M, Baggiolini M, et al. (2000) Human chondrocytes express functional chemokine receptors and release matrix-degrading enzymes in response to C-X-C and C-C chemokines. *Arthritis Rheum* 43: 1734–1741.

Boyde A, Jones SJ, Aerssens J, Dequeker J. Mineral density quantitation of the human cortical iliac crest by backscattered electron image analysis:

variations with age, sex, and degree of osteoarthritis. *Bone* 1995; 16:619-27.

Brigstock DR. The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol* 2003; 178(2):169-75.

Burr DB, Gallant MA: Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012, 8:665–673.

Chou CH, Lee CH, Lu LS, Song IW, Chuang HP, Kuo SY, Wu JY, Chen YT, Kraus VB, Wu CC, Lee MT: Direct assessment of articular cartilage and underlying subchondral bone reveals a progressive gene expression change in human osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2013, 21:450–461.

Chou Ching-Heng, Chia-Chun Wu, Song IW, Hui-Ping Chuang, Liang-Suei Lu, Jen-Huei Chang, San-Yuan Kuo, Chian-Her Lee, Jer-Yuarn Wu, Yuan-Tsong Chen, Virginia Byers Kraus and Ming Ta Michael Lee. Genome-wide expression profiles of subchondral bone in osteoarthritis *Arthritis Research & Therapy* 2013, 15:R190

Chung EY, Psathas JN, Yu D, Li Y, Weiss MJ, Thomas-Tikhonenko A. CD19 is a major B cell receptor-independent activator of MYC-driven B-lymphomagenesis. *J Clin Invest*; 2012 122: 2257-2266.

Church V, Nohno T, Linker C, Marcelle C, Francis-West P. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J Cell Sci* 2002; 115: 4809–18.

Clancy BM, Johnson JD, Lambert AJ, Rezvankhah S, Wong A, Resmini C, et al. A gene expression profile for endochondral bone formation: oligonucleotide microarrays establish novel connections between known genes and BMP-2-induced bone formation in mouse quadriceps. *Bone* 2003; 33:46–63.

Cornish J, Naot D: Amylin and adrenomedullin: novel regulators of bone growth. *Curr Pharm Des* 2002, 8:2009-2021.

Couchourel D, Aubry I, Delalandre A, Lavigne M, Martel-Pelletier J, et al. Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 1438–1450.

Davies ME, Horner A, Loveland BE, McKenzie IF. Upregulation of complement regulators MCP (CD46), DAF (CD55) and protectin (CD59) in arthritic joint disease. *Scand J Rheumatol* 1994; 23(6):316-21.

Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Lowik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2000; 141:1667-74.

DiBattista JA, Dore S, Morin N, Aribat T. Prostaglandin E2 up-regulates insulin-like growth factor binding protein-3 expression and synthesis in human articular chondrocytes by a c-AMP-independent pathway: role of calcium and protein kinase A and C. *J Cell Biochem* 1996; 63(3): 320-33.

Dieppe PA, Lohmander LS. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet* 2005; 365:965–73.

Eickelberg O, Centrella M, Reiss M, Kashgarian M, Wells R. Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J Biol Chem* 2002; 277:823-9.

Eiraku M, Hirata Y, Takeshima H, Hirano T, Kengaku M. Delta/notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor, a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. *J Biol Chem* 2002; 277(28): 25400-7.

Eiraku M, Tohgo A, Ono K, Kaneko M, Fujishima K, Hirano T, et al. DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat Neurosci* 2005; 8(7):873-80.

Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Mar 24;434(7032):514-20*

Embree M, M. Ono, T. Kilts, D. Walker, J. Langguth, J. Mao, Y. Bi1, J.L. Barth, and M. Young. Role of Subchondral Bone during Early-stage Experimental TMJ Osteoarthritis. *J Dent Res* 90(11):1331-1338, 2011.

Endres M, Andreas K, Kalwitz G, Freymann U, Neumann K, et al. Chemokine profile of synovial fluid from normal, osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients: CCL25, CXCL10 and XCL1 recruit human

subchondral mesenchymal progenitor cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18: 1458–1466.

Erlebacher A, Derynck R. Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol* 1996; 132:195-210.

Fan Z, Bau B, Yang H, Soeder S, Aigner T. Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* 2005; 52:136–43.

Ford JW, McVicar DW. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr Opin Immunol*. 2009; 21(1):38-46.

French DM, Kaul RJ, D'Souza AL, Crowley CW, Bao M, Frantz GD, et al. WISP-1 is an osteoblastic regulator expressed during skeletal development and fracture repair. *Am J Pathol* 2004; 165(3):855-67.

Fuentes JJ, Genesca L, Kingsbury TJ, Cunningham KW, Perez- Riba M, Estivill X, et al. DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Hum Mol Genet* 2000; 9:1681–90.

Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Tanaka N, Hikita A, Mitomi H, et al. Regional differences in chondrocyte metabolism in osteoarthritis: a detailed analysis by laser capture microdissection. *Arthritis Rheum* 2008; 58:154–63.

Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, et al.: Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 2005, 280:33132-33140.

Ge XP, Gan YH, Zhang CG, Zhou CY, Ma KT, Meng JH, et al. Requirement of the NF-kB pathway for induction of Wnt-5A by interleukin-1b in condylar chondrocytes of the temporomandibular joint: functional crosstalk between the Wnt-5A and NF-kB signaling pathways. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011; 19(1):111-7.

Gebauer M, Saas J, Haag J, Dietz U, Takigawa M, Bartnik E, et al. Repression of anti-proliferative factor Tob1 in OA cartilage. *Arthritis Res Ther* 2005; 7:R274–84.



Gevers G, Dequeker J, Geusens P, Nyssen-Behets C, Dhem A. Physical and histomorphological characteristics of iliac crest bone differ according to the grade of osteoarthritis at the hand. *Bone* 1989; 10: 173-7.

Geyer M M.D., S. Grassel Ph.D., R. H. Straub M.D., G. Schett M.D., R. Dinser M.D., J. Grifka M.D., S. Gay M.D., E. Neumann Ph.D. and U. Muller-Ladner M.D. Differential transcriptome analysis of intraarticular lesional vs intact cartilage reveals new candidate genes in osteoarthritis pathophysiology. *Osteoarthritis and Cartilage* (2009) 17, 328-335.

Glaser DL, Economides AN, Wang L, Liu X, Kimble RD, et al. In vivo somatic cell gene transfer of an engineered Noggin mutein prevents BMP4-induced heterotopic ossification. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A: 2332–2342.

Goldfarb M. Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16:215–20.

Goto K, Yabe K, Suzuki T, Takasuna K, Jindo T, Manabe S. Gene expression profiles in the articular cartilage of juvenile rats receiving the quinolone antibacterial agent ofloxacin. *Toxicology* 2008; 249:204 13.

Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, Qi H, Stock JL, Tkalcevic GT, Simmons HA, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke HZ, et al.: Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *J Biol Chem* 2003, 278:1998-2007.

Gunther T, Poli C, Muller JM, Catala-Lehnen P, Schinke T, Yin N, et al. Fhl2 deficiency results in osteopenia due to decreased activity of osteoblasts. *EMBO J* 2005; 24:3049-56.

Hashimoto K, Noshiro M, Ohno S, Kawamoto T, Satakeda H, Akagawa Y, et al. Characterization of a cartilage-derived 66-kDa protein that binds to collagen. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1355:303–14.

Hausler KD, Horwood NJ, Chuman Y, Fisher JL, Ellis J, Martin TJ, et al.(2004). Secreted frizzled-related protein-1 inhibits RANKL-dependent osteoclast formation. *J Bone Miner Res* 19:1873-1881.

Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, et al. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the

rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1193–1206.

Hayes AJ, Dowthwaite GP, Webster SV, Archer CW. The distribution of Notch receptors and their ligands during articular cartilage development. *J Anat* 2003; 202(6):495-502.

Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res* 1998; 294:309-21.

Hering S, Isken E, Knabbe C, Janott J, Jost C, Pommer A, et al. TGF beta1 and TGFbeta2 mRNA and protein expression in human bone samples. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; 109:217-26.

Honorati MC, Bovara M, Cattini L, Piacentini A, Facchini A. Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002; 10(10):799-807.

Hopwood Blair, Anna Tsykin, David M Findlay and Nicola L Fazzalari. Microarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodelling, WNT and transforming growth factor- $\beta$ /bone morphogenic protein signaling. *Arthritis Research & Therapy* 2007, 9:R100

Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, et al. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res* 1999; 14:1239-49.

Hu B, Coulson L, Moyer B, Price PA. Isolation and molecular cloning of a novel bone phosphoprotein related in sequence to the cystatin family of thiol protease inhibitors. *J Biol Chem* 1995; 270:431-6.

Hu SI, Carozza M, Klein M, Nantermet P, Luk D, Crowl RM. Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 1998; 273:34406-12.

Hurson CJ, Butler JS, Keating DT, Murray DW, Sadler DM, O'Byrne JM, Doran PP: Gene expression analysis in human osteoblasts exposed to dexamethasone identifies altered developmental pathways as putative drivers of osteoporosis. *BMC Musculoskelet Disord* 2007, 8:12.

Iba K, Durkin ME, Johnsen L, Hunziker E, Damgaard-Pedersen K, Zhang H, et al. Mice with a targeted deletion of the tetranectin gene exhibit a spinal deformity. *Mol Cell Biol* 2001; 21:7817–25.

Ikegami D, Akiyama H, Suzuki A, Nakamura T, Nakano T, Yoshikawa H, Tsumaki N: Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca–Akt pathways. *Development* 2011, 138:1507–1519.

Inoue K, Mikuni-Takagaki Y, Oikawa K, Itoh T, Inada M, Noguchi T, Park JS, Onodera T, Krane SM, Noda M, et al.: A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canalicular formation and bone metabolism. *J Biol Chem* 2006, 281:33814-33824.

Iwanaga H, Matsumoto T, Enomoto H, Okano K, Hishikawa Y, Shindo H, et al. Enhanced expression of insulin-like growth factor binding proteins in human osteoarthritic cartilage detected by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13(5):439-48.

Janssens K, Van Hul W. Molecular genetics of too much bone. *Hum Mol Genet* 2002; 11:2385-93.

Jian H, Shen X, Liu I, Semenov M, He X, Wang XF: Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev* 2006, 20:666-674.

Johnson KR, Johnson KY, Becker KP, Bielawski J, Mao C, Obeid LM. Role of human sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in the regulation of intra- and extracellular sphingosine-1-phosphate levels and cell viability. *J Biol Chem*. 2003 Sep 5; 278(36):34541–7.

Kahler RA, Westendorf JJ: Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. *J Biol Chem* 2003, 278:11937-11944.

Kaji H, Naito J, Sowa H, Sugimoto T, Chihara K: Smad3 differently affects osteoblast differentiation depending upon its differentiation stage. *Horm Metab Res* 2006, 38:740-745.

Kapoor R, Sakai LY, Funk S, Roux E, Bornstein P, Sage EH. Type VIII collagen has a restricted distribution in specialized extracellular matrices. *J Cell Biol* 1988; 107:721–30.

Karlsson C, T. Dehne, A. Lindahl, M. Brittberg, A. Pruss, M. Sittinger, J. Ringe. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 18 (2010) 581–592.

Karsdal MA, Martin TJ, Bollerslev J, Christiansen C, Henriksen K: Are nonresorbing osteoclasts sources of bone anabolic activity? *J Bone Miner Res* 2007, 22:487-494.

Kato H, Matsumine A, Wakabayashi T, Hasegawa M, Sudo A, Shintani K, Fukuda A, Kato K, Ide N, Orita S, Hasegawa T, Matsumura C, Furukawa M, Tasaki T, Sonoda H, Uchida A. Large-scale gene expression profiles, differentially represented in osteoarthritic synovium of the knee joint using cDNA microarray technology. *Biomarkers*, 2007 Jul-Aug; 12(4):384-402.

Katz JN. Total joint replacement in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20:145–53.

Kim CJ, Sakamoto K, Tambe Y, Inoue H: Opposite regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and cell invasiveness by periostin between prostate and bladder cancer cells. *Int J Oncol* 2011, 38:1759–1766.

Kim HJ, Zhao H, Kitaura H, Bhattacharyya S, Brewer JA, Muglia LJ, Ross FP, Teitelbaum SL. Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast. *J Clin Invest* 2006, 116:2152-2160.

Klatt AR, Paul-Klausch B, Klinger G, Kuhn G, Renno JH, et al. A critical role for collagen II in cartilage matrix degradation: collagen II induces pro-inflammatory cytokines and MMPs in primary human chondrocytes. *J Orthop Res* 2009; 27: 65–70.

Kluppel M, Wight TN, Chan C, Hinek A, Wrana JL. Maintenance of chondroitin sulfation balance by chondroitin-4-sulfotransferase 1 is required for chondrocyte development and growth factor signaling during cartilage morphogenesis. *Development* 2005; 132:3989–4003.

Koli K, Ryyanen MJ, Keski-Oja J. Latent TGF-beta binding proteins (LTBPs)-1 and -3 coordinate proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* 2008; 43:679–88.

Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, et al. Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem* 2004, 279:40255 40258.

Kukkola L, Hieta R, Kivirikko KI, Myllyharju J. Identification and characterization of a third human, rat, and mouse collagen prolyl 4 hydroxylase isoenzyme. *J Biol Chem* 2003; 278:47685–93.

Labbe E, Letamendia A, Attisano L. Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and Wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:8358-8363.

Lai CF, Bai S, Uthgenannt BA, Halstead LR, McLoughlin P, Schafer BW, et al. Four and half lim protein 2 (FHL2) stimulates osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 2006; 21:17-28.

Lambert Cecile Ph.D., Jean-Emile Dubuc M.D., Eulalia Montell Ph.D., Josep Verges M.D., Ph.D., Carine Munaut Ph.D., Agnes Noel Ph.D. and Yves Henrotin Ph.D. Gene expression pattern of synovial cells from inflammatory and normal areas of osteoarthritis synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism* DOI 10.1002/art.38315

Law AY, Wong CK. Stanniocalcin-1 and -2 promote angiogenic sprouting in HUVECs via VEGF/VEGFR2 and angiopoietin signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol.* 2013; 374(1-2):73-81.

Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, Gabriel S, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Jordan JM, Katz JN, Kremers HM, Wolfe F; National Arthritis Data Workgroup. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 2008; 58:26–35.

Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, Heyse SP, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Liang MH, Pillemer SR, Steen VD, Wolfe F. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 1998; 41:778–99.

Li X, Cao X. BMP signaling and skeletogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068:26–40.

Lin AC, Seeto BL, Bartoszko JM, Khoury MA, Whetstone H, et al. Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nat Med* 2009; 15: 1421–1425.

Lindner V, Wang Q, Conley BA, Friesel RE, Vary CPH. Vascular injury induces expression of periostin: implications for vascular cell differentiation and migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 77–83.

Lisignoli G, Toneguzzi S, Pozzi C, Piacentini A, Grassi F, et al. Chemokine expression by subchondral bone marrow stromal cells isolated from osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) patients. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 371–378.

Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(6):1697-707.

Logan CY, Nusse R: The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004, 20:781-810.

Lotz M, Moats T, Villiger PM. Leukemia inhibitory factor is expressed in cartilage and synovium and can contribute to the pathogenesis of arthritis. *J Clin Invest* 1992; 90:888–96.

Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:35-58.

Ma CH, Lv Q, Cao Y, Wang Q, Zhou XK, Ye BW, Yi CQ. Genes relevant with osteoarthritis by comparison gene expression profiles of synovial membrane of osteoarthritis patients at different stages. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014 Feb; 18(3):431-9.

Macias BR, Aspenberg P, Agholme F: Paradoxical Sost gene expression response to mechanical unloading in metaphyseal bone. *Bone* 2013, 53:515–519.

Maier R, Wisniewski HG, Vilcek J, Lotz M. TSG-6 expression in human articular chondrocytes: possible implications in joint inflammation and cartilage degradation. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 552–9.

Manacu C, Martel-Pelletier J, Roy-Beaudry M, Pelletier JP, Fernandes J, Shipkolye F, et al. Endothelin-1 in osteoarthritic chondrocytes triggers nitric oxide production and upregulates collagenase production. *Arthritis Res Ther* 2005; 7:R324–32.

Mansell JP, Bailey AJ. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1998; 101: 1596–1603.

Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008; 22:351–84.

Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Lajeunesse D, Pelletier JP. IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis. *Inflamm Res* 1998; 47: 90-100.

Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Eklemler Hastalik Cerrahisi*. 2010; 21(1):2-14.

Martin JA, Miller BA, Scherb MB, Lembke LA, Buckwalter JA. Co-localization of insulin-like growth factor binding protein 3 and fibronectin in human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10(7): 556-63.

Martin JL, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein from human plasma. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1986; 261(19):8754-60.

Matsuda S, Rouault J, Magaud J, Berthet C. In search of a function for the TIS21/PC3/BTG1/TOB family [review]. *FEBS Lett* 2001; 497:67–72.

Matyas JR, Sandell LJ, Adams ME. Gene expression of type II collagens in chondro-osteophytes in experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1997; 5:99–105.

Mayne R, Ren ZX, Liu J, Cook T, Carson M, Narayana S. VIT-1: the second member of a new branch of the von Willebrand factor A domain superfamily. *Biochem Soc Trans* 1999; 27:832–5.

Mobasheri A, Marples D. Expression of the AQP-1 water channel in normal human tissues: a semiquantitative study using tissue microarray technology. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286(3):C529- 37.

Morais Cabral JH, Atkins GL, Sanchez LM, Lopez-Boado YS, Lopez-Otin C, Sawyer L. Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function. *FEBS Lett* 1995; 366: 53–6.

Moskowitz RW. The burden of osteoarthritis: clinical and quality of-life issues. *Am J Manag Care* 2009; 15:S223–9.

Mow VC, Hung CT. Mechanical properties of normal and osteoarthritic articular cartilage, and the mechanobiology of chondrocytes. New York: Oxford University Press; 2003.

Muragaki Y, Shiota C, Inoue M, Ooshima A, Olsen BR, Ninomiya Y. Alpha 1(VIII)-collagen gene transcripts encode a short-chain collagen polypeptide and are expressed by various epithelial, endothelial and mesenchymal cells in newborn mouse tissues. *Eur J Biochem* 1992; 207:895–902.

Murphy G, Knauper V, Cowell S, Hembry R, Stanton H, Butler G, et al. Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878:25–39.

Nagahara M, Waguri-Nagaya Y, Yamagami T, Aoyama M, Tada T, Inoue K, et al. TNF-alpha-induced aquaporin 9 in synoviocytes from patients with OA and RA. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49(5):898-906.

Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H: Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 2011; 17:1231–1234.

Nakayama N, Han CY, Cam L, Lee JI, Pretorius J, Fisher S, et al. A novel chordin-like BMP inhibitor, CHL2, expressed preferentially in chondrocytes of developing cartilage and osteoarthritic joint cartilage. *Development* 2004; 131:229–40.

Naoshi Fukui, Yoshinari Miyamoto, Masahiro Nakajima, Yasuko Ikeda, Atsuhiko Hikita, Hiroshi Furukawa, Hiroyuki Mitomi, Nobuho Tanaka, Yozo Katsuragawa, Seizo Yamamoto, Motoji Sawabe, Takuo Juji, Toshihito Mori. Zonal Gene Expression of Chondrocytes in Osteoarthritic Cartilage. *Arthritis Rheum*. 2008 Dec; 58(12):3843-53.

Ng TCS, Chiu KWK, Rabie ABM, Hagg U. Repeated mechanical loading enhances the expression of Indian hedgehog in condylar cartilage. *Front Biosci* 2006; 11: 943–948.

Nico B, Ribatti D. Aquaporins in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Lett*. 2010; 294(2):135-8.

Ohishi M, Matsumura Y, Aki D, Mashima R, Taniguchi K, Kobayashi T, et al. Suppressors of cytokine signaling-1 and -3 regulate osteoclastogenesis in the presence of inflammatory cytokines. *J Immunol* 2005; 174:3024-31.



Oka C, Tsujimoto R, Kajikawa M, Koshiba-Takeuchi K, Ina J, Yano M, et al. HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by TGF beta family proteins. *Development* 2004; 131:1041-53.

Olney RC, Wilson DM, Mohtai M, Fielder PJ, Smith RL. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha increase insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP-3) production and IGFBP-3 protease activity in human articular chondrocytes. *J Endocrinol* 1995; 146(2):279-86.

Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex disease biology. *Cell* 2008; 134:112-123.

Panoutsopoulou K, Zeggini E. Advances in osteoarthritis genetics. *J Med Genet*. 2013 Nov; 50(11):715-24.

Raymaekers G, Aerssens J, Van den Eynde R, Peeters J, Geusens P, Devos P, et al. Alterations of the mineralization profile and osteocalcin concentrations in osteoarthritic cortical iliac crest bone. *Calcif Tissue Int* 1992; 51:269-75.

Reinhold MI, Naski MC: Direct interactions of Runx2 and canonical Wnt signaling induce FGF18. *J Biol Chem* 2007, 282:3653-3663.

Roos EM, Herzog W, Block JA, Bennell KL. Muscle weakness, afferent sensory dysfunction and exercise in knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 7: 57-63.

Sanchez-Madrid F, del Pozo MA. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* 1999; 18: 501-511.

Sanchez-Sabate E, L. Alvarez, E. Gil-Garay, L. Munuera and N. Vilaboa. Identification of differentially expressed genes in trabecular bone from the iliac crest of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis and Cartilage* (2009) 17, 1106-1114.

Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis: an introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001; 3:107-13.

Sano H, Forough R, Maier JA, Case JP, Jackson A, Engleka K, et al. Detection of high levels of heparin binding growth factor-1 (acidic fibroblast growth factor) in inflammatory arthritic joints. *J Cell Biol* 1990; 110:1417-26.

Sato T, Konomi K, Yamasaki S, Aratani S, Tsuchimochi K, Yokouchi M, Masuko-Hongo K, Yagishita N, Nakamura H, Komiya S, Beppu M, Aoki H, Nishioka K and T Nakajima T. Comparative Analysis of Gene Expression Profiles in Intact and Damaged Regions of Human Osteoarthritic Cartilage. *Arthritis Rheum* Vol. 54, No. 3, March 2006, pp 808–817.

Saunders S, Paine-Saunders S, Lander AD. Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain. *Dev Biol* 1997; 190:78–93.

Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*.2012 Aug; 51(2):249-57.

Scanzello CR, McKeon B, Swaim BH, DiCarlo E, Asomugha EU, Kanda V, et al. Synovial inflammation in patients undergoing arthroscopic meniscectomy: molecular characterization and relationship to symptoms. *Arthritis Rheum*. 2011; 63(2):391-400.

Schneider P, Schwenzer R, Haas E, Muhlenbeck F, Schubert G, Scheurich P, et al. TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1. *Eur J Immunol* 1999; 29:1785–92.

Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2010; 6(11):625-35.

Sherbet GV, Lakshmi MS. S100A4 (MTS1) calcium binding protein in cancer growth, invasion and metastasis. *Anticancer Res* 1998; 18:2415–21.

Shukunami C, Hiraki Y. Role of cartilage-derived antiangiogenic factor, chondromodulin-I, during endochondral bone formation. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9(Suppl A):S91-S101.

Sock E, Rettig SD, Enderich J, Bosl MR, Tamm ER, Wegner M. Gene targeting reveals a widespread role for the high-mobility group transcription factor Sox11 in tissue remodeling. *Mol Cell Biol* 2004; 24:6635–44.

Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis:genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 2004, 12:S39-S44.

Strickland JP, Berry DJ. Total joint arthroplasty in patients with osteopetrosis: a report of 5 cases and review of the literature. *J Arthroplasty* 2005; 20:815-20.

Sun HB, Yokota H. Messenger-RNA expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and transcription factors in rheumatic synovial cells under mechanical stimuli. *Bone* 2001; 28:303–9.

Tang GH, Rabie ABM, Hagg U. Indian hedgehog: a mechanotransduction mediator in condylar cartilage. *J. Dent. Res* 2004; 83: 434–438.

Tarkowski A, Trollmo C, Seifert PS, Hansson GK. Expression of decay accelerating factor on synovial lining cells in inflammatory and degenerative arthritides. *Rheumatol Int* 1992; 12(5):201-5.

Teshima Y, Akao M, Jones SP, Marban E. Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res* 2003; 93:192–200.

Tiku ML, Gupta S, Deshmukh DR. Aggrecan degradation in chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants. *Free Radic Res* 1999; 30:395–405.

Tomita M, Reinhold MI, Molkenstin JD, Naski MC. Calcineurin and NFAT4 induce chondrogenesis. *J Biol Chem* 2002; 277: 42214–8.

Tsuchiya A, Yano M, Tocharus J, Kojima H, Fukumoto M, Kawaichi M, et al. Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. *Bone* 2005; 37:323–36.

Tu H, Sasaki T, Snellman A, Gohring W, Pirila P, Timpl R, et al. The type XIII collagen ectodomain is a 150-nm rod and capable of binding to fibronectin, nidogen-2, perlecan, and heparin. *J Biol Chem* 2002; 277:230929.

Urita A, Matsushashi T, Onodera T, Nakagawa H, Hato M, Amano M, Seito N, Minami A, Nishimura S, Iwasaki N. Alterations of high-mannose type N-glycosylation in human and mouse osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 3428-3438.

Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulescu G, Swarbrick P, Doyle DV, et al. Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2497–507.

Van Lent PL, Blom AB, Schelbergen RF, Sloetjes A, Lafeber FP, Lems WF, et al. Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2012; 64(5):1466-76.

Vergunst CE, van de Sande MGH, Lebre MC, Tak PP. The role of chemokines in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 2005; 34:415–425.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 2006; 12:17-25.

Walsh DA, Bonnet CS, Turner EL, Wilson D, Situ M, McWilliams DF. Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007; 15(7):743-51.

Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R, Wasylyk B. The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J* 1991; 10: 1127–34.

Watt SL, Lunstrum GP, McDonough AM, Keene DR, Burgeson RE, Morris NP. Characterization of collagen types XII and XIV from fetal bovine cartilage. *J Biol Chem* 1992; 267: 20093–9.

Wewer UM, Ibaraki K, Schjorring P, Durkin ME, Young MF, Albrechtsen R. A potential role for tetranectin in mineralization during osteogenesis. *J Cell Biol* 1994; 127:1767–75.

Wiley SR, Cassiano L, Lofton T, Davis-Smith T, Winkles JA, Lindner V, et al. A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity* 2001; 15:837–46.

Wisniewski HG, Hua JC, Poppers DM, Naime D, Vilcek J, Cronstein BN. TNF/IL-1-inducible protein TSG-6 potentiates plasmin inhibition by inter-alpha-inhibitor and exerts a strong anti-inflammatory effect in vivo. *J Immunol* 1996; 156:1609–15.

Wu J, Glimcher LH, Aliprantis AO. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> anion exchanger SLC4A2 is required for proper osteoclast differentiation and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:16934-16939.

Wu Q, Zhang Y, Chen Q. Indian hedgehog is an essential component of mechanotransduction complex to stimulate chondrocyte proliferation. *J Biol Chem* 2001; 276: 35290–35296.

Yanagita T, Kubota S, Kawaki H, Kawata K, Kondo S, Takano-Yamamoto T, et al. Expression and physiological role of CCN4/Wnt induced secreted protein 1 mRNA splicing variants in chondrocytes. *FEBS J* 2007; 274(7):1655-65.

Yang R, Barouch LA: Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ Res* 2007, 101:545–559.

Yuan GH, Masuko-Hongo K, Sakata M, Tsuruha J, Onuma H, et al. The role of C-C chemokines and their receptors in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1056–1070.

Zhang H, Liew CC, Marshall KW. Microarray analysis reveals the involvement of beta-2 microglobulin (B2M) in human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10:950-60.

Zhang R, Fang H, Chen Y, Shen J, Lu H, et al. Gene Expression Analyses of Subchondral Bone in Early Experimental Osteoarthritis by Microarray. *PLoS ONE* 2012; 7(2): e32356.

Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας-Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter-2<sup>η</sup> έκδοση, ιατρικές εκδόσεις π.χ. Πασχαλίδης  
Ορθοπαιδική και τραυματολογία του μυοσκελετικού συστήματος,  
Δ.Σ.Κορρές, Γ.Π.Λυρίτης, Π.Ν.Σουκάκος, ιατρικές εκδόσεις Κωνσταντάρας

