



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΚΑΒΕΟΛΙΝΗΣ-1 ΣΤΟΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΚΟ
ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΤΩΝ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ»

ΛΑΓΟΥΜΤΖΗ ΣΟΦΙΑ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ (Επιβλέπουσα) : Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (Μέλος) : Επίκουρος καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (Μέλος): Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ, 2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

**«The role of Caveolin-1 in the osteoarthritic phenotype of
chondrocytes»**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την επιβλέπουσα της πτυχιακής μου, κ. Ασπασία Τσέζου για την πολύτιμη καθοδήγηση και την βοήθειά της. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής : κ. Δήμα Κωνσταντίνο και κ. Τραχανά Βαρβάρα για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή και την επίβλεψή τους στην εργασία. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και ιδιαίτερα την κ. Παπαθανασίου Ιωάννα, την κ. Μουρμούρα Ευανθία και την υποψήφια διδάκτωρ Αλίκη-Αλεξάνδρα Παπαγεωργίου για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου. Τέλος θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τους φίλους μου για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα, αποτελεί την πιο κοινή, εκφυλιστική, ηλικιο-συσχετιζόμενη νόσο του μυοσκελετικού συστήματος και παράλληλα, μια από τις βασικότερες αιτίες αναπηρίας του ενήλικου πληθυσμού. Χαρακτηρίζεται ως εκφυλιστική, διότι κατά την εξέλιξη της νόσου, ο αρθρικός χόνδρος εκφυλίζεται σταδιακά. Η οστεοαρθρίτιδα, χαρακτηρίζεται από έντονο και χρόνιο πόνο και σταδιακά επιβαρύνει όλο και περισσότερο την κινητικότητα της άρθρωσης. Οι παράγοντες κινδύνου για την νόσο, όπως η ηλικία, το φύλο, η γενετική προδιάθεση και πολλοί άλλοι, είναι αρκετά μεγάλοι σε αριθμό αλλά παρόλα αυτά η παθογένεση της ασθένειας δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστή. Σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και στην εξέλιξη της νόσου παίζουν οι αλλαγές που υφίστανται τα χονδροκύτταρα, ως ο μόνος τύπος κυττάρων του ενήλικου αρθρικού χόνδρου. Ένα μεγάλο πρόβλημα που αφορά στην οστεοαρθρίτιδα, είναι η μη ύπαρξη αποτελεσματικής θεραπείας. Οι παρούσες θεραπευτικές μέθοδοι, με εξαίρεση την χειρουργική επέμβαση που στοχεύει στην άμεση αντιμετώπιση της νόσου, στοχεύουν στην απάλυνση του πόνου και συνήθως είναι αναποτελεσματικές και βραχυπρόθεσμες.

Πρόσφατα δείχθηκε, ότι μια πρωτεΐνη των μικροσπηλαίων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, η καβεολίνη παρουσιάζεται αυξημένη σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Αυτή η παρατήρηση, μας οδήγησε στην περαιτέρω διερεύνηση των επιπέδων της μεταγραφικής έκφρασης της καβεολίνης-1 σε φυσιολογικά αλλά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση στα επίπεδα της μεταγραφικής έκφρασης της καβεολίνης-1 στα οστεοαρθρικά σε σχέση με τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Έπειτα, με τη χρήση της μεθόδου του siRNA έγινε αποσιώπηση της έκφρασης της καβεολίνης 1 και παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της αγκρεκάνης που αποτελεί μείζον συστατικό του χόνδρου, μείωση των επιπέδων της μεταλλοπρωτεϊνάσης-13 η οποία συνεισφέρει στην αποικοδόμηση της αγκρεκάνης και αύξηση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα RUNX-2 που παίζει σημαντικό ρόλο στην υπερτροφία των χονδροκυττάρων. Με βάση αυτά τα δεδομένα, δημιουργούνται επιπλέον ενδείξεις για την συμμετοχή της

καβεολίνης-1 στην παθογένεια αλλά και στην εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας.

ABSTRACT

Osteoarthritis is the most common, degenerative, age-related disease of the musculoskeletal system and, at the same time, one of the main causes of disability of adult population. It is characterized as a degenerative disease, because in the course of the disease the articular cartilage degenerates gradually. Osteoarthritis is characterized by intense and chronic pain and gradually leads to the mobility of the joint. Risk factors for the disease are increased age, female gender, genetic predisposition, and many others, however the pathogenesis of the disease is not completely known, yet. Chondrocytes are the only cell type in adult articular cartilage, and the changes which they undergo, play an important role in the onset and progression of the disease. A major problem with osteoarthritis is the lack of an effective treatment. The present treatments, with the exception of surgery, aim at alleviating pain and are usually short-term.

Recently, it has been shown that a cytoplasmic membrane caveolae protein, caveolin-1 (cav-1) is increased in osteoarthritic chondrocytes compared to normal. This observation, led us to further investigate the levels of the transcriptional expression of caveolin-1 in both, normal and osteoarthritic chondrocytes. Our results showed a significant increase in the levels of transcriptional expression of caveolin-1 in osteoarthritic compared to normal chondrocytes. Silencing the expression of caveolin-1 using siRNA led to significant increase in the levels of aggrecan, a major component of cartilage, a decrease in metalloproteinase-13 levels, which contributes to the degradation of aggrecan and an increase in the transcriptional levels of RUNX-2, a transcription factor that plays an important role in chondrocyte's hypertrophy. Based on the above, additional evidence is emerging for the involvement of caveolin-1 in the pathogenesis and development of osteoarthritis.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	
ABSTRACT	
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
A. 1 ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ	2
A.1.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	3
A.2 ΑΡΘΡΙΚΟΣ ΧΟΝΔΡΟΣ	4
A.3 ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΑ.....	5
A.3.1 ΤΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ	9
A.3.2 ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ.....	11
A.4 ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΗ.....	15
A.5 ΓΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ	16
A. 6 ΚΑΒΕΟΛΙΝΕΣ.....	18
A. 6.1 ΚΑΒΕΟΛΙΝΗ-1.....	20
A.6.2 ΚΑΒΕΟΛΙΝΗ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ.....	21
A. 7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	25
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	26
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
B.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	27
B.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	28
B.4 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA (ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA)	30
B.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ CAV-1, RUNX-2, MMP-13, AGGRECAN ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL-TIME PCR)	32
B.6 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΩΝ ΠΑΡΕΜΒΑΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA (siRNA)	35
B.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	37
Γ.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΒΕΟΛΙΝΗΣ-1 ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΚΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ	38
Γ.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΒΕΟΛΙΝΗΣ-1 ΣΕ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΚΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ siRNA... 38	
Γ.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ RUNX-2, MMP-13 ΚΑΙ ΑΓΚΡΕΚΑΝΗΣ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΚΑΒΕΟΛΙΝΗΣ-1 ΣΕ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΚΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ siRNA.....	39
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. 1 ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί μια εκφυλιστική πάθηση των αρθρώσεων και συνιστά αιτία νοσηρότητας και ανικανότητας μεταξύ των μυοσκελετικών παθήσεων στον γενικό πληθυσμό ανά τον κόσμο (Brooks PM, 2006, Poulet and Staines, 2016). Η οστεοαρθρίτιδα μπορεί να είναι συμπτωματική, όπου ο ασθενής εμφανίζει τα συμπτώματα της νόσου χωρίς να υπάρχουν ακτινογραφικά ευρήματα, ή ακτινογραφική, όπου τα συμπτώματα της νόσου, συνοδεύονται από ακτινογραφικά ευρήματα στους ιστούς που προσβάλλονται. Οι επιπτώσεις της οστεοαρθρίτιδας αυξάνονται καθώς αυξάνει η ηλικία και περίπου το 80% του πληθυσμού παρουσιάζει ακτινογραφικά στοιχεία μετά την ηλικία των 65 ετών (Glyn- Jones et.al, 2015, Karsdal et.al, 2016). Η κλινική εικόνα της οστεοαρθρίτιδας περιλαμβάνει την εκδήλωση πόνου, την ακαμψία και τις κινητικές δυσλειτουργίες, οι οποίες οδηγούν προοδευτικά σε ανικανότητα και αλλαγή της ποιότητας ζωής του ασθενούς. Η θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου, μέχρι σήμερα, περιλαμβάνει αφενός τη χρήση μη στεροειδικών αντιφλεγμονοδών φαρμάκων για την απάλυνση του πόνου και αφετέρου τη χειρουργική αντικατάσταση της άρθρωσης, όπου αυτό κρίνεται απαραίτητο (Bellamy N. et.al, 2016). Προς το παρόν, η ακριβής αιτιολογία της οστεοαρθρίτιδας παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστη, ενώ φαίνεται ότι η μεγάλη ετερογένεια που την χαρακτηρίζει, είναι απόρροια ενός συνδυασμού παραγόντων κινδύνου και μηχανισμών έναρξης (Portal- Nunez et.al, 2016). Η νόσος μπορεί να προσβάλει όλες τις αρθρώσεις οδηγώντας τις σε εκφυλισμό και σε απώλεια του αρθρικού χόνδρου, αλλά συνήθως πλήττει τις αρθρώσεις του ισχίου, του χεριού και του γονάτου. Σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, η οστεοαρθρίτιδα χαρακτηρίζεται από την αλλοίωση της υγιούς ομοιοστατικής κατάστασης σε καταβολική κατάσταση με συνέπεια την καταστροφή του χόνδρου.

Σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα, πρόκειται για μία νόσο που πλήττει κυρίως άτομα ηλικίας προχωρημένης ηλικίας και πιο συγκεκριμένα σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών η συχνότητα εμφάνισης της νόσου ανέρχεται στο 50%, ενώ σε άτομα ηλικίας 45-65 ετών στο 30% (WHO, 2003). Ένα αρκετά υψηλό ποσοστό των ασθενών άνω των 75 ετών, οι οποίοι παρουσιάζουν ακτινολογικά ευρήματα οστεοαρθρίτιδας σε μια ή και περισσότερες αρθρώσεις του σώματος (Dierpe PA

and Lohmander LS, 2005). Σύμφωνα με έρευνα του Ελληνικού Ιδρύματος Ρευματολογικών Παθήσεων, ο συνολικός επιπολασμός της νόσου στον ελληνικό πληθυσμό φτάνει στο 13,1% των ενηλίκων, ενώ συχνότερη μορφή είναι η οστεοαρθρίτιδα γόνατος. Ο αριθμός των νοσούντων αναμένεται να ακολουθήσει συνεχόμενη αύξηση, καθώς η νόσος είναι ηλικιοεξαρτώμενη και παράλληλα το προσδόκιμο ζωής αυξάνεται συνεχώς, ενώ δεν υπάρχει προς το παρόν διαθέσιμη θεραπεία.

A.1.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

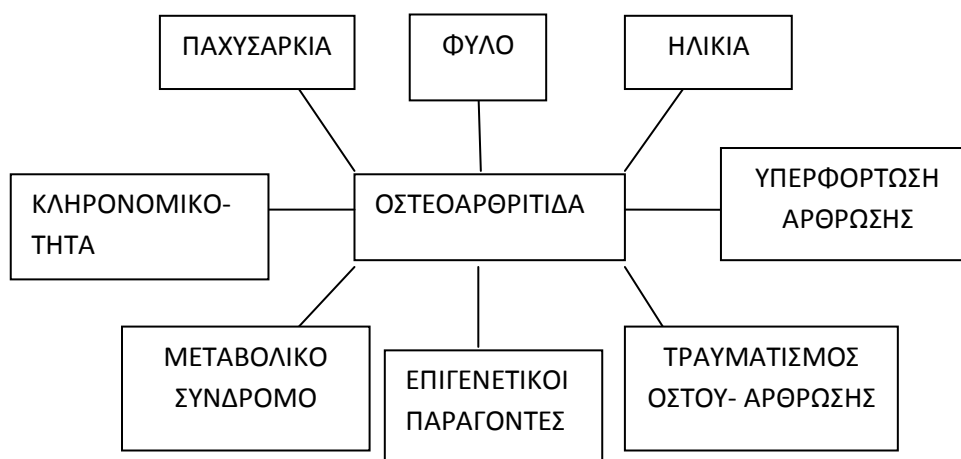
Η οστεοαρθρίτιδα ταξινομείται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Η πρωτοπαθής οστεοαρθρίτιδα, σχετίζεται με παράγοντες κινδύνου (όπως η ηλικία, το φύλο, η εθνικότητα, η γενετική προδιάθεση) ενώ η δευτεροπαθής, ή μετατραυματική αρθρίτιδα, αναπτύσσεται έπειτα από κάποια συγγενή ή επίκτητη προσβολή των αρθρώσεων (όπως τραυματισμός) (Charles J. et.al, 2016). Όσον αφορά το φύλο, σαν παράγοντα κινδύνου, μελέτες έχουν δείξει ότι μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου διατρέχουν οι γυναίκες συγκριτικά με τους άνδρες. Τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί και η συμβολή του μεταβολικού συνδρόμου στην προδιάθεση της οστεοαρθρίτιδας (Courties A. et.al, 2015, Hawker GA. and Stanaitis I., 2014).

Σύμφωνα με τη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία έχει προταθεί ένα πιθανό μοντέλο για την παθογένεια και την προδιάθεση ανάπτυξης της ΟΑ που περιλαμβάνει τρία βασικά σημεία (Suri P et.al, 2012) (Grazio S and Balen D, 2009) (Goldring MB and Goldring SR, 2007) (Εικόνα 1):

1. Εμβιομηχανικοί αλλά και συστηματικοί παράγοντες ενοχοποιούνται ως παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας.
2. Οι αλληλεπιδράσεις εμβιομηχανικών και συστηματικών παραγόντων στο μικροπεριβάλλον της άρθρωσης καθορίζουν τον τρόπο εξέλιξης της νόσου ανάλογα με την άρθρωση που έχει προσβληθεί.
3. Ένα εμβιομηχανικό σύστημα, το οποίο αποτελείται από όλες τις δομές της εκάστοτε άρθρωσης και τις λειτουργίες τους χαρακτηρίζεται ως υπεύθυνο

για την σωστή κίνηση μιας άρθρωσης αλλά και για την αποφυγή της υπερφόρτωσής της,.

Η γήρανση αποτελεί επίσης εξαιρετικά σημαντικό παράγοντα κινδύνου μειώνοντας την ικανότητα του αρθρικού χόνδρου να διατηρήσει ή να επαναφέρει τη λειτουργία του ιστού έπειτα από τραυματισμό (Martin J A and Buckwalter J A, 2001). Η κυτταρική γήρανση και η απώλεια της ικανότητας των κυττάρων να διαιρεθούν, έχουν σημειωθεί ως οι, μείζονος σημασίας, παράγοντες που συνεισφέρουν στις, συσχετιζόμενες με την ηλικία, αλλαγές στην ομοίωση και στην λειτουργία του χόνδρου των αρθρώσεων (Li J. and Pei M., 2012).



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση παραγόντων κινδύνου για οστεοαρθρίτιδα.

A.2 ΑΡΘΡΙΚΟΣ ΧΟΝΔΡΟΣ

Ο αρθρικός χόνδρος αποτελείται από δύο κύρια συστατικά. Το πρώτο, είναι η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία που είναι πλούσια σε κολλαγόνο κυρίως τύπου II, IX και XI, αλλά και σε πρωτεογλυκάνες, με κυριότερη την αγκρεκάνη (Hinegård D et.al, 2001). Επιπλέον, στον αρθρικό χόνδρο υπάρχουν τα χονδοκύτταρα, τα οποία βρίσκονται μέσα στη θεμέλια ουσία και αποτελούν το μόνο κυτταρικό τύπο του

χόνδρου. Τα συστατικά της θεμέλιας ουσίας είναι υπεύθυνα για την ισχύ και την αντίσταση στην μηχανική φόρτιση του αρθρικού χόνδρου. Φυσιολογικά, ο αρθρικός χόνδρος έχει πάχος λίγα χιλιοστά και χωρίζεται σε τέσσερις βασικές στοιβάδες: την επιφανειακή, την ενδιάμεση, την εν τω βάθει και τέλος την ασβεστοποιημένη στοιβάδα, κάθε μια από τις οποίες επιτελεί και διαφορετικές λειτουργίες. Ο ενήλικος χόνδρος, έχει μειωμένη αγγείωση και έτσι τα ενήλικα χονδροκύτταρα προσλαμβάνουν τις απαραίτητες, για αυτά, θρεπτικές ουσίες, αλλά και το αναγκαίο οξυγόνο από το αρθρικό υγρό με την μέθοδο της απλής διάχυσης.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, τα χονδροκύτταρα αποτελούν τον μόνο τύπο κυττάρων που συναντώνται στον ενήλικο αρθρικό χόνδρο. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας, δεδομένου ότι παράγουν καταβολικά μόρια που οδηγούν στην αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας και παράλληλα δεν της επιτρέπουν να ακολουθήσει τις απαιτούμενες διεργασίες για να ανασυγκροτηθεί. Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα χονδροκύτταρα συνθέτουν μόρια κολλαγόνου και αγκρεκάνης με σκοπό να αποκατασταθεί η δομή του χόνδρου. Σε προχωρημένα στάδια όμως, η παραγωγή καταβολικών μορίων είναι τόσο μεγάλη, που παράλληλα με την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας, ο χόνδρος, τελικά, εκφυλίζεται (Poole AR GF and Abramson SB, 2007) (εικόνα 2). Βασικά παθολογικά γνωρίσματα της νόσου, είναι η απόπτωση των χονδροκυττάρων, η τελική διαφοροποίηση των υπερτροφικών χονδροκυττάρων από την πλάκα ανάπτυξης, καθώς και παθολογικές καταστάσεις που περιλαμβάνουν την αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου (Heraud F et.al, 2000), (Blanco F.J et.al, 1998). Υπάρχουν δεδομένα, τα οποία δείχνουν την ύπαρξη κενών αλλά και μειωμένης πυκνότητας των κυττάρων εντός του οστεοαρθρικού χόνδρου, γεγονός που υποδηλώνει πως ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να συμβεί είτε κατά τη διάρκεια μιας διαδικασίας της οστεοαρθρίτιδας είτε και να συμμετέχει, πιθανώς, στην έναρξη της ασθένειας (Sharif M et.al, 2004).

A.3 ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΑ

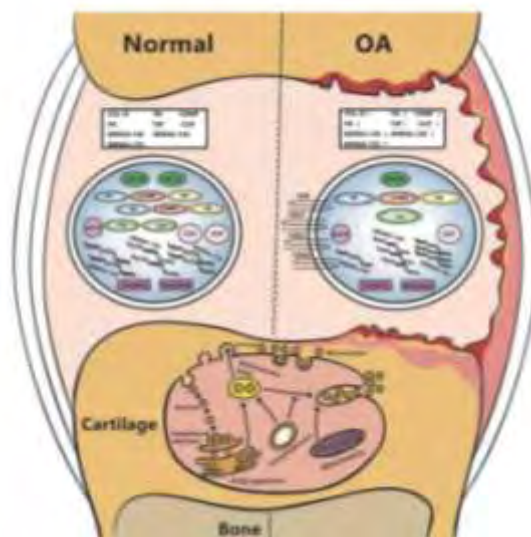
Η παθολογία της οστεοαρθρίτιδας, χαρακτηρίζεται από διαταραχές στην ισορροπία των αναβολικών και καταβολικών διεργασιών, που φυσιολογικά διατηρούνται σε ισορροπία, με τη συμβολή των χονδροκυττάρων. Συγκεκριμένα, κατά την αναβολική φάση, τα χονδροκύτταρα παράγουν κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες, τα οποία σχηματίζουν το εξωκυττάριο υλικό, διατηρώντας τον φυσιολογικό φαινότυπο του ιστού. Αντιθέτως, κατά τις καταβολικές διεργασίες, τα χονδροκύτταρα παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα που αποικοδομούν το εξωκυττάριο στρώμα, ενώ παράλληλα αναστέλλεται η σύνθεσή του. Η οστεοαρθρίτιδα προσβάλλει συνηθέστερα εγγύς αρθρώσεις και άπω μεσοφαλαγγικές αρθρώσεις του άνω άκρου, τα ισχία, τα γόνατα, καθώς και την οσφυϊκή αλλά και την αυχενική μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Ακτινολογικά, η οστεοαρθρίτιδα χαρακτηρίζεται από:

- Στένωση του μεσάρθριου διαστήματος (απώλεια αρθρικού χόνδρου). Αυτό αποδίδεται, κατά κύριο λόγο, στην απώλεια του αρθρικού χόνδρου και αποτελεί ένα από τα βασικά κριτήρια για να ορισθεί η σοβαρότητα της ασθένειας.
- Υποχόνδριες οστικές κύστεις
- Αυξημένη πάχυνση του υποχόνδριου οστού. Το φαινόμενο αυτό συνοδεύεται από αδυναμία του οστού και μειωμένη παροχή σε μέταλλα συγκριτικά με το φυσιολογικό. Με αυτόν τον τρόπο, το υποχόνδριο οστό καθίσταται λιγότερο ικανό στο να απορροφήσει την ενέργεια που δέχεται (Buckland – Wright C., 2004). Αποτέλεσμα, είναι η αύξηση του αριθμού των όσεων, οι οποίες μεταβιβάζονται μέσω των αρθρώσεων και τελικά οδηγούν στην παραμόρφωση της αρθρικής επιφάνειας (Radin and Rose, 1986).
- Ευρεία περιφερική ανάπτυξη οστού και χόνδρου (παρουσιάζονται οστεόφυτα τα οποία είναι αντιπροσωπευτικά της προσπάθειας του οστού να αναπτύξει νέα αρθρική επιφάνεια). Τα οστεόφυτα ορίζονται ως οστικές αποφύσεις οι οποίες συναντώνται στον ινώδη χόνδρο. Το χονδρο-οστεόφυτο αποτελεί την συνηθέστερη παθολογική δομή των οστεοφύτων και συναντάται στο περίοστεο, που βρίσκεται πάνω από το οστό (Menkes CJ

and Lane NE, 2004). Τα οστεόφυτα θωρούνται μια από τις κύριες πηγές πόνου στην οστεοαρθρίτιδα.

Η ΟΑ επιφέρει αλλαγές σε διάφορους ιστούς προσβάλλοντας τον αρθρικό χόνδρο, η βασική λειτουργία του οποίου, είναι να προσαρμόζεται σε βιομηχανικές δυνάμεις κατά την κίνηση της άρθρωσης, λειτουργία που υποβοηθείται από την εξωκυττάρια ουσία (εικόνα 1). Η ομοιοστάση του αρθρικού χόνδρου ορίζεται από το φυσιολογικό εξωκυττάριο υγρό του αρθρικού χόνδρου αντισταθμίζοντας το μηχανικό stress χωρίς να υπάρξουν δομικές ή κυτταρικές βλάβες. Το εξωκυττάριο υγρό, παράγεται και διατηρείται από τα αρθρικά χονδροκύτταρα που είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του αρθρικού χόνδρου (Coldring MB and Otero M., 2011).

Η οστεοαρθρίτιδα ξεκινά με πρώιμες αλλοιώσεις όπως με την απώλεια των πρωτεογλυκανών από την επιφάνεια του αρθρικού χόνδρου και τον θάνατο των χονδροκυττάρων. Αυτό χαρακτηρίζεται ως το πρώιμο στάδιο της οστεοαρθρίτιδας και η νόσος μπορεί να παραμείνει σε αυτό για αρκετά χρόνια προτού μεταβεί στο επόμενο, ενώ βασικό εύρημα αυτού του σταδίου, είναι οι αλλαγές που πραγματοποιούνται στον αρθρικό χόνδρο και κυρίως ο εκφυλισμός αυτού.



Εικόνα 1: Απεικονίζεται η δομή του φυσιολογικού και του οστεοαρθρικού χόνδρου (Tianyang G et.al, 2016).

Σημαντικό ρόλο στην παθολογία της νόσου, διαδραματίζει και η επίδραση του μηχανικού φορτίου. Στη συστολή της άρθρωσης, το ενδιάμεσο υγρό, διαχέεται μεταξύ των στοιχείων του συνδετικού ιστού (κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες), ενώ με την άρση του φορτίου, το υγρό απομακρύνεται με αποτέλεσμα να δημιουργούνται σημαντικές αλλαγές στην υδροστατική πίεση. Αυτές οι αλλαγές, επηρεάζουν τη μεταβολική δραστηριότητα των χονδροκυττάρων και επιβαρύνουν την άρθρωση. Επιπροσθέτως, στην παθολογία της οστεοαρθρίτιδας, σημαντικός είναι ο ρόλος και του μεταβολικού συνδρόμου υποδεικνύοντας ότι η παχυσαρκία, η δυσλιπιδαιμία και τα επίπεδα χοληστερόλης σχετίζονται με τον παθογενετικό μηχανισμό της πάθησης (Zhang W et.al, 2009).

Επίσης, σημαντική είναι και η συμβολή διαφόρων παραγόντων σε διεργασίες που ενέχονται στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας. Ειδικότερα, ο λιπώδης ιστός μπορεί να δρα ως ενδοκρινές όργανο, απελευθερώνοντας βιοδραστικά μόρια, όπως προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες (π.χ. TNF α) και αντιποκίνες (π.χ. λεπτίνη) (Zeddou M et.al, 2012). Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί συσχέτιση με την παθογένεια της νόσου και το α -αμυλοειδές πεπτίδιο ορού οξείας φάσης (De Seny D et.al, 2013). Και στις δύο περιπτώσεις, τα επίπεδα τους είναι αυτά που μπορούν να συσχετισθούν σημαντικά και θετικά με την αποικοδόμηση του χόνδρου σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα (Golding MB and Goloding SR, 2007). Σε ανατομικό επίπεδο η νόσος, χαρακτηρίζεται από προοδευτική διάσπαση του αρθρικού χόνδρου που περιλαμβάνει την αναδιαμόρφωση όλων των ιστών των αρθρώσεων με την εμφάνιση οστεοφύτων, φλεγμονής, παχυσαρκίας, υποσπονδυλικού ιστού και με την στένωση λεπτών αρθρώσεων (Glyn- Jones et.al, 2015). Η αποδόμηση του χόνδρου, η οποία ξεκινάει από την επιφάνειά του, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νόσου.

Αναλυτικότερα, αρχικώς σχηματίζονται ινίδια ενώ συνυπάρχει και ταυτόχρονη ανάπτυξη ρωγμών οι οποίες είναι παράλληλες με το μακρύ άξονα της αρθρικής επιφάνειας. Τα ινίδια, των οποίων ο σχηματισμός στην πορεία επιτείνεται και έτσι το αρθρικό υγρό ξεκινά να εισρέει μέσα στα ελλείμματα που έχουν δημιουργηθεί, αποκτούν συνεχώς αυξανόμενη προσπέλαση κατά το μήκος της ρωγμής και μέσα στον αρθρικό χόνδρο.

Με την εξέλιξη της νόσου, η ρωγμή γίνεται σαφώς βαθύτερη, ενώ παράλληλα η νεοαγγειοποίηση (από το υποχόνδριο οστό αλλά και την επίφυση) εκτείνεται ως την περιοχή της ρωγμής. Κατ' αυτόν τον τρόπο, προκαλείται υποχονδριακή οστεοκλαστική απορρόφηση του οστού. Παράλληλα, υπάρχει οστεοβλαστική δραστηριότητα και στις παρακείμενες θέσεις με τελικό αποτέλεσμα η υποχονδριακή οστική πλάκα να οδηγείται σε πάχυνση στα σημεία όπου έχουν εμφανιστεί οι ρωγμές. Για την υποτυπώδη υποκατάσταση του κατεστραμμένου υαλώδους χόνδρου, σχηματίζονται μερικά ινοχόνδρινα έμβολα όμως το υποχόνδριο οστό, τρίβεται πάνω στην αντίθετη αρθρική επιφάνεια, που υφίσταται και εκείνη την ίδια ακριβώς διαδικασία. Αυτές οι περιοχές του υποχόνδριου οστού (παχιές, λείες και γυαλιστερές) ονομάζονται οστεοσκληρυντικά.

Ιδιαίτερα σημαντική, είναι η δημιουργία οστεοφύτων τα οποία αναπτύσσονται κατά κύριο λόγο στις πλευρικές περιοχές της εκάστοτε άρθρωσης, καθώς ο μεσεγχυματικός ιστός του αρθρικού θυλάκου υφίσταται τροποποίηση σε οστεοβλάστες και χονδροβλάστες με τελικό αποτέλεσμα, τον σχηματισμό μιας μάζας που αποτελείται από οστό και χόνδρο.

A.3.1 ΤΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Ένας μεγάλος αριθμός διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένης της υπερτροφίας των χονδροκυττάρων, των φλεγμονωδών διεργασιών και του θανάτου των χονδροκυττάρων, εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου (Komoti T, 2010, Liu-Bryan R et.al,2015) . Η απόπτωση, ο αυτοφαγικός θάνατος και η νέκρωση έχουν ανιχνευθεί στον χόνδρο ασθενών με οστεοαρθρίτιδα (Kuhn K et.al, 2004). Ο κυτταρικός θάνατος, ολοκληρώνεται με την απομάκρυνση των κυττάρων με τους, σαρωτές, σε περιπτώσεις που τα κύτταρα πεθάνουν μέσω απόπτωσης ή αυτοφαγίας. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η ακεραιότητα των κυτταροπλασματικών μεμβρανών διατηρείται όταν εμφανίζεται φαγοκυττάρωση. Αν και τα χονδροκύτταρα απομονώνονται από μια εξωκυττάρια ουσία, παρόμοια με αυτή των οστεοκυττάρων, η τελική φάση της απόπτωσης ή του αυτοφαγικού θανάτου, δεν

απορροφάται από τα φαγοκύτταρα, αλλά ακολουθεί μετάβαση των κυττάρων σε νέκρωση και έπειτα αυτά εξαλείφονται από τη διάσπαση των κυττάρων (δευτερογενής νέκρωση) (Komori T, 2013). Επομένως, δύο σημαντικές διαδικασίες που έχει αναφερθεί πως λαμβάνουν χώρα στον αρθρικό χόνδρο, είναι αυτή της μεικτής μορφολογίας της απόπτωσης του αυτοφαγικού κυτταρικού θανάτου αλλά και εκείνη της νέκρωσης (Roach H.I. et.al, 2004). Παρόμοια με τα οστεοκύτταρα, η αυτοφαγία προστατεύει επίσης τα χονδροκύτταρα από την απόπτωση ενώ η απουσία της οδηγεί σε αυτήν (Komori T, 2016, Bohenski J et.al, 2007). Μελέτες έχουν αναφέρει ότι ο κυτταρικός θάνατος των χονδροκυττάρων σχετίζεται θετικά τόσο με την απόπτωση όσο και με τη σοβαρότητα της νόσου (Mistry D. et.al, 2004), ενώ σημαντική είναι και η μείωση του αριθμού των χονδροκυττάρων που παρατηρείται στον αρθρικό χόνδρο με τη γήρανση (Hashimoto S. et.al, 1998). Πειράματα που διεξήχθησαν σε μοντέλα κουνελιών με οστεοαρθρίτιδα, υπέδειξαν ότι η ενδοαρθρική χορήγηση αναστολέων κασπάσης, αναστέλλει το θάνατο των χονδροκυττάρων, αλλά και την αποδόμηση των χόνδρων, αναδεικνύοντας τους αναστολείς, ως πιθανούς θεραπευτικούς στόχους (Todd Allen R. et.al, 2004).

Ως ο μόνος κυτταρικός τύπος στον ενήλικο αρθρικό χόνδρο, τα χονδροκύτταρα είναι τερματικά διαφοροποιημένα κύτταρα με περιορισμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού (M. B. Goldring, 2006). Η σταθερότητα του αρθρικού χόνδρου εξαρτάται από τις βιοσυνθετικές δραστηριότητες των χονδροκυττάρων, οι οποίες αναστέλλουν την κανονική αποικοδόμηση των μορίων της μήτρας.

Το εμβιομηχανικό και το οξειδωτικό stress επάγουν σηματοδοτικά μονοπάτια στον αρθρικό χόνδρο, τα οποία συμβάλλουν στη διαφοροποίηση του κυτταρικού φαινοτύπου, χαρακτηριζόμενη από την απελευθέρωση των χονδροκυττάρων, καθώς και αναστολή της ανάπτυξης, ανισορροπία στην ομοιόσταση και αλλαγές στην έκφραση προφλεγμονωδών και καταβολικών γονιδίων (Goldring MB and Otero M., 2011). Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα να χάνουν την πλήρη λειτουργικότητά τους. Συγκεκριμένα δεν είναι ικανά να διατηρήσουν την ομοιόσταση του ιστού, ενώ επίσης αποτυγχάνουν να αντικαταστήσουν την εξωκυττάρια ουσία, και κυρίως το κολλαγόνο που την αποτελεί, αν αυτό αποδομηθεί από κάποια μεταλλοπρωτεϊνάση και ειδικότερα, την μεταλλοπρωτεϊνάση-13, που έχει τον κύριο ρόλο της

αναδιαμόρφωσης του κολλαγόνου τύπου II στον αρθρικό ιστό (Knauper V et.al, 1996, Reboul P et.al, 2011).

Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα γήρανσης και φλεγμονής, έχουν δείξει ότι επιγενετικοί παράγοντες ενέχονται στη λειτουργία και μορφολογία των χονδροκυττάρων στην ΟΑ (Loughlin J and Reynard LN, 2015), έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ και την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνάσων (Marku KB et.al, 2010). Χαρακτηριστικό των χονδροκυττάρων στην οστεοαρθρίτιδα, είναι ότι το οξειδωτικό stress, το οποίο έχει ενοχοποιηθεί για τη μείωση του μήκους των τελομερών των χονδροκυττάρων, αλλά και παράλληλα για τον ελαττωμένο αριθμό των μιτοχονδρίων, οδηγεί σε πρόωρη κυτταρική γήρανση (Brandl A et.al, 2011), (Yudoh K et.al,2005).

A.3.2 ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ

Σε ασθένειες όπως η οστεοαρθρίτιδα, η αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας γίνεται με μεγαλύτερο ρυθμό από τη σύνθεσή της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, αρχικά, τη μείωση της εξωκυττάριας ουσίας και τελικά, οδηγεί μέχρι και στην πλήρη διάβρωση του χόνδρου ο οποίος επικαλύπτει την επιφάνεια της άρθρωσης. Έχει διατυπωθεί, η άποψη ότι η κύρια αιτία της διεργασίας αυτής είναι η αύξηση της δράσης των πρωτεολυτικών ενζύμων.

Όπως προαναφέρθηκε, ο φυσιολογικός αρθρικός χόνδρος είναι υαλώδης και χαρακτηρίζεται από ινώδη αρχιτεκτονική (Sledge, 1975). Η αγκρεκάνη και το κολλαγόνο τύπου II είναι οι βασικότερες πρωτεΐνες που συναντώνται στην εξωκυττάρια μεμβράνη και παράγονται από τον μοναδικό κυτταρικό τύπο εντός του χόνδρου, τα χονδροκύτταρα (Hunziker et.al, 2002). Η απώλεια της αγκρεκάνης θεωρείται ένα κρίσιμο πρώιμο στάδιο της αρθρίτιδας, που ξεκινά αρχικώς από την επιφάνεια της άρθρωσης και έπειτα προχωρά στις βαθύτερες ζώνες (Curtin WA and Reville WJ, 1995), ακολουθούμενη από υποβάθμιση των ινιδίων κολλαγόνου, αλλά και από μηχανική βλάβη του ιστού (Fosang AJ et.al,1996). Η απώλεια, αυτή, προκύπτει από μειωμένη ικανότητα σύνθεσης κολλαγόνου από τα χονδροκύτταρα

αλλά και από την ενεργοποίηση ενζύμων που αποικοδομούν την θεμέλια ουσία του χόνδρου. Τα ινίδια κολλαγόνου, που κατά κύριο λόγο συνίστανται από κολλαγόνο τύπου II, συνδέονται με έναν αριθμό πρωτεϊνών δέσμησης κολλαγόνου (Eyre et.al, 1991) , (Vaughan- Thomas et.al, 2001). Η αγκρεκάνη , το άλλο μείζον συστατικό του χόνδρου, είναι μια μεγάλη συσσωματωμένη πρωτεογλυκάνη, η οποία έχει σημαντικό ρόλο στην παροχή ενός μεγάλου αριθμού αρνητικά φορτισμένων ομάδων, που προσελκύουν τα αντίθετα ιόντα, δημιουργώντας έτσι, μια ωσμωτική πίεση στον χόνδρο (Doerge et.al, 1991). Η αγκρεκάνη, πιο συγκεκριμένα, είναι μια πρωτεΐνη μεγέθους 250kDa που φέρει πολυάριθμες αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκάνης από θεική κερατάνη και θεική χονδροϊτίνη, και οι οποίες είναι οι υπεύθυνες για την συγκράτηση των μορίων του νερού (εικόνα 2). Αποτελεί το 80-90% των πρωτεογλυκανών του αρθρικού χόνδρου και χαρακτηρίζεται ως το αθροιστικό μόριο των πρωτεογλυκανών (Εικόνα 5). Η πρωτεΐνη, αυτή, αποικοδομείται από διάφορες μεταλλοπρωτεϊνάσες αλλά και από το ένζυμο αγκρεκανάση , που διασπά τον πρωτεϊνικό της πυρήνα μεταξύ των G1 και G2 περιοχών σύνδεσης. Η σφαιρική G1-αμινοτελική περιοχή αλληλεπιδρά άμεσα με το υαλουρονικό οξύ με τη βοήθεια μιας πρωτεΐνης σύνδεσης και παράλληλα δημιουργεί πρωτεϊνικό δεσμό ώστε να σχηματισθεί αθροιστική δομή και με αυτόν τον τρόπο σταθεροποιείται (Fosang AJ et.al, 1991). Η αγκρεκανάση, ειδικότερα, διασπά τον δεσμό Glu373- Ala374 (Sandy JD et.al, 1992) , (Lohmander LS et.al, 1993). Από την διάσπαση προκύπτουν κλάσματα που συσσωρεύονται στα υγρά των ασθενών και τα οποία διασπώνται περαιτέρω από άλλες πρωτεϊνάσες με τελικό αποτέλεσμα, τα προϊόντα να αποβάλλονται στο αρθρικό υγρό. Η πρώτη αγκρεκανάση περιγράφηκε το 1999 και ονομάστηκε αγκρεκανάση-1, ενώ στη συνέχεια περιγράφηκε και ένα δεύτερο ένζυμο, η αγκρεκανάση-2. Τα δύο αυτά ένζυμα είναι γνωστά σήμερα ως ADAMTS-4 και ADAMTS-5, αντιστοίχως, και ουσιαστικά αποτελούν μεταλλοπρωτεϊνάσες ψευδαργύρου (Tang BL, 2001), (Cal S et.al, 2002). Τέσσερα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών ADAMTS, οι : ADAMTS-1, ADAMTS-2, ADAMTS-4, ADAMTS-5 έχουν αναγνωρισθεί ως αγκρεκανάσες (Naito S et.al,2007). Η αγκρεκάνη, ως κύριο συστατικό του αρθρικού χόνδρου, (μαζί με το κολλαγόνο τύπου II) είναι έντονα ενυδατωμένη λόγω του ότι διαθέτει αλυσίδες αρνητικά φορτισμένων μακρών

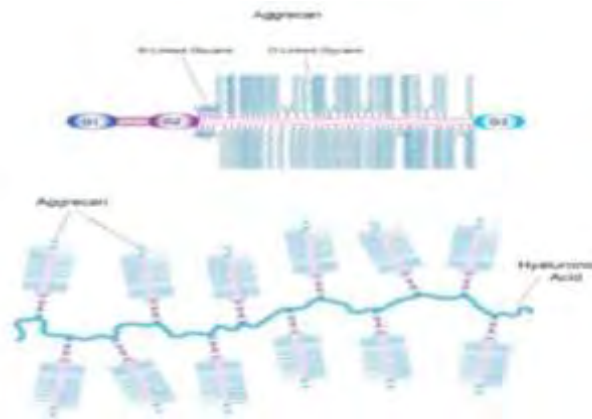
πολυσακχαριτών και κατ' αυτόν τον τρόπο παρέχει στον χόνδρο την ικανότητα να αντιστέκεται στα συμπιεσμένα φορτία.

Η καταστροφή, λοιπόν, του κολλαγόνου τύπου II και της αγκρεκάνης, είναι τα κύρια χαρακτηριστικά της καταστροφής της εξωκυττάριας ουσίας στην οστεοαρθρίτιδα. Έχει δειχθεί, από μια ομάδα, ότι τα συστατικά, του χόνδρου που περιλαμβάνουν κολλαγόνο τύπου II ή αγκρεκάνη, είναι αυξημένα σε επίπεδο mRNA σε οστεοαρθρικό χόνδρο (Aigner et.al, 2001, 2005, 2006) (Kevorkian et.al, 2004). Πιο πρόσφατα, προσεγγίσεις της πρωτεομικής, επέτρεψαν να αναλυθεί ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών του χόνδρου, και δείχθηκε πως η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών, μπορεί να επηρεάζεται από τα microRNAs του χόνδρου (Iliopoulos et.al, 2008). Επιπλέον άλλες έρευνες έδειξαν, πως κατά την αποδόμηση της μεμβράνης, τα επίπεδα διαφόρων μεταλλοπρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της MMP13 ρυθμίστηκαν ανοδικά (Lee et.al, 2005), (Guo et.al, 2008), (Jmeian and El Rassi, 2008), (Vincourt et.al, 2008). Η απώλεια της αγκρεκάνης από την εξωκυττάρια ουσία του αρθρικού χόνδρου, πιστεύεται ευρέως ότι διαμεσολαβείται από μεταλλοπρωτεϊνάσες οι οποίες μπορούν να διασπάσουν την αγκρεκάνη σε έναν αριθμό θέσεων (Nagase and Kashiwagi, 2003). Επιπροσθέτως, η άποψη αυτή ενισχύθηκε ,όταν με την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης διαπιστώθηκε πως η MMP-13 είναι σημαντικά αυξημένη σε δείγματα σε προχωρημένο στάδιο οστεοαρθρίτιδας (Aigner et.al, 2001). Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) της εξωκυττάριας ουσίας ή αλλιώς, οι εξαρτώμενες από ψευδάργυρο, πεπτιδάσες, είναι γνωστές για τον ρόλο τους στην αποικοδόμηση των συστατικών της θεμέλιας ουσίας (Lin et.al,2014), (Thiyagarajan et.al, 2013). Γενικά οι μεταλλοπρωτεϊνάσες συντίθεται σε μορφή ζυμογόνου (προ- μεταλλοπρωτεϊνάσες) ο οποίος απαιτεί πρωτεολυτική απομάκρυνση του προ-πεπτιδικού πεδίου, ώστε να επάγει τη δραστικότητα τους (Strongin et.al, 1995). Έχει επίσης δειχθεί, ότι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες παρουσιάζουν σημαντικούς ενδοκυτταρικούς ρόλους.

Στην οστεοαρθρίτιδα, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες θεωρούνται τα κύρια ένζυμα που ευθύνονται για την αποικοδόμηση της αγκρεκάνης, αλλά και των διαφόρων μορφών κολλαγόνου στον χόνδρο (Okada Y, 2001). Μελέτες αναφέρουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης μεταλλοπρωτεϊνών σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδα στο χόνδρο αλλά και σε αρθρικούς ιστούς ασθενών με οστεοαρθρίτιδα (Tetlow LC

et.al, 2001). Συγκεκριμένα, η μεταλλοπρωτεΐνάση-13 (MMP-13) θεωρείται ένα από τα βασικά ένζυμα στην ανάπτυξη της νόσου (Dean DD et.al,1989).

Συσχέτιση της MMP-13, έχει βρεθεί και με το μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα RUNX-2 το οποίο φαίνεται να ρυθμίζει ανοδικά την έκφραση της μεταλλοπρωτεΐνάσης -13 (Wong M et.al, 2003). Τα μέλη των μεταγραφικών παραγόντων RUNX (runt related transcription factor) επάγουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Το RUNX2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μεταλλοποίηση των οστών ενισχύοντας τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Komori T et.al, 1997), καθώς επίσης ενέχεται στην παθογένεση της ΟΑ μέσω της υπερτροφίας των χονδροκυττάρων και της καταστροφής της εξωκυττάριας ουσίας (Kamekura et.al, 2006). Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα, η ενεργοποίηση του RUNX2 στην ΟΑ πραγματοποιείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK κινασών (μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση, Mitogen-activated protein kinase), το οποίο συμμετέχει στην πρόωρη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών σε απάντηση στο μηχανικό stress (Furthauer M et.al, 2002) (Fan X et.al, 2006) Πρόσφατες έρευνες σε μοντέλα ποντικών με έλλειψη RUNX-2, παρατήρησαν προοδευτική βελτίωση της οστεοαρθρίτιδας σε συνδυασμό με μειωμένα επίπεδα έκφρασης της MMP-13 (Kamekura S et.al, 2006). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η αγκρεκανάση-2 (ADAMTS-5) αποτελεί έναν πιθανό ρυθμιστή της μειωμένης έκφρασης του RUNX2 (Thirunavukkarasu K et.al, 2007). Παράλληλα, το RUNX2 ρυθμίζει θετικά το μηχανικό stress που είναι επαγόμενο από την ADAMTS-5, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι το RUNX2 πιθανώς αποτελεί γονίδιο-στόχο στην αποικοδόμηση του χόνδρου (Tetsunaga T et.al, 2011). Έχει, ακόμη, δειχθεί πως η θέση δέσμευσης του RUNX-2 υπάρχει στον προαγωγό της αγκρεκανάσης 1 (ADAMTS-4) και της αγκρεκανάσης 2 (ADAMTS-5) (Thirunavukkarassu K et.al, 2006) , υποδεικνύοντας ότι και οι δύο αγκρεκανάσες είναι δυνητικοί στόχοι του RUNX-2 (Thirunavukkarassu K et.al, 2007) . Επιπλέον, ο μεταγραφικός παράγοντας RUNX-2, μέσω της συμμετοχής του στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας (Kameruca S et.al, 2006), διεγείρει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την MMP-13 (Salavamurugan N et.al, 2006) (Tanne Y et.al, 2008). Πρόσφατη έρευνα κατέδειξε, για πρώτη φορά ότι ο RUNX-2 ρυθμίζει ανοδικά την έκφραση της αγκρεκανάσης 2 (Tetsunaga T et.al, 2011).



Εικόνα 2: Απεικονίζονται τα: Μόριο πρωτεογλυκάνης και η λειτουργία δομή συμπλόκου αγκρεκάνης. Απεικονίζεται η δομή της αγκρεκάνης το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό της άκρο (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a1960?lang=en®ion=GR>).

A.4 ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Παρόλο που η οστεοαρθρίτιδα έχει θεωρηθεί παραδοσιακά ως μια μη φλεγμονώδης νόσος (Li Y et.al, 2016), (Hugle T et.al, 2016) όλο και περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν φλεγμονώδη διήθηση αρθρικών μεμβρανών (Sakkas LI and Platsoucas CD, 2007, Ponchel F et.al, 2015) από μακροφάγα κύτταρα, ιστιοκύτταρα, Β κύτταρα, κύτταρα πλάσματος και δενδριτικά κύτταρα. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τουλάχιστον σε ορισμένους ασθενείς η οστεοαρθρίτιδα είναι μια φλεγμονώδης νόσος, λόγω αυτής της εμφάνισης φλεγμονώδους διήθησης των αρθρικών μεμβρανών-υμενίτιδα. Επιπλέον μελέτες αναφέρουν ότι ο αριθμός των φλεγμονωδών κυττάρων στον αρθρικό ιστό είναι υψηλότερος σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα από ότι σε υγιή άτομα (Fonseca JE et.al, 2002), (Rollin R et.al, 2008). Η φλεγμονή ενοχοποιείται για την δυσλειτουργία που παρατηρείται στα χονδροκύτταρα των ασθενών, αλλά και στη διαταραχή μεταξύ των καταβολικών και των αναβολικών διαδικασιών που ενέχονται στην οργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας (Sandell LJ and Aigner T, 2001) , (Loeser RF, 2006). Επιπρόσθετα έχει δειχθεί, ότι τα χονδροκύτταρα είναι ικανά να παράγουν κυτοκίνες και χημοκίνες, αλλά και

να αντιδρούν σε αυτές. Στο υγρό των οστεοαρθρικών αρθρώσεων έχουν βρεθεί καταβολικά ένζυμα αλλά και φλεγμονώδεις μεσάζοντες όπως ιντερλευκίνες (Pelletier JP et.al, 2001) , (Wojdasiewicz P et.al, 2014). Η συμβολή της φλεγμονής στην παθολογία της νόσου ενισχύθηκε περαιτέρω από πειράματα που έδειξαν ότι η φλεγμονή στην οστεοαρθρίτιδα είναι ανατομικά περιορισμένη και ποικίλλει σε ένταση. Ειδικότερα, οι αρθρικές μεμβράνες στις περιοχές που περιβάλλουν τον χόνδρο των ασθενών και οι οποίες περιέχουν τα T κύτταρα που πλαισιώνουν τα Β λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα του πλάσματος, έδειξαν έντονη φλεγμονώδη απάντηση (Lindblad S and Hedfors E, 1987).

A.5 ΓΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Η κυτταρική γήρανση, αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό όλων των τύπων των κυττάρων με εξαίρεση των καρκινικών αλλά και κάποιων βλαστικών κυττάρων. Ο μηχανισμός της γήρανσης, πιστεύεται ότι αναπτύχθηκε από τους οργανισμούς ώστε να αποφευχθεί ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός κυττάρων που το DNA τους είχε υποστεί κάποιου είδους βλάβη. Παρ' όλα αυτά, είναι κοινώς αποδεκτό πως όταν σε έναν οργανισμό συσσωρεύονται γηρασμένα κύτταρα, ενισχύεται η γήρανση του ίδιου του οργανισμού αλλά και η εμφάνιση ηλικιοσυσχετιζόμενων ασθενειών, όπως η οστεοαρθρίτιδα (Campisi, 1997). Η κυτταρική γήρανση, χωρίζεται σε δύο βασικές κατηγορίες. Στην αναδιπλασιαστική κυτταρική γήρανση (που σχετίζεται με την μείωση των τελομερών του μήκους των τελομερών) και την επαγόμενη από το stress κυτταρική γήρανση (Bodnar et.al, 1998).

Ένας από τους συνηθέστερους παράγοντες κινδύνου, λοιπόν, για την οστεοαρθρίτιδα, είναι η ηλικία. Όπως αναφέρθηκε, η πλειοψηφία των ατόμων άνω των 65 ετών διαγιγνώσκεται με ακτινογραφικές αλλαγές σε μια ή σε περισσότερες αρθρώσεις (Felson DT et.al, 1987), (Andrianakos AA et.al, 2006). Η γήρανση επηρεάζει τον χόνδρο αλλά και ιστούς των αρθρώσεων όπως τον αρθρικό, το υποχονδριακό οστό αλλά και τους μυς. Μελέτες που χρησιμοποιούν τα αρθρικά χονδροκύτταρα υποδηλώνουν ότι τα γηράσκοντα κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένο

οξειδωτικό stress που προάγει τη γήρανση των κυττάρων και μεταβάλλει τη λειτουργία των μιτοχονδρίων (Loeser RF, 2011, Naik E and Dixit VM, 2011). Ένα άλλο χαρακτηριστικό γνώρισμα των γερασμένων χονδροκυττάρων είναι η μειωμένη απόκριση διόρθωσης, εν μέρει λόγω μεταβολής του προτύπου έκφρασης του υποδοχέα. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν επίσης ότι η μεθυλίωση ολόκληρου του γονιδιωματικού DNA έδειξε διαφορετικό πρότυπο υπογραφής σε γερασμένα κύτταρα. Η αλληλούχιση σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα επιβεβαίωσε επίσης ότι αυτή η επιγενετική αλλοίωση παρουσιάστηκε στα χονδροκύτταρα (Fernandez-Tajes J et al, 2014), (Den Hollander et al, 2014) εν μέρει λόγω αλλαγών στην έκφραση των ενζύμων μεθυλίωσης και απόμεθυλίωσης (Haseeb A et al, 2014, Taylor SE et al, 2015).

Σημαντικός είναι και ο ρόλος της καβεολίνης-1 (cav-1), μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, στην κυτταρική γήρανση είτε ασκώντας θετική είτε αρνητική δράση. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι το οξειδωτικό επάγει αύξηση στην έκφραση της καβεολίνης-1 (γήρανση επαγόμενη από το stress). Μελέτες υποστηρίζουν ότι η έκφραση της καβεολίνης-1 στα γερασμένα κύτταρα ρυθμίζεται από την πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από το μιτογόνο p38 (MAPK), Sp1, NF-κB, φωσφολιπάση C (PC-PLC) και κυκλοοξυγενάση-2 (COX2). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η cav-1 παίζει κεντρικό ρόλο στην προαγωγή της πρόωρης γήρανσης που προκαλείται από διάφορες καταστάσεις stress, όπως για παράδειγμα, η ακτινοβολία (Cho KA et al, 2003). Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζουν ευρήματα που υποδεικνύουν ότι η καβεολίνη-1 ρυθμίζει μια ποικιλία μονοπατιών σηματοδότησης στα γερασμένα κύτταρα, όπως το p53/p21^{WAF-1/Cip1}, τον υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), την κινάση εστιακής προσκόλλησης (FAK) και τις μικρές οδούς Rho GTPase. Σε μοντέλα ποντικών, υπερέκφραση της καβεολίνης-1 σε ινοβλάστες, είχε ως αποτέλεσμα την παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₀/G₁.

A. 6 ΚΑΒΕΟΛΙΝΕΣ

Οι καβεολίνες είναι εξειδικευμένες δομές που σχηματίζουν εγκοιλώσεις (μικροσπλήλαια) στην κυτταρική μεμβράνη και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη λιποειδή ομοίωση και στη μεταγωγή σήματος (Kurzchalia et.al, 1992). Οι καβεολίνες περιγράφονται κατά κύριο λόγο ως εισβολείς κυτταρικής επιφάνειας, μεγέθους 50-100nm (Yi et.al, 2014). Είναι υπεύθυνες για τον καθορισμό, τον διαχωρισμό, αλλά και την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων και των κυτταρικών οργανιδίων (Escribá PV and Nicolson GL, 2014). Παράλληλα, ελέγχουν την κυτταρική συμπεριφορά μέσω λήψης και μετάδοσης κυτταρικών σημάτων. Εκφράζονται σε αφθονία σε διάφορους κυτταρικούς τύπους συμπεριλαμβανομένων των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, επιθηλιακών κυττάρων, λιποκυττάρων, ινοβλαστών και των κυττάρων του λείου μυϊκού τύπου, αλλά δεν εκφράζονται σε νευρωνικά κύτταρα ή λεμφοκύτταρα (Quest et.al, 2004). Οι εγκοιλώσεις της κυτταρικής μεμβράνης που δημιουργούν εμπλουτίζονται με διάφορες πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται σε ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των caveolae. Απεικονίζονται οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες με τα ενδοθηλιακά σπληλαιώδη. Δείχνονται το TRPC κανάλι του δυναμικού υποδοχέα, ο υποδοχέας GPCR, ο υποδοχέας κινάσης τυροσίνης αλλά και τα ετεροδιμερή της πρωτεΐνης (Sowa, 2012)

Μια κύρια διαφορά μεταξύ των σπηλαίων και των λιπιδικών σχεδίων, είναι ότι η οι καβεολίνες περιέχουν μια μεμβρανική πρωτεΐνη γνωστή ως καβεολίνη (Cav). Οι καβεολίνες είναι πλούσιες σε περιεκτικότητα σε χοληστερόλη και γλυκοσφιγγολιπίδια. Μπορούν να υπάρχουν μεμονωμένες ή σε αποσπασμένες συστάδες, οι οποίες μοιάζουν με σταφύλια, αλλά και σε μακριές σωληνοειδείς δομές που προέρχονται από την σύντηξη μοναδικών μικροσπηλαίων. Οι καβεολίνες αποτελούν ουσιαστικά τις δομικές πρωτεΐνες των μικροσπηλαίων. Υπάρχουν 3 κύριες ισομορφές της καβεολίνης : η καβεολίνη 1,2 και 3 (Cav-1, η Cav-2 και η Cav-3). Οι πρώτες δύο εντοπίζονται κυρίως σε κύτταρα μη μυϊκών και λείων μυών, ενώ η τελευταία εδράζεται κυρίως σε μυϊκά κύτταρα (Murata et.al, 2007). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα Cav-1, τα οποία εμπλέκονται στην ενδοθηλιακή φλεγμονή, πρόσφυση και φαγοκυττάρωση. Είναι εξαιρετικά σημαντικό ότι η έκφραση της Cav-1 είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό των μικροσπηλαίων. Η καβεολίνη-1 εκφράζεται σε μη μυϊκά κύτταρα και εμπλέκεται στη ρύθμιση πολυάριθμων 'καταρρακτών' σηματοδότησης (Drab et.al, 2001, Razani et.al, (Park et.al, 2002). Για παράδειγμα, η ενδοθηλιακή Cav-1 ρυθμίζει την παραγωγή νιτρικού οξέος στο ενδοθήλιο των αγγείων, τη μικροαγγειακή διαπερατότητα και την αγγειακή αναδιαμόρφωση (Murata et.al., 2007). Αντιθέτως, η καβεολίνη-3 αποτελεί εξειδικευμένη ισομορφή για τους γραμμωτούς μύες (Way M. and Parton RG., 1995). Η καβεολίνη-2, παρόλο που παρουσιάζει ίδιο μοτίβο έκφρασης με την καβεολίνη-1, φαίνεται πως δεν βοηθά στη δημιουργία των μικροσπηλαίων (Scherer PE et.al, 1996).

Μαζί με τις καβεολίνες, διάφορες υποστηρικτικές πρωτεΐνες έχουν αναγνωριστεί ως βασικές δομές για τον σχηματισμό και την λειτουργία των μικροσπηλαίων. Οι πιο σημαντικές από αυτές τις πρωτεΐνες είναι τέσσερις και ονομάζονται καβίνες (καβίνη1, καβίνη 2, καβίνη 3 και καβίνη 4) και σχηματίζουν έτεροολιγομερή που είναι εξέχουσας σημαντικότητας για τον σχηματισμό, αλλά και την λειτουργικότητα των μικροσπηλαίων (Hayer et.al., 2010, Vinten J et.al, 2001). Η καβίνη 1 αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα απελευθέρωσης πολυμεράσης, η καβίνη 2 είναι μια πρωτεΐνη η οποία αποκρίνεται όταν υπάρχει στέρση ορού (πρωτεΐνη απόκρισης) (Dávalos A et.al, 2010). Η καβίνη 3 είναι μια πρωτεΐνη που προσδέεται στην κινάση-c και παίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό των

μικροσπηλαίων και τέλος η καβίνη 4 είναι εξειδικευμένη για τα λεία μυϊκά κύτταρα (McMahon KA. et.al, 2009, Bastiani M. et.al, 2009).

A. 6.1 ΚΑΒΕΟΛΙΝΗ-1

Η καβεολίνη-1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από 148 αμινοξέα και έχει βάρος 24 kDa. Πρώτη φορά αναγνωρίστηκε το 1989 ως μια πρωτεΐνη που είχε φωσφορυλιωμένη τυροσίνη και συναπτόταν σε κύτταρα ασθενών που είχαν προσβληθεί από τον ιό Rous Sarcoma Virus – SRV (Glennay JR, 1989). Η καβεολίνη -1 αποτελείται από δύο ισομορφές (cav-1a και cav-1b). Το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο της βρίσκονται και τα δύο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και χωρίζονται μεταξύ τους με την ύπαρξη ενός υδρόφοβου τμήματος που αποτελείται από τα αμινοξέα 102 έως 134 (Glennay JR, 1989).

Η καβεολίνη-1 αποτελεί δομικό πρωτεϊνικό συστατικό των μικροσπηλαίων στους περισσότερους τύπους κυττάρων (Kurzchalia et al., 1992). Η πρωτεΐνη έχει προταθεί πως λειτουργεί ως μια ικριωματική πρωτεΐνη με τη μεσολάβηση πολυάριθμων φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της βιογένεσης του ικριώματος, της φυσαλιδώδους μεταφοράς, της ομοιόστασης της χοληστερίνης, της μεταγωγής σήματος και της καρκινογένεσης (Engleman et.al, 1998, Okamoto et.al, 1998). Μελέτες έχουν δείξει ότι η Cav-1 περιέχει έναν τομέα ολιγομερισμού που χαρτογραφείται στα αμινοξέα 61-101, ο οποίος ρυθμίζει τον πολυμερισμό 14-16 μεμονωμένων μορίων καβεολίνης (καβεολίνες). Σύμφωνα με αυτά τα ευρήματα, η Cav-1 σχηματίζει πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους 400 kDa, όπως καταδεικνύεται με φυγοκέντρηση βαθμίδωσης ταχύτητας (Monier et.al, 1995, Sargiacomo et.al, 1995), τα οποία είναι αδιάλυτα σε ψυχρά μη ιονικά απορρυπαντικά (Kurzchalia et.al, 1992). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα καβεολίνης-1 τα οποία εμπλέκονται στην ενδοθηλιακή φλεγμονή, πρόσφυση και στην φαγοκυττάρωση. Ο τομέας ικριώματος της καβεολίνης (Caveolin Scaffolding Domain- CSD) (αμινοξέα 82-101) μεσολαβεί σε άμεσες

αλληλεπιδράσεις μεταξύ της καβεολίνης-1 με άλλα μόρια, αλλά και μιας ποικιλίας σηματοδοτικών μορίων που φέρουν την αντίστοιχη περιοχή δέσμευσης της καβεολίνης [Caveolin Binding Domain- SBD: ΦΧΦΧΧΧΧΦ, ΦΧΦΧΧΧΧΦΧΧΦ ή ΦΧΧΧΧΦΧΧΦ, όπου με 'Φ' συμβολίζεται ένα αρωματικό αμινοξύ και με 'Χ' ένα οποιοδήποτε, μη αρωματικό αμινοξύ (Jagannadham MV et.al, 2002)]. Η άμεση αλληλεπίδραση με την Cav-1 γενικά έχει σαν αποτέλεσμα την απομόνωση ενός δεδομένου μορίου σηματοδότησης εντός των κυψελωτών μεμβρανών και τη διαμόρφωση της δραστηριότητας σηματοδοτήσεώς τους. Αυτές οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες βασίζονται απλώς στην υπερδομική εμφάνισή τους ως εισβολείς μεμβράνης πλάσματος και λόγω αυτού οι καβεολίνες θεωρήθηκαν αρχικά ότι λειτουργούσαν ως κυστίδια μακρομοριακής μεταφοράς (Matveev et.al, 2001). Από τότε ο ρόλος τους έχει επεκταθεί και είναι γνωστό ότι λαμβάνουν μέρος στην μεταγωγή σήματος, στον κυτταρικό μεταβολισμό, στην ομοιόσταση της χοληστερόλης, στην ενδοκυττάρωση, αλλά και στην προαγωγή και στην καταστολή ενός όγκου (Galbiati et.al, 2001, Watanabe et.al, 2009). Μια ακόμα σημαντική λειτουργική περιοχή της καβεολίνης-1 είναι η θέση φωσφορυλίωσης στη τυροσίνη-14, αλλά και η θέση φωσφορυλίωσης της στην τυροσίνη-80, γεγονός που επηρεάζει άμεσα την μετακίνηση της χοληστερόλης και μπορεί να οδηγήσει στην ενδοκυττάρια συσσώρευσή της (Li S et.al,1996). Τέλος, αποτελεί σημαντική πρωτεΐνη στον μεταβολισμό διότι όταν εκφράζεται, οδηγεί άμεσα σε αλλαγή του μεταβολισμού ή στην αλλαγή της ενεργειακής ισορροπίας (Sotgia F. et.al, 2012).

A.6.2 ΚΑΒΕΟΛΙΝΗ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Η καβεολίνη-1 φαίνεται πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές ηλικιο-συσχετιζόμενες ασθένειες, ενώ επίσης ενέχεται σε διεργασίες που συμμετέχουν στην παθολογία της ΟΑ καταδεικνύοντας και έναν πιθανό της ρόλο στην ανάπτυξη της οστεοαρθρίτιδας.

Ειδικότερα, μελέτη της ερευνητικής ομάδας *Volonte και συν.* υποστήριξε ότι η καβεολίνη-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επαγόμενη από το stress

διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης, διαδικασίας που ενέχεται στην ΟΑ, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασής της σε υποκυτταροτοξικά επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου (Volonte et.al, 2002). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τόσο η IL-1β όσο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου αυξάνουν τα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της Cav-1 και επάγουν την πρόωρη γήρανση στα αρθρικά χονδροκύτταρα (Dai et.al, 2006). Καταστολή της έκφρασης της καβεολίνης-1 με τη χρήση antisense ολιγονουκλεοτιδίων, αναστέλλει τη γήρανση των χονδροκυττάρων που επάγεται από την IL-1β και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Dai et.al, 2006), υποδηλώνοντας ότι η Cav-1 μπορεί να διαδραματίσει ρόλο στην παθογένεια της ΟΑ.

Η υπόθεση ότι η καβεολίνη-1 ενέχεται σε διεργασίες κυτταρικής γήρανσης υποδηλώνοντας και τη συμβολή της στην παθολογία της ΟΑ ενισχύεται από ευρήματα που υποδεικνύουν την αλληλεπίδρασή της με μόρια που φαίνεται να συμβάλλουν στην πάθηση. Ειδικότερα μελέτες, έχουν συσχετίσει τον παράγοντα NF-κΒ με την κυτταρική γήρανση, αλλά και τη δράση της καβεολίνης-1, αφού αυτή διαθέτει πιθανές θέσεις σύνδεσης με τον παράγοντα στην περιοχή των ιντρονίων της. Σε άλλες έρευνες έχει αναφερθεί σχέση της καβεολίνης-1 με την PC-PLC. Υποστηρίζεται ότι όταν παρατηρείται κυτταρική γήρανση, η έκφραση της καβεολίνης -1 αλλά και η ενεργότητα της PC-PLC αυξάνονται σημαντικά. Όταν δε αναστέλλεται η ενεργότητα της PC-PLC μειώνεται και η έκφραση της καβεολίνης, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ίδια η PC-PLC λειτουργεί ως επαγωγέας της κυτταρικής γήρανσης μέσω κάποιου μηχανισμού ο οποίος εξαρτάται άμεσα από την καβεολίνη-1 (Sun C. et.al, 2009).

Η πρωτεΐνη p53 αποτελεί μια εξαιρετικά σημαντική ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη όπου όταν ενεργοποιείται, επάγεται η κυτταρική γήρανση. Μάλιστα αυτό έχει δειχθεί και σε έρευνες σε ποντικούς όπου σε αυξημένη ενεργότητα της πρωτεΐνης παρουσιαζόταν φαινότυπος πρόωρης γήρανσης, αλλά και μειωμένο προσδόκιμο ζωής (Maier B. et.al,2004). Η ρεδουκτάση της θιερεδοξίνης (Mdm2), που έχει θέση πρόσδεσης με την καβεολίνη -1, παρεμποδίζει το p53 να εισέλθει μέσα στον πυρήνα και έτσι αναστέλλει την μεταγραφική δράση του (Kubbutat et.al, 1997, Bartholomew et.al, 2009).

Τέλος, έρευνες υποστηρίζουν ότι η καβεολίνη-1 ενέχεται και στη ρύθμιση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης (Focal adhesion kinase, FAK) αλλά παράλληλα και των μικρών Rho GTPασών στα γηρασμένα κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν αλλαγές στο σχήμα τους (μεγάλα και επίπεδα), οι οποίες ενισχύουν την κυτταρική γήρανση. Όταν η έκφραση της καβεολίνης-1 μειώνεται, μειώνεται και η φωσφορυλίωση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης, η οποία τυπικά είναι αυξημένη σε γηρασμένα κύτταρα. Τα παραπάνω ενισχύθηκαν από πειράματα όπου η αποσιώπηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 με την χρήση siRNA, οδήγησε σε μείωση του σχηματισμού ινιδίων ακτίνης εστιακής προσκόλλησης στα κύτταρα που ήταν γηρασμένα. Επιπρόσθετα, μέλη της οικογένειας των Rho GTPασών (όπως η Rac-1 και η Cdc42) εντοπίστηκαν στις μεμβράνες στα μικροσπύλαια και φάνηκε να αλληλεπιδρούν άμεσα με την καβεολίνη-1 σε γηρασμένα κύτταρα εμφανίζοντας αυξημένη ενεργότητα. Σε μείωση των επιπέδων της, αναδιαμόρφωσε τα κύτταρα κάνοντας το σχήμα τους να μοιάζει με αυτό των νεαρών. Δείχθηκε κατ' αυτόν τον τρόπο ότι είναι πολύ πιθανό η καβεολίνη-1 να παίζει ρόλο στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού και να αποτελεί σημαντικό παράγοντα όσον αφορά τις μορφολογικές αλλαγές που συναντώνται στα γηρασμένα κύτταρα, πιθανολογώντας ότι παρόμοιες αλλαγές και δράση της καβεολίνης-1 να παρατηρούνται και σε διεργασίες κυτταρικής γήρανσης των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων (Cho et.al, 2004).

Πρόσφατες έρευνες κατέδειξαν, πως η υπερέκφραση της καβεολίνης-1, προκάλεσε την ενεργοποίηση του p38 MAPK μονοπατιού και εξασθένησε την ικανότητα των χονδροκυττάρων να παράγουν κολλαγόνο τύπου II και αγκρεκάνη. Αντίθετα, σε καθοδική ρύθμιση της έκφρασης της καβεολίνης-1 με αντιπληροφοριακό ολιγονουκλεοτίδιο, ανέστειλε σημαντικά τα χαρακτηριστικά της γήρανσης των χονδροκυττάρων (Dai SM, et.al, 2006).

Ο πιθανός ρόλος της Cav-1 στην ανάπτυξη της οστεοαρθρίτιδας ενισχύεται από μελέτες που δείχνουν συσχέτιση της καβεολίνης με την MMP-13, βασικού μορίου της παθολογίας της ΟΑ. Οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις έγκεινται στο γεγονός ότι έκφραση της MMP-13 έχει εντοπιστεί στα μικροσπύλαια και ιδιαίτερα κοντά στην καβεολίνη-1 (Burgermeister et.al,2008), ενώ επίσης μελέτη του 2009 αναφέρει ότι επαγωγή της έκφρασης της καβεολίνης-1 επάγει την έκφραση

κάποιων μεταλλοπρωτεΐναιών συμπεριλαμβανομένης και της MMP-13 (Yeh et.al, 2009). Επιπλέον απώλεια της έκφρασης της καβεολίνης-1 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης της MMP-13 υποδεικνύοντας ότι η Cav-1 παίζει ρόλο στον επαναπρογραμματισμό της εξωκυττάριας ουσίας και επάγει την πρωτεόλυση (Nagase et.al, 2006). Ωστόσο, η σχέση μεταξύ της καβεολίνης-1 και της MMP-13 δεν είναι απόλυτα σαφής και πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

A. 7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου της καβεολίνης-1 στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, καθώς και η επίδραση της καβεολίνης-1 σε γονίδια που ενέχονται στην παθολογία της οστεοαρθρίτιδας.

Για τον σκοπό αυτόν μελετήθηκαν:

- Η μεταγραφική έκφραση του γονιδίου της καβεολίνης-1 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων.
- Η μεταγραφική έκφραση του γονιδίου της καβεολίνης-1 έπειτα από αποσιώπησή της με τη χρήση μορίων siRNA σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων.
- Η μεταγραφική έκφραση του γονιδίου RUNX2 έπειτα από την αποσιώπηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 σε κυτταροκαλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων.
- Η μεταγραφική έκφραση της αγκρεκάνης έπειτα από την αποσιώπηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 σε κυτταροκαλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων.
- Η μεταγραφική έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης -13 (MMP-13) έπειτα από την αποσιώπηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 σε κυτταροκαλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων.

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αρθρικού χόνδρου που ελήφθησαν από ασθενείς οι οποίοι υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική γόνατος στην Ορθοπαιδική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Συνολικά την ομάδα μελέτης αποτέλεσαν 12 ασθενείς, ενώ την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 8 άτομα χωρίς ιστορικό παθήσεων των αρθρώσεων ή αλλοιώσεων συμβατών με ΟΑ, τα οποία υπεβλήθησαν σε χειρουργική αποκατάσταση καταγμάτων ή ακρωτηριασμό. Σε όλους τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των μακροσκοπικών ευρημάτων, τα οποία βαθμολογήθηκαν σύμφωνα με την κλίμακα του συστήματος Kellgren –Lawrence (K/L score) (Mensell JP, et.al., 1997) (Πίνακας 1). Από μελέτη αποκλείστηκαν άτομα που έπασχαν από αυτοάνοσα νοσήματα όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα και χονδροδυσπλασία, ή από μολυσματική αρθρίτιδα και μετα-τραυματική.

ΒΑΘΜΙΔΑ	0	I	II	III	IV
ΚΡΙΤΗΡΙΑ	Φυσιολογική άθρωση	Ελάχιστα Οστεόφυτα	Σαφή Οστεόφυτα	Οστεόφυτα, στένωση μεσάρθριου διαστήματος	Οστεόφυτα, στένωση μεσάρθριου διαστήματος, Σκλήρυνση υποχόνδριου οστού

B.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η απομόνωση και καλλιέργεια των χονδροκυττάρων πραγματοποιήθηκε από τμήμα του αρθρικού χόνδρου που ελήφθη άσηπτα κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης. Αμέσως μετά την παραλαβή του δείγματος, έγινε έκπλυση του ιστού με ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffer Saline (PBS) ώστε να καθαριστεί από τα υπολείμματα του χειρουργείου.

Η απομόνωση των χονδροκυττάρων πραγματοποιήθηκε με ειδική ενζυμική επεξεργασία με προνάση και κολλαγενάση προκειμένου να διασπαστούν στοιχεία του συνδετικού ιστού και να απελευθερωθούν τα κύτταρα. Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagles medium / Ham's F-12 (DMEM/F-12, GIBCO BRL, UK) εμπλουτισμένο με ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) σε αναλογία 10% του όγκου του θρεπτικού υλικού και αντιβιοτικά (πενικιλίνη και στρεπτομικίνη) σε αναλογία 1%.

Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Heraeus Instrumanets) ο οποίος παρέχει σταθερή θερμοκρασία στους 37° C, κατάλληλα επίπεδα υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με CO₂. Για την αποφυγή μολύνσεων, οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε εστία κάθετης νηματικής ροής, ενώ η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

Αναλυτικά ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- 1) Ξέπλυμα του ιστού με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- 2) Τεμαχισμός του ιστού και μεταφορά σε τρυβλία Petri.
- 3) Επώαση του ιστού διαδοχικά με προπάνη και κολλαγενάση.
- 4) Μεταφορά του περιεχομένου των τρυβλίων σε σωληνάριο των 15mL
- 5) Φυγοκέντρηση για 7 λεπτά στις 2000 στροφές (rpm) σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
- 6) Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS.
- 7) Φυγοκέντρηση για 7 λεπτά στις 2000 στροφές (rpm) σε θερμοκρασία δωματίου (RT).

- 8) Απομάκρυνση υπερκειμένου και μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα (25cm³)
- 9) Προσθήκη 5ml θρεπτικού υλικού DMEM.
- 10) Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂)

Τα χονδροκύτταρα αρχικώς βρίσκονται στο θρεπτικό υλικό ελεύθερα και το σχήμα τους είναι στρογγυλό. Κατά την καλλιέργειά τους, έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στην κάτω επιφάνεια της φλάσκας και το σχήμα τους αλλάζει σε πεπλατυσμένο. Η αποκόλλησή τους γίνεται με τη χρήση της θρυψίνης, που αποτελεί κατάλληλο ένζυμο που δρα διασπώντας τις συνδέσεις που αναπτύσσουν τα κύτταρα με την επιφάνεια της φλάσκας στην οποία προσκολλώνται. Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν και καλύψουν την κάτω επιφάνεια της φλάσκας, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργειά τους και ακολούθως κατάψυξη κυττάρων για μελλοντική χρήση.

B.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Από τις καλλιέργειες των χονδροκυττάρων απομονώθηκε RNA για τη διερεύνηση της μεταγραφικής έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων. Συγκεκριμένα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- 1) Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού (DMEM) από τη φλάσκα.
- 2) Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS (Το ξέπλυμα πραγματοποιείται 2 φορές).
- 3) Προσθήκη 1ml θρυψίνης.
- 4) Επώαση για 2-3 λεπτά στον κλίβανο.
- 5) Προσθήκη 5ml θρεπτικού υλικού στη φλάσκα ώστε να σταματήσει να δρα η θρυψίνη
- 6) Μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας σε πλαστικό σωληνάριο χωρητικότητας 15ml.
- 7) Φυγοκέντρηση των κυττάρων για 7 λεπτά στις 2000 rpm σε RT.
- 8) Απομάκρυνση του υπερκείμενου
- 9) Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS.

- 10) Φυγοκέντρηση των κυττάρων για 7 λεπτά στις 2000 rpm σε RT.
- 11) Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 1ml Trizol.
- 12) Επώαση σε υδατόλουτρο στους 15-30°C για 5 λεπτά.
- 13) Προσθήκη 0,2ml χλωροφόρμιου.
- 14) Έντονη ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα.
- 15) Επώαση σε υδατόλουτρο στους 15-30°C για 2-3 λεπτά.
- 16) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 3500 rpm στους 2-8°C.
- 17) Μεταφορά υπερκείμενου σε σωληνάριο χωρητικότητας 2ml.
- 18) Προσθήκη 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης.
- 19) Επώαση σε υδατόλουτρο στους 15-30°C για 10 λεπτά.
- 20) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12000 rpm στους 2-8°C.
- 21) Απομάκρυνση υπερκείμενου.
- 22) Ξέπλυμα του RNA με 1ml διαλύματος 70% αιθανόλη.
- 23) Ανάδευση με τη χρήση Vortex.
- 24) Φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 10 λεπτά στους 2-8°C.
- 25) Απομάκρυνση υπερκείμενου
- 26) Στέγνωμα του RNA σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό.
- 27) Διάλυση του RNA σε 30μl RNase-free water.
- 28) Επώαση σε υδατόλουτρο στους 55-60°C για 10 λεπτά.
- 29) Αποθήκευση του RNA σε θερμοκρασία -80°C.

Ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA με φωτομέτρηση στα 260 και στα 280nm, με βάση τον εξής τύπο $C_{RNA} = \text{αραιώση} \times OD_{260} \times 40 \text{ (mg/mL)}$, ενώ η ποιότητά του ελέγχθηκε έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτη αγαρόζης 2%.

B.4 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA (ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA)

Τα RNA που απομονώθηκαν από τις καλλιέργειες των χονδροκυττάρων, μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής, όπου ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν νουκλεοτίδια με τυχαία

αλληλουχία (Random primers) και το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript III.

Για την σύνθεση του συμπληρωματικού DNA χρησιμοποιήθηκαν 5μg RNA από το κάθε δείγμα, ενώ ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25μl. Συγκεκριμένα, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 2μl Random Primers ώστε. Έπειτα το μίγμα θερμάνθηκε για 10 λεπτά στους 70°C, για να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη στις δευτεροταγής δομές των μορίων του RNA.

Στη συνέχεια, προστέθηκαν τα υπόλοιπα αντιδραστήρια ως εξής:

- Ρυθμιστικό διάλυμα 5X: 4μl
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια: 2μl
- Χλωριούχο Μαγνήσιο: 2μl
- DTT: 2μl
- SuperScript III (200U/ μl) 0,5 μl

Μετά την προσθήκη των παραπάνω αντιδραστηρίων ακολουθούν οι παρακάτω συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR):

- 20°C για 10 λεπτά
- 42°C για 45 λεπτά
- 99°C για 3 λεπτά
- 18°C για 5 λεπτά
- Η τελική θερμοκρασία ορίστηκε στους 4°C

Για να αποφευχθούν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών οι οποίες αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων που εκφράζονται στον ιστό που αναλύθηκε πάντα. Αυτά τα μετάγραφα ονομάζονται μετάγραφα 'αναφοράς'. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το mRNA του GAPDH γονιδίου (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), το οποίο ενισχύθηκε με τη χρήση των παρακάτω εκκινητών.

Forward: 5' GAGTCAACGGATTTGGTCGT 3'

Reverse: 3' GACAAGCTTCCCGTTCTCAG 5'

Για την ανίχνευση του GAPDH γονιδίου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αντίδρασης (AmpliTaq Gold 360 Master Mix, Applied Biosystems) και συγκεκριμένα:

- cDNA: 3 μl

- Ρυθμιστικό Διάλυμα 2X: 12,5 μl
- Εκκινητής Forward (50p/mol) 1 μl
- Εκκινητής Reverse (50p/mol) 1 μl
- Δις απεσταγμένο νερό 7,5 μl

Η ενίσχυση του mRNA του γονιδίου πραγματοποιήθηκε κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες PCR:

- Αρχική αποδιάταξη για 10 λεπτά στους 95°C.
- Πραγματοποίηση ενίσχυση της αλληλουχίας/στόχου σε 3 στάδια (40 κύκλοι):
 - Αποδιάταξη για 30 δευτερόλεπτα στους 95°C.
 - Υβριδοποίηση και σύνδεση των εκκινητών για 30 δευτερόλεπτα στους 60°C
 - Επιμήκυνση για 1 λεπτό στους 72°C
- Τελική επιμήκυνση για 7 λεπτά στους 72°C

Έπειτα από την περάτωση της αντίδρασης, αυτής, ελέγχθηκε η παρουσία ή μη του ενισχυμένου τμήματος με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης (3%) με τη χρήση ειδικού μάρτυρα πρότυπων μοριακών βαρών 100 bp (Fermentas).

B.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ CAV-1, RUNX-2, MMP-13, AGGREGAN ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL-TIME PCR)

ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ REAL TIME PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (ή PCR- Polymerase Chain Reaction) αποτελεί τεχνική της μοριακής βιολογίας για την ενζυματική ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA *in vitro* με την βοήθεια των εκκινητών και της Taq πολυμεράσης. Η Taq πολυμεράση εξάγεται από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και αποτελεί μια θερμοανθεκτική πολυμεράση. Οι εκκινητές είναι συνθετικά DNA ολιγονουκλεοτίδια τα οποία είναι συμπληρωματικά με μια από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA και υβριδίζονται στις συμπληρωματικές

θέσεις των αλυσίδων και συγκεκριμένα στα άκρα του τμήματος το οποίο θέλουμε να ενισχυθεί. Απαραίτητα στοιχεία για να διεξαχθεί η αντίδραση της PCR είναι:

- Η Ταq πολυμεραση με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα
- Η δίκλωνη αλληλουχία του DNA που θα ενισχυθεί
- Οι εκκινητές (Forward και Reverse)
- Διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων/dNTPs (τα οποία τα χρησιμοποιεί η πολυμεράση)
- Διάλυμα MgCl₂ (που διευκολύνει τη δράση της πολυμεράσης)

Έτσι, μια συγκεκριμένη αλληλουχία του γονιδιώματος, μπορεί να πολλαπλασιαστεί έως και δισεκατομμύρια φορές.

Κατά την Real-Time PCR ανιχνεύονται και μετρώνται αξιόπιστα τα προϊόντα, τα οποία δημιουργούνται κατά την διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Τα προϊόντα αντιστοιχούν στο ποσό του αρχικού μητρικού μορίου κατά την έναρξη της αντίδρασης, συνεπώς είναι εφικτό να μετρηθεί η ποσότητα του προϊόντος όσο η αντίδραση βρίσκεται ακόμα στην εκθετική φάση. Ένας πλήρης κύκλος μιας αντίδρασης PCR συνίσταται από τρία βασικά στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation) στους 94-95°C
- Υβριδισμός των εκκινητών στη DNA μήτρα (annealing), όπου η θερμοκρασία εξαρτάται κάθε φορά από τη σύνδεση των εκκινητών
- Επιμήκυνση των εκκινητών (extension) μέσω θέρμανσης στους 68-72°C

Η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου εξαρτάται από το μήκος (σε bp) του τμήματος του DNA που θέλουμε να ενισχυθεί.

Ένας πλήρης κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται αυτοματοποιημένα από ειδικά μηχανήματα που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές (thermal cyclers). Η καταγραφή για την ποσοτικοποίηση γίνεται με κατάλληλα συστήματα. Ένα από τα πλέον καταλληλότερα συστήματα καταγραφής είναι το σύστημα ABI 7300 (Applied Biosystems) και η αρχή του βασίζεται στη χρήση ειδικών φθορίζουσών χρωστικών που βοηθούν στην ανίχνευση του φθορισμού, ο οποίος εκπέμπεται όταν αυτοί ενσωματωθούν στο DNA του δείγματος.

Για να ανιχνευθούν τα προϊόντα της αντίδρασης, στην συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκε το φθοριόχρωμα SYBR Green, το οποίο διαθέτει την ικανότητα να δεσμεύεται στο δίκλωνο DNA και να εκλύει φθορισμό, επιτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο στο σύστημα καταγραφής να ανιχνεύσει τα επιθυμητά προϊόντα. Το μειονέκτημα της συγκεκριμένης φθορίζουσας ουσίας είναι ότι μπορεί να συνδέεται και μη ειδικά, με αποτέλεσμα να παρατηρείται φθορισμός όχι μόνο από το ειδικό προϊόν αλλά παράλληλα και από οποιαδήποτε δίκλωνη αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος, όπως από τα διμερή των εκκινητών που σχηματίζονται κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Η μη ειδική της δέσμευση χρήζει αναγκαία επιπρόσθετα στάδια ανάλυσης ώστε να προσδιορισθεί το ειδικό σήμα. Για να αποφευχθεί η μέτρηση μη ειδικού σήματος στο τέλος κάθε πειράματος, γίνεται ανάλυση των της καμπύλης των σημείων τήξης (melting curve analysis) η οποία δημιουργείται όταν το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με τη σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας. Όμως η SYBR Green, προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα για την ανίχνευση των νουκλεϊκών οξέων σε πραγματικό χρόνο. Μπορεί μεν να συνδεθεί σε όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA όμως παράλληλα συνδέεται σε μια μόνο συγκεκριμένη περιοχή του κάθε φορά, αυξάνοντας, έτσι, την ευαισθησία της μεθόδου. Παράλληλα ο υπολογισμός του φθορισμού σε αυξανόμενες θερμοκρασίες περιορίζει σημαντικά την ανίχνευση μη ειδικών προϊόντων. Η μέγιστη απορρόφηση της ουσίας ορίζεται στα 497nm.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των mRNA μεταγράφων των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω διάλυμα της αντίδρασης:

- cDNA: 3 μl
- SYBR Green: 7,5 μl
- Εκκινητής Forward: 0,3 μl
- Εκκινητής Reverse: 0,3 μl
- ddH₂O: 3,9 μl

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε γονίδιο φαίνονται πίνακα 2.

Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για να ενισχυθεί το mRNA των γονιδίων ήταν οι ακόλουθες:

- Αρχική αποδιάταξη για 10 λεπτά στους 95°C
- 45 κύκλοι κατά τους οποίους πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας σε 3 στάδια
 - Αποδιάταξη για 15 δευτερόλεπτα στους 95°C
 - Υβριδοποίηση και σύνδεση των εκκινητών για 60 δευτερόλεπτα στους 60°C
 - Επιμήκυνση για 30 δευτερόλεπτα στους 72°C

Πίνακας 2: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη RT-PCR

Γονίδιο	Forward εκκινητή	Reverse εκκινητή
CAV-1	TAATCCAAGCTTCCCTTT	AAAGTCCCCAAAGGCAG
RUNX-2	GCGGTGAGTAGAAAGGAAAG	GTGGGACTGCCTACCACTAT
MMP-13	TGGCATTGCTGACATCATGA	GCCAGAGGGCCCATCAA
AGGRECAN	CACCCCTCCATCTCAAAGAT	TGAGTTAGTGATGGCTCGTC
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCTGT	GAGTCAACGGATTTGGTCTGT

B.6 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΩΝ ΠΑΡΕΜΒΑΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA (siRNA)

ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα μικρά παρεμβατικά μόρια RNA αποτελούν μια νέα προσεγγιστική μέθοδο, η οποία έχει σαν στόχο την επιλεκτική αναστολή της έκφρασης γονιδίων που έχουν συμμετοχή στην εκδήλωση κάποιων νοσημάτων. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιούνται μικρά τεχνητά μόρια siRNA, όπου το μήκος της αλληλουχίας τους κυμαίνεται στα 19-21 νουκλεοτίδια και τα οποία είναι συμπληρωματικά με τα mRNA των γονιδίων που διερευνούνται. Γίνεται μεταφορά τους στο εσωτερικό των κυττάρων και μέσω της σύνδεσής τους με τα μόρια του mRNA των γονιδίων-στόχων, αποδομούνται και μειώνουν την παραγόμενη πρωτεΐνη. Η επιμόλυνση των κυττάρων με τεχνητά, εξωγενή μόρια siRNA, πραγματοποιείται με τη βοήθεια κατάλληλων φορέων (όπως πλασμίδια) ή λιποσωμάτων. Στην παρούσα μελέτη ως

μόριο μεταφοράς χρησιμοποιήθηκε η λιποφεκταμίνη, η οποία αποτελεί μια λιπιδιακή κατιοντική δομή που προσφέρει υψηλή αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης σε διάφορες κυτταρικές σειρές.

Μια μέρα πριν γίνει η επιμόλυνση των χονδροκυττάρων με siRNA κατά της Cav-1 τα κύτταρα μεταφέρονται σε δύο πλάκες με 6 πηγαδάκια και προστίθενται 2ml θρεπτικού υλικού DMEM/F χωρίς αυτό να περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Έπειτα, ακολουθεί επώαση των χονδροκυττάρων κάτω από στείρες συνθήκες σε κλίβανο για 24 ώρες. Τα κύτταρα πρέπει να καλύπτουν το 30-50% της επιφάνειας των πηγαδιών τη στιγμή που θα πραγματοποιηθεί η επιμόλυνση. Τα κύτταρα από τα τρία πηγαδάκια χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα ελέγχου (δεν προστέθηκε ποσότητα siRNA), ενώ στα υπόλοιπα εννέα πηγαδάκια έγινε επιμόλυνση των κυττάρων με 10nm siRNA. Η συγκέντρωση του siRNA και της λιποφεκταμίνης, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν 100 pmol/ml.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την επιμόλυνση του κάθε πηγαδιού είχε ως εξής:

- 1) Προσθήκη 5μl λιποφεκταμίνης σε 495μl Opti-MEM I Reduced Serum Medium
- 2) Προσθήκη 5 μl siRNA σε 495 μl Opti-MEM I Reduced Serum Medium
- 3) Επώαση των δύο ανωτέρω διαλυμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- 4) Ανάμειξη των δύο ανωτέρω διαλυμάτων και καλή ανάδευση.
- 5) Επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
- 6) Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από τα πηγαδάκια και ξέπλυμα με PBS (2 φορές).
- 7) Μεταφορά 1ml σε κάθε πηγαδάκι του μίγματος λιποφεκταμίνη/siRNA.
- 8) Προσθήκη 1,5 ml Opti-MEM I Reduced Serum Medium (στα πηγαδάκια που χρησιμοποιήθηκαν ως control προστέθηκαν μόνο 2,5 ml Opti-MEM I Reduced Serum Medium).
- 9) Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο για 4 ώρες.
- 10) Αφαίρεση θρεπτικού υλικού με το siRNA και προσθήκη 2ml θρεπτικού υλικού DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά.

Μετά το πέρας 48 ωρών απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και ακολούθησε απομόνωση RNA με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Στη συνέχεια

πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων Cav-1, RUNX-2, MMP-13 και της αγκρεκάνης με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR.

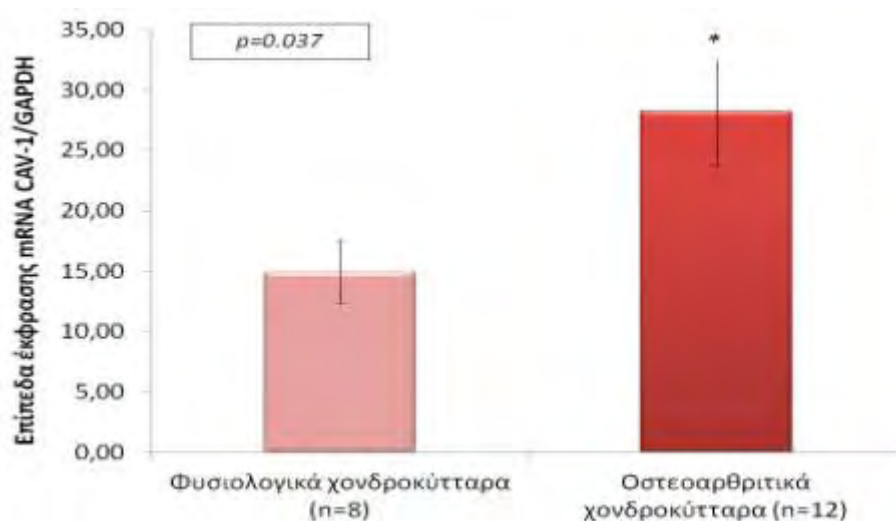
B.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 24 και συγκεκριμένα το Independent Samples T-test και Mann-Witney 2-tailed T test. Ως όριο σημαντικότητας ορίστηκε η τιμή $p < 0.05$ και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με την τυπική απόκλιση (mean+ standard deviation, SD).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΒΕΟΛΙΝΗΣ-1 ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΚΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

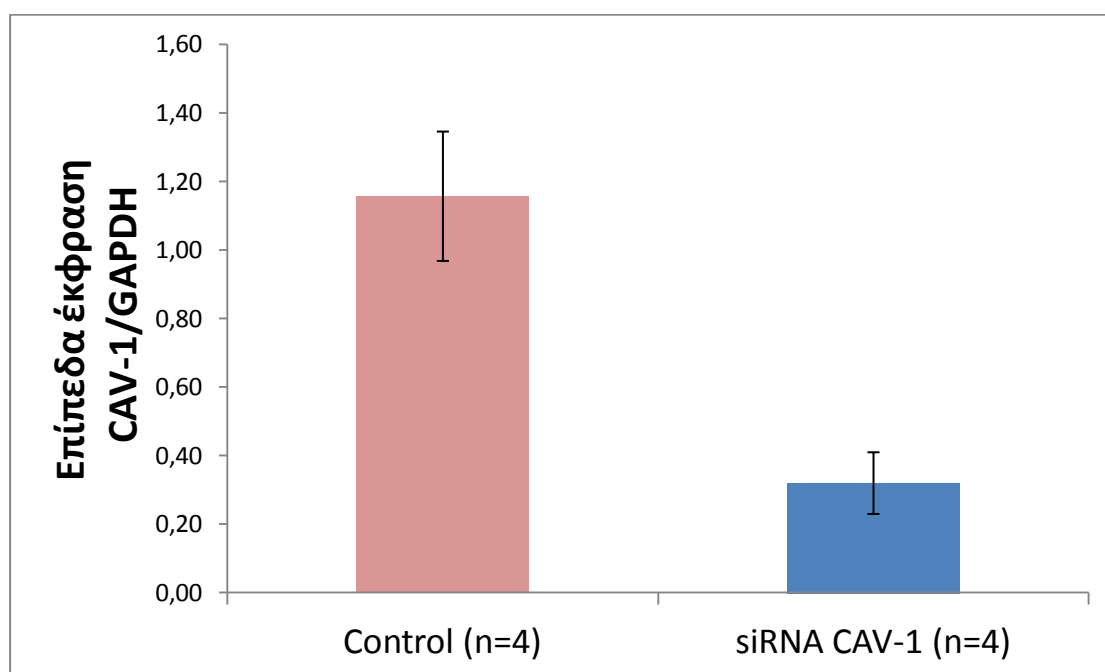
Σε μία πρώτη φάση της παρούσας εργασίας, προσδιορίστηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα της καβεολίνης-1 (Cav-1) σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών και φυσιολογικών χονδροκυττάρων. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασής της, με την μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του mRNA της Cav-1 μεταξύ ΟΑ και φυσιολογικών χονδροκυττάρων. Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης της Cav-1 σε ΟΑ χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ($p=0.037$) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης της Cav-1 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων.

Γ.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΒΕΟΛΙΝΗΣ-1 ΣΕ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΚΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ siRNA.

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω έναν πιθανό ρόλο της Cav-1 στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, αποσιωπήσαμε την έκφραση του γονιδίου της με τη μέθοδο siRNA. Πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση των κυττάρων με siRNA κατά της καβεολίνης 1 για χρονικό διάστημα 48 ωρών και ακολούθως προσδιορίστηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης της Cav-1. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p=0.049$) στα επίπεδα mRNA της καβεολίνης-1 σε OA χονδροκύτταρα στα οποία έγινε η επιμόλυνση συγκριτικά με αυτά στα οποία δε χορηγήθηκε το siRNA (Εικόνα 5)



Εικόνα 5:Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης της Cav-1 σε καλλιέργειες οστεοαρθικών κυττάρων, έπειτα από αποσιώπηση της με τη χρήση siRNA.

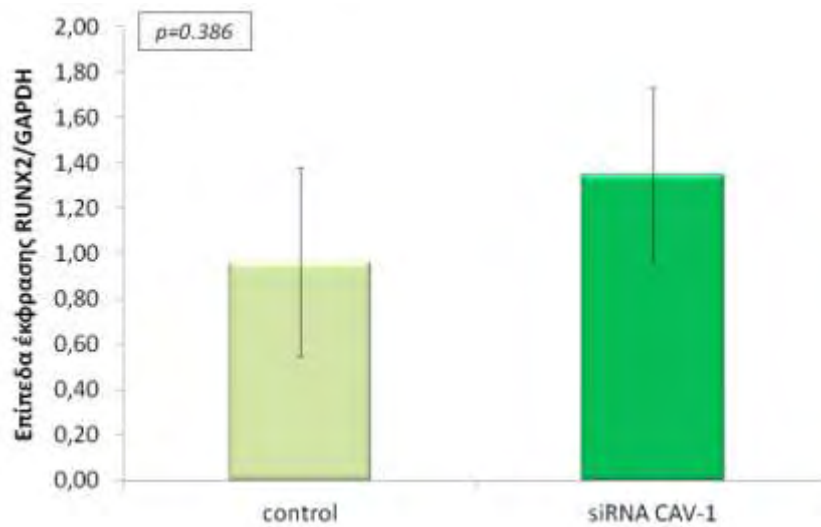
Γ.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ RUNX-2, MMP-13 ΚΑΙ ΑΓΚΡΕΚΑΝΗΣ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΚΑΒΕΟΛΙΝΗΣ-1 ΣΕ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΚΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ siRNA.

Βασισμένοι στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία που υποδεικνύει συσχέτιση της Cav-1 με τα γονίδια RUNX2, MMP-13 και αγκρεκάνη, θελήσαμε να διερευνήσουμε

την δράση της καβεολίνης στα ανωτέρω γονίδια. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασής τους μετά από αποσιώπηση του γονιδίου της καβεολίνης-1 με τη μέθοδο siRNA σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων. Η επιμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε για χρονικό διάστημα 48 ωρών και συγκέντρωση 10nmol.

Γ.3.1 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ RUNX2

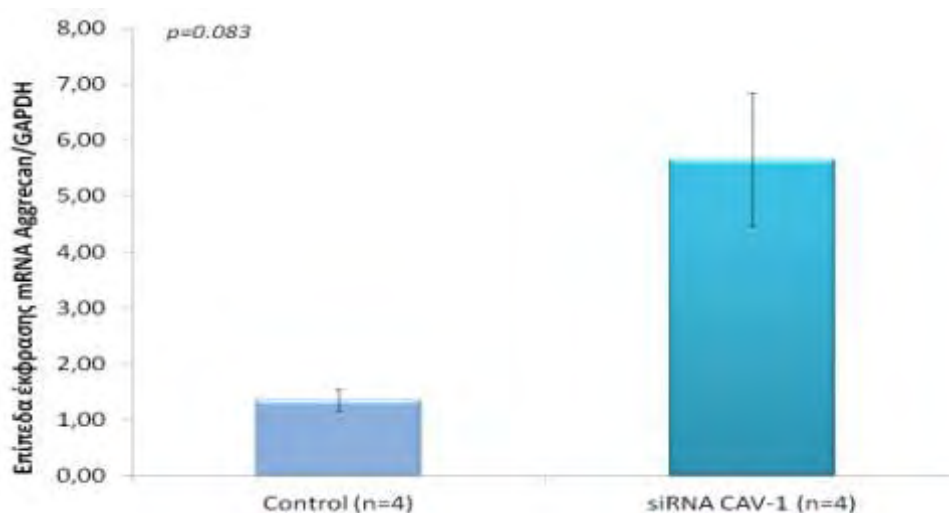
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων του RUNX2 μετά από επιμόλυνση των ΟΑ χονδροκυττάρων με siRNA έναντι της Cav-1 έδειξε ότι η καταστολή της έκφρασης της καβεολίνης δεν έχει κάποια επίδραση στα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του RUNX2 ($p=0.386$) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Προσδιορισμός της έκφρασης του mRNA του RUNX-2 γονιδίου έπειτα από αποσιώπηση του γονιδίου της καβεολίνης-1 με τη χρήση siRNA.

Γ.3.2 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΓΚΡΕΚΑΝΗΣ

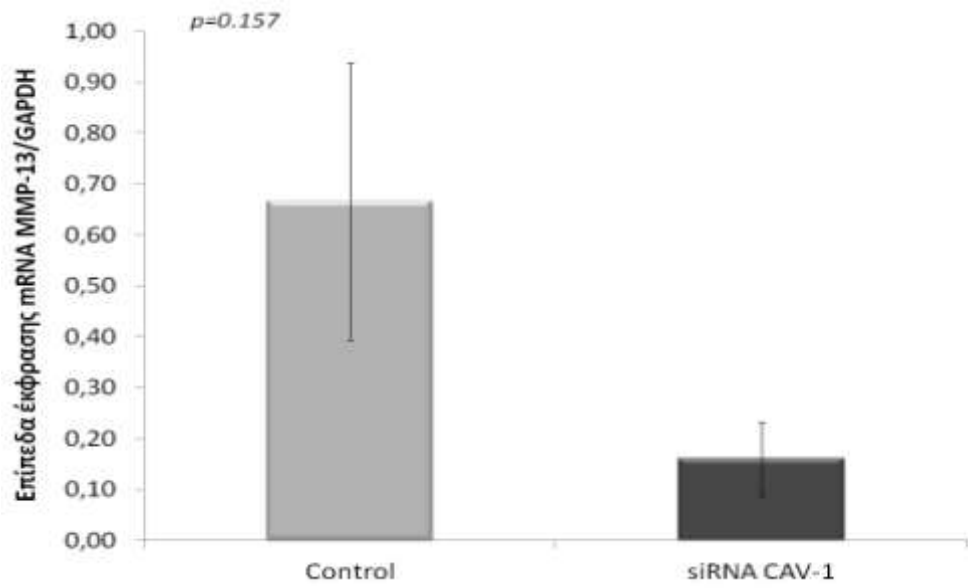
Στη συνέχεια της μελέτης, ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA της αγκρεκάνης σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων έπειτα από αποσιώπηση της καβεολίνης-1 με siRNA. Η μέθοδος της ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου έδειξε ότι παρατηρείται τάση για αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης της αγκρεκάνης ($p=0.083$) σε ΟΑ χονδροκύτταρα τα οποία επιμολύνθηκαν με το siRNA συγκριτικά με αυτά στα οποία δε έγινε επιμόλυνση (Εικόνα 7)



Εικόνα 7: Προσδιορισμός της έκφρασης του mRNA του γονιδίου της αγκρεκάνης έπειτα από αποσιώπηση του γονιδίου της καβεολίνης-1 με τη χρήση siRNA ($p>0.05$).

Γ.3.4 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ MMP-13

Επίσης προσδιορίστηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης της MMP-13 σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων στις οποίες πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση με siRNA της καβεολίνης-1. Παρόλο που τα επίπεδα της MMP-13 φαίνονται μειωμένα σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα όπου έγινε επιμόλυνση με το siRNA, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.157$) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Προσδιορισμός της έκφρασης του mRNA της MMP-13 έπειτα από αποσιώπηση του γονιδίου της καβεολίνης-1 σε κυτταροκαλλιέργειες, με τη χρήση siRNA ($p>0.05$).

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οστεοαρθρίτιδα, αποτελεί την πιο κοινή αρθροπάθεια. Κάθε νέο έτος, διαγιγνώσκονται περίπου 15.000.000 νέοι ασθενείς που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα στην Ευρώπη ενώ ο αντίστοιχος αριθμός στην Αμερική αγγίζει τα 21.000.000 (Lawrence et.al, 2008). Στην Ελλάδα ο αριθμός των πασχόντων, ανέρχεται στο 1.000.000 (Andrianakos AA et.al, 2006). Η νόσος χαρακτηρίζεται ως ηλικιο- εξαρτώμενη, διότι παρατηρείται αύξησή της, καθώς αυξάνει η ηλικία και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να πάσχουν τρεις στους τέσσερις Έλληνες, άνω των 65 ετών, ενώ παράλληλα ένα μεγάλο ποσοστό αυτών, που φθάνει το 85%, να παρουσιάζει και ακτινολογικά ευρήματα (Andrianakos AA et.al, 2006). Η οστεοαρθρίτιδα, δεν αποτελεί νόσο απειλητική για τη ζωή, όμως είναι άκρως επιβαρυντική για τους ασθενείς διότι υποβαθμίζει, σε μεγάλο βαθμό, την ποιότητα της ζωής τους. Η ΟΑ, ως χρόνια πάθηση, οδηγεί σταδιακά σε εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, χαρακτηρίζεται από έντονο πόνο στις προσβαλλόμενες αρθρώσεις και προκαλεί δυσκολία στην κίνηση της εκάστοτε άρθρωσης καταλήγοντας, πολλές φορές, στην αναπηρία. Η νόσος πιστεύεται πως είναι πολυπαραγοντική. Οι παράγοντες που οδηγούν στην εμφάνισή της είναι αρκετοί αλλά η αιτιοπαθογένειά της, δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή. Μια από της κυριότερες αιτίες εμφάνισης της οστεοαρθρίτιδας είναι η γήρανση η οποία έχει ως βασικό χαρακτηριστικό τις δομικές αλλαγές και οδηγεί στην επιδείνωση της λειτουργικότητας (Harman D, 1956). Η κυτταρική γήρανση, εμποδίζει τα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται συνεχώς και να επεκτείνονται, κατ' αυτόν τον τρόπο, και οι βλάβες ενώ η συσσώρευση των γηρασμένων κυττάρων συνεισφέρει σημαντικά στη γήρανση του οργανισμού αλλά και στην εμφάνιση ηλικιο – συσχετιζόμενων ασθενειών, όπως η οστεοαρθρίτιδα (Dimri et.al,1995 , Dai et.al, 2006). Διάφορες έρευνες, έχουν δείξει πως η καβεολίνη -1 παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης και πιο συγκεκριμένα της επαγόμενης από το stress κυτταρικής γήρανσης (Galbiati et.al, 2001). Αναλυτικότερα, η καβεολίνη- 1, έχει την ικανότητα να δεσμεύει τον παράγοντα Mdm-2 (ο οποίος δρα σαν λιγάση του p53) ανάμεσα στα μικροσπήλαια. Έτσι, σταθεροποιείται η πρωτεΐνη p53 και ενεργοποιείται το μονοπάτι p53/p21 waf1/cip1, αναστέλλοντας, έτσι, τον κυτταρικό

κύκλο. Η διαδικασία αυτή οδηγεί, τελικώς, στην επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης (Bartholomew et.al, 2009). Γνωρίζοντας, λοιπόν, την άμεση σύνδεση της οστεοαρθρίτιδας με την γήρανση, αλλά και την άμεση σχέση την καβεολίνης- 1 με την κυτταρική γήρανση, το γονίδιο της καβεολίνης ήταν αυτό που αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης για την παρούσα εργασία. Σκοπός της εργασίας, ήταν να μελετηθούν τα μεταγραφικά επίπεδα της καβεολίνης-1 σε φυσιολογικά αλλά και σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα και έπειτα, μετά από αποσιώπησή του, η μέτρηση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης της αγκρεκάνης, της μεταλλοπρωτεϊνάσης-13 (καταβολικό ένζυμο), και του μεταγραφικού παράγοντα RUNX-2, που διαδραματίζουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου.

Αρχικά, ελέγχθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα της καβεολίνης-1 σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα και επιβεβαιώθηκε πως η καβεολίνη- 1 παρουσιάζει στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα οστεοαρθρικά σε σχέση με τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την άποψη της ομάδας των Volonte και των συνεργατών του, που υποστηρίζουν πως η καβεολίνη-1 παίζει ρόλο στην διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης (Volonte et.al, 2002). Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής, υποδηλώνουν πως η καβεολίνη -1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας, συμφωνώντας με τα αποτελέσματα των Dai και των συνεργατών του (Dai et.al, 2006).

Στη συνέχεια ακολούθησε αποσιώπηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, με τη χρήση της μεθόδου siRNA, δηλαδή μικρών επεμβατικών μορίων που μας δίνουν την δυνατότητα να αναστείλουμε επιλεκτικά την έκφραση συγκεκριμένων, μόνο, γονιδίων. Στη συνέχεια ελέγχθηκαν ξανά τα μεταγραφικά επίπεδα της καβεολίνης -1 σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση..

Γνωρίζοντας πως ένα από τα πρώιμα στάδια της οστεοαρθρίτιδας είναι η απώλεια της αγκρεκάνης (Curtin WA and Reville WJ, 1995), ελέγχθηκε, αν η έκφρασή της επηρεάζεται έπειτα από την αποσιώπηση της καβεολίνης. Παρατηρήθηκε πως

αποσιωπώντας την καβεολίνη, τα επίπεδα της αγκρεκάνης αυξάνουν σημαντικά. Τα αποτελέσματα αυτά, είναι ενθαρρυντικά και επιβεβαιώνουν την υπόθεση πως η υπερέκφραση της καβεολίνης-1 ενέχεται στην αιτιοπαθογένεια της νόσου.

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης- 13, (MMP-13) . Στο παρελθόν έχει προταθεί πως ένας πιθανός τρόπος όπου η Cav-1 εμπλέκεται στην ΟΑ, είναι η σχέση της με την MMP-13 καθώς η δεύτερη εντοπίζεται στα μικροσπύλαια και μάλιστα κοντά στην καβεολίνη-1 (Burgermeister et.al, 2008). Άλλη έρευνα του 2009 έχει δείξει πως όταν υπερεκφράζεται η Cav-1 , τότε υπερεκφράζεται και η MMP-13 (Yeh et.al, 2009). Στη παρούσα διπλωματική, αποσιωπώντας την Cav-1, παρατηρήθηκε μείωση της MMP-13, επιβεβαιώνοντας αντιστρόφως τα αποτελέσματα του Yeh και των συνεργατών του, και ενισχύοντας την άποψη πως η έκφραση της Cav-1 επηρεάζει άμεσα την έκφραση της MMP-13. Πιθανότατα μέσω της μείωσης της MMP-13 που έχει δειχθεί πως διασπά την αγκρεκάνη, να οδηγούμαστε και σε αύξηση της αγκρεκάνης (όταν αποσιωπούμε την έκφραση της).

Τέλος, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα RUNX-2 μετά από αποσιώπηση του μέσω siRNA. Ο μεταγραφικός, αυτός, παράγοντας, έχει ήδη συσχετισθεί με την MMP-13 και σύμφωνα με τον Wong και τους συνεργάτες του , ρυθμίζει την MMP-13 ανοδικά (Wong M et.al,, 2003). Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί ουσιαστικά και με το γεγονός πως ο RUNX-2 ενέχεται στην παθογένεια της ΟΑ προκαλώντας την υπερτροφία των χονδροκυττάρων και την καταστροφή της εξωκυττάριας ουσίας (Kamekura et.al, 2006), Αν και θα περιμέναμε να δούμε την μείωση του, παρατηρήθηκε αύξηση. Δεδομένου όμως ότι η τιμή p ($p=0.386>0.005$) απέχει αρκετά από το να είναι στατιστικά σημαντική, το αποτέλεσμα αυτό, ίσως να οφείλεται στον μικρό αριθμό δειγμάτων που είχαμε στη διάθεσή μας.

Συμπερασματικά, η καβεολίνη-1 διαφαίνεται να παίζει ρόλο στη οστεοαρθρίτιδα και πιθανότατα να είναι μώριο-στόχος για μελλοντικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της νόσου. Φαίνεται πως επηρεάζει μόρια που, αποδεδειγμένα, είναι καίριας σημασίας για την εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου. Η περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της ίσως ανοίξει νέους και

εξαιρετικά ενδιαφέροντες ορίζοντες για την εύρεση μιας αποτελεσματικής
θεραπείας για την οστεοαρθρίτιδα.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aigner T, Fundel K, Saas J, et al. Large scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:3533–3544.

Aigner T, McKenna L, Zien A, Fan Z, Gebhard PM, Zimmer R. Gene expression profiling of serum- and interleukin-1 beta-stimulated primary human adult articular chondrocytes – a molecular analysis based on chondrocytes isolated from one donor. *Cytokine.* 2005;31:227–240.

Aigner T, Zien A, Gehrsitz A, Gebhard PM, McKenna L. Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2777–2789.

Andrianakos AA, Kontelis LK, Karamitsos DG et al. Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study. *J Rheumatol* 2006; 33: 2507–2513.

Bartholomew JN, Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53 - mediated pathway. *Cancer Res.* 2009 April1;69(7):2878-2886.

Bastiani M, Liu L, Hill MM, Jedrychowski MP, Nixon SJ, Lo HP, Abankwa D, Luetterforst R, Fernandez- Rojo M, Breen MR, Gygi SP, Vinten J, Walser PJ, North KN, Hancock JF, Pilch PF, Parton RG. MURC/ Cavin-4 and cavin family members from tissue- specific caveolar complexes. *J Cell Biol.* 2009 Jun29;185(7):1259-1273.

Bellamy, N.; Campbell, J.; Robinson, V.; Gee, T.; Bourne, R.; Wells, G. Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2006.

Blanco, F.J.; Guitian, R.; Vazquez-Martul, E.; de Toro, F.J.; Galdo, F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* **1998**, *41*, 284–289.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 1998 Jan 16;279(5349):349-352.

Bohensky J., Shapiro I.M., Leshinsky S., Watanabe H., Srinivas V. PIM-2 is an independent regulator of chondrocyte survival and autophagy in the epiphyseal growth plate. *J. Cell. Physiol.* 2007;213:246–251. doi: 10.1002/jcp.21117.

Brandl A, Hartmann A, Bechman V et.al: Oxidative stress induces senescence in chdrocytes. *J Orthop Res* 2011,29(7):1114-1120.

Brooks PM. 2006. The burden of musculoskeletal disease— a global perspective. *Clin Rheumatol* 25:778–781.

Buckland- Wright C. Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12 Suppl A:S10-9

Burgermeister, E., Liscovitch, M., Rocken, C., Schmid, R.M., Ebert, M.P., 2008. Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer Lett.* 268, 187–201.

Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V, Lóez- Otín C: Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene* 2002, 283:49-62.

Campisi J. the biology of replicative senescence. *Eur J Cancer.* 1997 Apr;33(5):703-709.

Charles J. Malemud and Ali Mobasheriv INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIN=ENCES Received: 29 October 2016; Accepted: 12 December 2016; Published: 20 December 2016.

Cho KA, Ryu SJ, Oh YS, Park JH, Lee JW, Kim HP, Kim KT, Jang IS, Park SC. Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin -1 status. *Biol Chem*. 2004 Oct 1;279(40):42270-42278.

Cho KA, Ryu SJ, Park JS, Jang IS, Ahn JS, Kim KT, et al. Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status. *J Biol Chem* 2003;278:27789–95.

Courts A, Gualillo O, Berenbaum F, et al. 2015. Metabolic stress-induced joint inflammation and osteoarthritis. *Osteo- arthriti Cartilage* 23:1955–1965.

Curtin WA, Reville WJ. Ultrastructural observations on fibril profiles in normal and degenerative human articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 1995;224e30.

Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Yudoh K. Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2006; 54:818–31.

Dávalos A, Fernández - Hernando C, Sowa G, Derakhshan B, Lin MI, Lee JY, Zhao H, Luo R, Colangelo C, Sessa WC. Quantitative proteomics of caveolin-1- regulated proteins: characterization of polymerase i and transcript release factor/ CAVIN- 1 in endothelial cells. *Mol Cell Proteomics*. 2010 Oct;9(10):2109-24.

De Seny, D.; Cobraiville, G.; Charlier, E.; Neuville, S.; Esser, N.; Malaise, D.; Malaise, O.; Calvo, F.Q.; Relic, B.; Malaise, M.G. Acute-phase serum amyloid a in osteoarthritis: Regulatory mechanism and proinflammatory properties. *PLoS ONE* **2013**,8, e66769.

Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF Jr: Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989, 84:678-685.

Den Hollander W, Ramos YF, Bos SD et al. Knee and hip articular cartilage have distinct epigenomic landscapes: implications for future cartilage regeneration approaches. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 2208–2212.

Dieppe PA, Lohmander LS: Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet* 2005,365(9463):965-973

Doegge KJ, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J. Biol. Chem.* 1991;266:894–902.

Drab M., Verkade P., Elger M., Kasper M., Lohn M., Lauterbach B., et al. . (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449–2452. 10.1126/science.1062688.

Engelman JA, Chu C, Lin A, et al: Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett* 428: 205-211, 1998. 2009

Escribá PV, Nicolson GL. Membrane structure and function: relevance of lipid and protein structures in cellular physiology, pathology and therapy. *Biotin Biophys Acta* 2014, Jun;1838(6):1449-1450.

Eyre DR, Woods JJ, Weis MA. The cartilage collagens and joint degeneration. *Br. J. Rheumatol.* 1991;30(Suppl. 17):10–15.

Fan X, Rahnert JA, Murphy TC, Nanes MS, Greenfield EM, Rubin J. Response to mechanical strain in an immortalized pre-osteoblast cell is dependent on ERK1/2. *J Cell Physiol* 2006;207:454e60.

Felson DT, Naimark A, Anderson J et al. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 914–918.

Fernandez-Tajes J, Soto-Hermida A, Vazquez-Mosquera ME et al. Genome-wide DNA methylation analysis of articular chondrocytes reveals a cluster of osteoarthritic patients. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 668–677.

Fonseca JE, Edwards JC, Blades S, Goulding NJ. Macrophage subpopulations in rheumatoid synovium: reduced CD163 expression in CD4+ T lymphocyte-rich microenvironments. *Arthritis Rheum* (2002) 46(5):1210–6.10.1002/art.10207.

Fosang AJ, Last K, Maciewicz RA. Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. Evidence that matrix metalloproteinase and aggrecanase activities can be independent. *J Clin Invest* 1996;98:2292e9.

Fosang AJ, Neame PJ, Hardingham TE, Murphy G, Hamilton JA: μ Cleavage of cartilage proteoglycan between G1 and G2 domains by stromelysins. *J Biol Chem* 1991, 266:15579- 15582.

Furthauer M, Lin W, Ang SL, Thisse B, Thisse C. Sef is a feed- back-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signal- ling. *Nat Cell Biol* 2002;4:170e4.

Galbiati F, Razani B, Lisanti MP. Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. *Trends Mol Med*. 2001a; 7:435–41. [PubMed: 11597517].

Gao, Tianyang et al. “Extracellular Vesicles and Autophagy in Osteoarthritis.” *BioMed Research International* 2016 (2016): 2428915. PMC. Web. 13 Sept. 2017.

Glenney JR. Tyrosine phosphorylation of a 22-kDA protein is correlated with trasformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem*. 1989 Dec 5;264(34):20163-6.

Glyn-Jones, S.; Palmer, A.J.; Agricola, R.; Price, A.J.; Vincent, T.L.; Weinans, H.; Carr, A.J. Osteoarthritis. *Lancet* **2015**, *386*, 376–387. .

Goldring MB, Goldring SR: Osteoarthritis. *Journal of cellular physiology* 2007, 213(3): 626-634.

Goldring MB, Marcu KB. Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis. *Trends Mol Med* 2012;18:109–18.

Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:471–8.

Goldring, M.B.; Goldring, S.R. Osteoarthritis. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *213*, 626–634.

Grazzio S, Balen D: [Obesity: risk factor and predictor of osteoarthritis]. *Lijecnicki vjesnik* 2009, 131 (1-2):22-26.

Guo D, Tan W, Wang F, et al. Proteomic analysis of human articular cartilage: identification of differentially expressed proteins in knee osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2008;75:439–444.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry . *J Gerontol.* 1956 Jul;11(3):298-300.

Haseeb A, Makki MS, Haqqi TM. Modulation of ten-eleven translocation 1 (TET1), Isocitrate Dehydrogenase (IDH) expression, alpha-Ketoglutarate (alpha-KG), and DNA hydroxymethylation levels by interleukin-1beta in primary human chondrocytes. *J Biol Chem* 2014; 289: 6877–6885.

Hashimoto S., Ochs R.L., Komiya S., Lotz M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1632–1638. doi: 10.1002/1529-0131(199809)41:9<1632::AID-ART14>3.0.CO;2-A.

Hawker GA, Stanaitis I. 2014. Osteoarthritis year in review 2014: clinical. *Osteoarthritis Cartilage* 22:1953–1957.

Hayer A, Stoeber M, Bissig C, Helenius A. Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large cave-in and cabin complexes. *Traffic.* 2010 Mar;11(3):361-382.

Heraud, F.; Heraud, A.; Harmand, M.F. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* **2000**, *59*, 959–965.

Hinegård D, Lorenzo P, Sanxe T: Matrix glycoprotein, proteoglycans, and cartilage. In *Kelly's Textbook of Rheumatology*. Edited by S. Ruddy, Harris ED Jr, Sledge CB. Philadelphia: WB Saunders Company; 2001:41-53.

Hunziker EB, Quinn TM, Hauselmann HJ. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10:564–572.

Iliopoulos D, Malizos KN, Oikonomou P, Tsezou A. Integrative microRNA and proteomic approaches to identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS ONE*. 2008;3:e3740.

Jagannadham MV, Sharadadevi A, Nagaraj R. Effects of deleting a tripeptide sequence observed in muscular dystrophy patients on the conformation of synthetic peptides corresponding to the scaffolding domain of caveolin-3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Oct 25;298(2):203-206

Jmeian Y, El Rassi Z. Micro-high-performance liquid chromatography platform for the depletion of high-abundance proteins and subsequent on-line concentration/capturing of medium and low-abundance proteins from serum. Application to profiling of protein expression in healthy and osteoarthritis sera by 2-D gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2008;29:2801–2811.

Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, et al. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum* 2006;54: 2462-2470.

Kamekura, S., Kawasaki, Y., Hoshi, K., Shimoaka, T., Chikuda, H., Maruyama, Z. et al. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 2462–2470

Karsdal, M.A.; Michaelis, M.; Ladel, C.; Siebuhr, A.S.; Bihlet, A.R.; Andersen, J.R.; Guehring, H.; Christiansen, C.; Bay-Jensen, A.C.; Kraus, V.B. Disease-modifying

treatments for osteoarthritis (DMOADs) of the knee and hip: Lessons learned from failures and opportunities for the future. *Osteoarthr. Cartil.* **2016**, *24*, 2013–2021.

Kevorkian L, Young DA, Darrah C, et al. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum.* 2004;*50*:131–141.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich sl, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994 Dec23;*266*(5193):2011-2015.

Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, et al. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996;*271*:1544–50.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997;*89*:755e64.

Komori T. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res.* 2013;*352*:191–198. doi: 10.1007/s00441-012-1546-x.

Komori T. Glucocorticoid signaling and bone biology. *Horm. Metab. Res.* 2016;*48*:755–763. doi: 10.1055/s-0042-110571.

Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by *Runx2*. *Cell Tissue Res.* 2010;*339*:189–195. doi: 10.1007/s00441-009-0832-8.

Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p.53 stability by Mdm2. *Nature* 1997 May 15;*387* (6630):299-303.

Kuhn K., D’Lima D.D., Hashimoto S., Lotz M. Cell death in cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* 2004;*12*:1–16. doi: 10.1016/j.joca.2003.09.015.

Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, Simons K. VIP21, a21-kD membrane protein is an integral component of trans - Golgi - network - derived transport vesicles. *J Cell Biol.* 1992 Sep;118(5):1003-14.

Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG: Estimate of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis and rheumatism* 2008, 58(1):26-35.

Lee JH, Fitzgerald JB, Dimicco MA, Grodzinsky AJ. Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. *Arthritis Rheum.* 2005;52:2386–2395.

Li J, Pei M. Cell Senescence: A Challenge in Cartilage Engineering and Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2012; 18 (4): 270–87.

Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share common membrane - anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto - activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 1996 Nov 15;271(46):29182-19190.

Li Y, Xiao W, Luo W, Zeng C, Deng Z, Ren W, et al. Alterations of amino acid metabolism in osteoarthritis: its implications for nutrition and health. *Amino Acids* (2016) 48(4):907–14.10.1007/s00726-015-2168-x
Ugle T, Geurts J. What drives osteoarthritis? – synovial versus subchondral bone pathology. *Rheumatology (Oxford)* (2016).10.1093/rheumatology/kew389.

Li Y-s, Luo W, Zhu S-a and Lei G-h (2017). T cells in Osteoarthritis: Alteration and Beyond. *Front. Immunol.* 8:356. doi: 10.3389/fimmu.2017.00356.

Lin, Y.C., Chen, L.H., Varadharajan, T., Tsai, M.J., Chia, Y.C., Yuan, T.C., Sung, P.J., Weng, C.F., 2014. Resveratrol inhibits glucose-induced migration of vascular smooth muscle cells mediated by focal adhesion kinase. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 1389–1401.

Lindblad S, Hedfors E. Arthroscopic and immunohistologic characterization of knee joint synovitis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* (1987) 30(10):1081–8.10.1002/art.1780301001

Liu-Bryan R., Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2015;11:35–44. doi: 10.1038/nrrheum.2014.162.

Loeser RF. Aging and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23: 492–496.

Loeser RF: Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis and Rheumatism* 2006,54(5):1357-1360.

Lohmander LS, Neame PJ, Sandy JD: The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1993, 36:1214- 1222.

Loughlin J, Reynard LN. Osteoarthritis: epigenetics of articular cartilage in knee and hip OA. *Nat Rev Rheumatol* 2015;11:6–7.

M.B.Goldring, "Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases," *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, vol. 20, no. 5, pp. 1003–1025, 2006.

Maier B, Gluba W, Bernier B, Turner T, Mohammad K, Gruise T, Sutherland A, Thorner M, Scrable H. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p.53. *Genes Dev.* 2004 Feb1;18(3):306-319.

Marcu KB, Otero M, Olivotto E, et al. NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets* 2010;11:599–613.

Martin J A, Buckwalter J A. Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001; 56 (4): B172–B9.

Matveev S, Li X, Everson W, Smart EJ. The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 49:237–50.

McMahon KA, Zajicek H, Li WP, Peyton MJ, Minna JD, Hernandez VJ, Luby-Phelps K, Anderson RG. SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *EMBO J.* 2009 April 22;28(8):1001-1015.

Menkes CJ, Lane NE. Are osteophytes good or bad? *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12 Suppl A:S53-54.

Mistry D., Oue Y., Chambers M.G., Kayser M.V., Mason R.M. Chondrocyte death during murine osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 2004;12:131–141. doi: 10.1016/j.joca.2003.10.006.

Murata T., Lin M. I., Huang Y., Yu J., Bauer P. M., Giordano F. J., et al. (2007). Reexpression of caveolin-1 in endothelium rescues the vascular, cardiac, and pulmonary defects in global caveolin-1 knockout mice. *J. Exp. Med.* 204, 2373–2382. 10.1084/jem.20062340.

Nagase, H., Visse, R., Murphy, G., 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69, 562–573.

Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med* 2011; 208: 417–420.

Naito S, Shiomi T, Okada A, Kimura T, Chijiwa M, Fujita Y, et al. Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage. *Pathol Int* 2007;57:703e11.

Okada Y: Proteinase and matrix degradation. In *Kelly's Text- book of Rheumatology*. Edited by Ruddy S, Harris ED Jr, Sledge CB. Philadelphia: WB Saunders Company; 2001:55-72

Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE and Lisanti MP: Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing 'preassembled signaling complexes' at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273: 5419-5422, 1998.

Park D. S., Woodman S. E., Schubert W., Cohen A. W., Frank P. G., Chandra M., et al. . (2002). Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype. *Am. J. Pathol.* 160, 2207–2217. 10.1016/S0002-9440(10)61168-6.

Park JS, Kim HY, Kim HW, Chae GN, Oh HT, Park JY, Shim H, Seo M, Shin EY, Kim EG, Park SC, Kwak SJ. Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells. *Mech Ageing Dev.* 2005 May;126(5):551-559.

Pelletier JP, Martel- Pelletier J, Abramson SB: Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis and Rheumatism* 2001, 44(6):1237-1247.

Ponchel F, Burska AN, Hensor EM, Raja R, Campbell M, Emery P, et al. Changes in peripheral blood immune cell composition in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* (2015) 23(11):1870–8.10.1016/j.joca.2015.06.018.

Poole AR GF, Abramson SB.: Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management 4th edition. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins 2007:27-49.

Portal-Nunez, S.; Esbrit, P.; Alcaraz, M.J.; Largo, R. Oxidative stress, autophagy, epigenetic changes and regulation by miRNAs as potential therapeutic targets in osteoarthritis. *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *108*, 1–10.

Quest A. F., Leyton L., Párraga M. (2004). Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem. Cell Biol.* 82, 129–144. 10.1139/o03-071.

Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Colin Orthop Relat Res.* 1986 Dec;(213):34-40.

Razani B., Combs T. P., Wang X. B., Frank P. G., Park D. S., Russell R. G., et al. . (2002). Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J. Biol. Chem.* 277, 8635–8647.

Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, et al. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1996;97:2011–19.

Roach H.I., Aigner T., Kouri J.B. Chondroptosis:A variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis*.2004;9:265-277.doi:10.1023/B:APPT.0000025803.17498.26.

Rollin R, Marco F, Jover JA, Garcia-Asenjo JA, Rodriguez L, Lopez-Duran L, et al. Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Rheumatol Int* (2008) 28(8):757–64.10.1007/s00296-008-0518-7.

Sakkas LI, Platsoucas CD. The role of T cells in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* (2007) 56(2):409–24.10.1002/art.22369.

Sandel LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001,3(2):107-113.

Sandy JD, Flannery CR, Neame PJ, Lohmander LS: The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373–Ala 374 bond of the interglobular domain. *J Clin Invest* 1992, 89:1512-1516.

Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Identification, sequence and expression of caveolin - 2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Jan9;93(1): 131-135

Selvamurugan, N., Jefcoat, S.C., Kwok, S., Kowalewski, R., Tamasi, J.A., and Partridge, N.C. Overexpression of Runx2 directed by the matrix metalloproteinase-13 promoter containing the AP-1 and Runx/RD/Cbfa sites alters bone remodeling in vivo. *J Cell Biochem.* 2006; 99: 545–557.

Sharif, M.; Whitehouse, A.; Sharman, P.; Perry, M.; Adams, M. Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3. *Arthritis Rheum.* **2004**, *50*, 507–515.

Sledge CB. Structure, development, and function of joints. *Orthop. Clin. North Am.* 1975;6:619–628.

Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Howell A, Pestell RG, Pavlides S, Lisanti MP. Caveolin-1 and cancer metabolism in the tumor microenvironment: markers, models, and mechanisms. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:423–67.

Sowa G, Caveolae, Caveolins, Cavins, and endothelial cell function: new insights. *Front Physiol.* 2012 Jan6;2:120

Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A., Goldberg, G.I., 1995. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase: isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 270, 5331–5338.

Sun C, Wang N, Huang J, Xin J, Peng F, Ren Y, Zhang S, Miao J. Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C prevents bone marrow stromal cell senescence in vitro. *J Cell Biochem.* 2009 Oct 1;108(2):519-528.

Suri P, Morgenroth DC, Hunter DJ: Epidemiology of osteoarthritis and associated comorbidities. *Pm R* 2012, 4 (5 Suppl):S10-19.

T. Tetsunaga, K. Nishida, T. Furumatsu, K. Naruse, S. Hirohata, A. Yoshida, T. Saito, T. Ozaki. Regulation of mechanical stress-induced MMP-13 and ADAMTS-5 expression

by RUNX-2 transcriptional factor in SW1353 chondrocyte-like cells. *Osteoarthritis and Cartilage*. Feb 2011(19);222–232.

Tang BL: ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol* 2001, 33:33-44.

Tanne, Y., Tanimoto, K., Tanaka, N., Ueki, M., Lin, Y.Y., Ohkuma, S. et al. Expression and activity of Runx2 mediated by hyaluronan during chondrocyte differentiation. *Arch Oral Biol*. 2008; 53: 478–487.

Taylor SE, Li YH, Wong WH et al. Genome-wide mapping of DNA hydroxymethylation in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67: 2129–2140.

Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE: Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 2001, 44:585-594.

Tetsunaga T, Nishida K, Furumatsu T, Naruse K, Hirohata S, Yoshida A, et al. Regulation of mechanical stress-induced MMP-13 and ADAMTS-5 expression by RUNX-2 transcriptional factor in SW1353 chondrocyte-like cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2011;19:222e32.

Thirunavukkarasu K, Pei Y, Wei T. Characterization of the human ADAMTS-5 (aggrecanase-2) gene promoter. *Mol Biol Rep* 2007;34:225e31.

Thirunavukkarasu, K., Pei, Y., and Wei, T. Characterization of the human ADAMTS-5 (aggrecanase-2) gene promoter. *Mol Biol Rep*. 2007; 34: 225–231.

Thirunavukkarasu, K., Pei, Y., Moore, T.L., Wang, H., Yu, X.P., Geiser, A.G. et al. Regulation of the human ADAMTS-4 promoter by transcription factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 345: 197–204.

Thiyagarajan, V., Lin, S.H., Chia, Y.C., Weng, C.F., 2013. A novel inhibitor, 16-hydroxy-cleroda-3,13-dien-16,15-olide, blocks the autophosphorylation site of focal adhesion kinase (Y397) by molecular docking. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4091–4101.

Todd Allen R., Robertson C.M., Harwood F.L., Sasho T., Williams S.K., Pomerleau A.C., Amiel D. Characterization of mature vs. aged rabbit articular cartilage: Analysis of cell density, apoptosis-related gene expression and mechanisms controlling chondrocyte apoptosis. *Osteoarthr. Cartil.* 2004;12:917–923. doi: 10.1016/j.joca.2004.08.003.

Vaughan-Thomas A, Young RD, Phillips AC, Duance VC. Characterization of type XI collagen-glycosaminoglycan interactions. *J. Biol. Chem.* 2001;276:5303–5309.

Vincourt JB, Vignaud JM, Lionneton F, et al. Increased expression of matrilin-3 not only in osteoarthritic articular cartilage but also in cartilage-forming tumors, and down-regulation of SOX9 via epidermal growth factor domain 1-dependent signalling. *Arthritis Rheum.* 2008;58:2798–2808.

Vinten J, Voldstedlund M, Clausen H, Christiansen K, Carlsen J, Trandum - Jensen J. A 60- kDa protein abundant in adipocyte caveolae. *Cell Tissue Res.* 2001 Jul;305(1):99-106.

Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, Galbiati F. Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol Biol Cell.* 2002 Jul;13(7):2502-2517.

Watanabe M, Yang G, Cao G, Tahir SA, Naruishi K, Tabata K, Fattah EA, Rajagopalan K, Timme TL, Park S, Kurosaka S, Edamura K, Tanimoto R, Demayo FJ, Goltsov AA, Thompson TC. Functional analysis of secreted caveolin-1 in mouse models of prostate cancer progression. *Mol Cancer Res.* 2009; 7:1446–55.

Way M, Parton RG. M-caveolin, a muscle - specific caveolin - related protein. *FEBS Lett.* 1995 Nov 27;376(1-2):108-12.

WHO: The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. 2003.191.

Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D: The role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators Inflamm* 2014, 2014:561459.

Wong M, Siegrist M, Goodwin K. Cyclic tensile strain and cyclic hydrostatic pressure differentially regulate expression of hypertrophic markers in primary chondrocytes. *Bone* 2003;33: 685e93.

Yeh, D., Chen, C., Sun, M.Z., Shao, S., Hao, L., Song, Y., Gong, L., Hu, J., Wang, Q., 2009. Caveolin-1 is an important factor for the metastasis and proliferation of human small cell lung cancer NCI-H446 cell. *Anat. Rec.* 292, 1584–1592.

Yi S.-L., Liu X.-J., Zhong J.-Q., Zhang Y. (2014). Role of caveolin-1 in atrial fibrillation as an anti-fibrotic signaling molecule in human atrial fibroblasts. *PLoS ONE* 9:e85144. 10.1371/journal.pone.0085144.

Yudoh K, Nguyen VT, Nakamura H et al.: Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocytes telomere instability and down regulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* 2005,7(2):R380-391

Zeddou, M.; Relic, B.; Malaise, O.; Charlier, E.; Desoroux, A.; Beguin, Y.; de Seny, D.; Malaise, M.G. Differential signalling through ALK-1 and ALK-5 regulates leptin expression in mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2012, 21, 1948–1955.

Zhang, W.; Doherty, M.; Leeb, B.F.; Alekseeva, L.; Arden, N.K.; Bijlsma, J.W.; Dincer, F.; Dziedzic, K.; Hauselmann, H.J.; Kaklamanis, P.; et al. EULAR evidence-based recommendations for the diagnosis of hand osteoarthritis: Report of a task force of ESCISIT. *Ann. Rheum. Dis.* 2009, 68, 8–17.

