

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Οστεοαρθρίτιδα και επιγενετική

Η οστεοαρθρίτιδα είναι η πιο συχνή χρόνια αρθροπάθεια και μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ποιότητα ζωής. Η αιτιολογία της είναι αποτέλεσμα συνδυασμού γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Οι μελέτες συσχέτισης σάρωσης του γονιδιώματος έχουν επιτρέψει την ταυτοποίηση πολλών γονιδιακών τόπων που συσχετίζονται με την οστεοαρθρίτιδα, αλλά δεν έχουν κατορθώσει να εξηγήσουν το σύνολο της κληρονομικότητας και της γενετικής συνιστώσας της αιτιολογίας της. Τα τελευταία έτη δημοσιεύεται διαρκώς αυξανόμενος αριθμός μελετών για τις επιγενετικές μεταβολές στη νόσο αυτή, οι οποίες ίσως ευθύνονται για ένα μεγάλο μέρος της κληρονομικότητάς της. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, την έκφραση των microRNAs και την τροποποίηση των ιστονών. Γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας παρουσιάζουν μεταβολές στη μεθυλίωσή τους, με αποτέλεσμα μεταβολές και στην έκφρασή τους. Μελέτες σάρωσης της μεθυλίωσης του γονιδιώματος έχουν ταυτοποιήσει πολλούς γενετικούς τόπους που παρουσιάζουν μεταβολή στη μεθυλίωσή τους στη νόσο. Επί πλέον, η ακετυλίωση και η μεθυλίωση των ιστονών είναι διαταραγμένη στην οστεοαρθρίτιδα, με αποτέλεσμα και πάλι τη μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη της νόσου. Ήδη μελετάται η αποτελεσματικότητα των αναστολέων των αποακετυλασών των ιστονών στη θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας. Από την άλλη πλευρά, πλήθος microRNAs παρουσιάζουν μεταβολή στην έκφρασή τους στην οστεοαρθρίτιδα, με αποτέλεσμα τη διαφορετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Συμπερασματικά, τα παραπάνω ευρήματα έχουν αναδείξει τη συμμετοχή των επιγενετικών μηχανισμών στην παθογένεση της νόσου και έχουν δημιουργήσει νέες προοπτικές για τη διαλεύκανση των παθογενετικών μηχανισμών, για τη διαγνωστική προσέγγιση και για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες ώστε να αναδείξουν σε μεγαλύτερο εύρος τον μηχανισμό της επιγενετικής στην οστεοαρθρίτιδα και να βοηθήσουν στην κατανόηση αυτού του περίπλοκου φαινομένου.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οστεοαρθρίτιδα είναι η πιο συχνή χρόνια αρθροπάθεια και χαρακτηρίζεται από σταδιακή εκφύλιση και απώλεια του αρθρικού χόνδρου, με συνοδό παραγωγή νέου οστού, αλλοιώσεις του υποχόνδριου οστού και φλεγμονή του αρθρικού υμένα. Κλινικά εκδηλώνεται με πόνο στην προσβληθείσα άρθρωση, δυσκαμψία και σε πιο σοβαρές περιπτώσεις παραμόρφωση της άρθρωσης και ανικανότητα, με αποτέλεσμα επιδείνωση της ποιότητας ζωής. Παθολογοανατομικά, κύριο εύρημα είναι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ αναβολισμού και καταβολισμού των συστατικών της εξωκυττάριας θεμελίας ουσίας του αρθρικού χόνδρου. Όσον αφορά στην αιτιοπαθογένεση της πάθησης, η οστεοαρθρίτιδα είναι το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Η ηλικία,

το φύλο, η παχυσαρκία, ο προηγούμενος τραυματισμός της άρθρωσης και οι γενετικοί παράγοντες συνιστούν τους κύριους παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση της πάθησης. Ωστόσο, η αιτιολογία της δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως.^{1,2}

Στο γενετικό σκέλος της παθογένειας της οστεοαρθρίτιδας συνεισφέρουν πολλά διαφορετικά γονίδια, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολος ο χαρακτηρισμός του γενετικού υπόβαθρου της. Οι μελέτες συσχέτισης σάρωσης του γονιδιώματος (genome wide association studies, GWAS), με σημαντικότερη τη μελέτη arcOGEN,³ έχουν επιτρέψει την ταυτοποίηση πολλών γονιδιακών τόπων που συσχετίζονται με την οστεοαρθρίτιδα, αλλά δεν έχουν κατορθώσει να εξηγήσουν το σύνολο της κληρονομικότητάς της. Ο καθορισμός της επίδρασης των επιγενετικών μεταβολών

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2016, 33(6):727-738
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2016, 33(6):727-738

Π.Κ. Παναγόπουλος,¹
Γ.Ι. Λάμπρου^{1,2}

¹ Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα
«Μεταβολικά νοσήματα των οστών»,
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Αθήνα
² Α΄ Παιδιατρική Κλινική, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο,
Αθήνα

Osteoarthritis and epigenetics

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

Οστεοαρθρίτιδα
Μεθυλίωση DNA
microRNA
Τροποποίηση ιστονών

Υποβλήθηκε 1.2.2016
Εγκρίθηκε 17.2.2016

στην οστεοαρθρίτιδα ίσως βοηθήσει στην επεξήγηση του συνόλου της κληρονομικότητας της πάθησης. Ο όρος «επιγενετική» αναφέρεται στη μελέτη των αναστρέψιμων, κληρονομούμενων μηχανισμών που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση χωρίς να μεταβάλλουν την αλληλουχία του DNA.⁴ Οι κυριότεροι επιγενετικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, την τροποποίηση των ιστονών και την έκφραση microRNAs (miRNAs).⁵⁻⁷

Η παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση εξετάζει τους κυριότερους επιγενετικούς μηχανισμούς και παρουσιάζει τα πρόσφατα ευρήματα από τις επιγενετικές μελέτες στην οστεοαρθρίτιδα. Προς τον σκοπό αυτόν, αναζητήσαμε τη σχετική βιβλιογραφία στη βιβλιογραφική βάση δεδομένων Medline, με τη χρήση του εργαλείου PubMed μέχρι τις 31 Δεκεμβρίου 2015. Για την αναζήτησή μας χρησιμοποιήσαμε λέξεις-κλειδιά, όπως: “osteoarthritis”, “epigenetics”, “miRNA”, “histones”. Οι λέξεις-κλειδιά έδωσαν 56 άρθρα με τον συνδυασμό των λέξεων “osteoarthritis” και “epigenetics”, 156 άρθρα με τον συνδυασμό των λέξεων “osteoarthritis” και “miRNA”, 86 άρθρα με τον συνδυασμό των λέξεων “osteoarthritis” και “histones” και, τέλος, 11 άρθρα με τον συνδυασμό των λέξεων “osteoarthritis”, “miRNA” και “epigenetics”. Τα άρθρα επιλέχθηκαν από τον πρώτο κριτή (ΠΠ). Ένας δεύτερος κριτής (ΓΙΑ) μελέτησε τα προτεινόμενα άρθρα από τον πρώτο κριτή (ΠΠ) και σε περίπτωση διαφωνίας, έγινε κρίση από τρίτο κριτή. Η βιβλιογραφία που επιλέχθηκε αφορούσε σε άρθρα που ήταν γραμμένα στην αγγλική γλώσσα και σχετικά με το θέμα της επιγενετικής στην οστεοαρθρίτιδα. Τα άρθρα, που μελετήθηκαν αρχικά, εξετάστηκαν για την επιλεξιμότητά τους στην παρούσα μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν άρθρα με άμεση αναφορά στην οστεοαρθρίτιδα και στην επιγενετική τροποποίηση και ακολούθως τα άρθρα που αναφέρονταν στον ρόλο των miRNAs στην οστεοαρθρίτιδα. Δεν επιλέχθηκαν άρθρα τα οποία αναφέρονταν στους παραπάνω μηχανισμούς σε συγκεκριμένα νοσήματα.

Τα τελευταία έτη, υπάρχει μια ραγδαία αύξηση της γνώσης για τον ρόλο των επιγενετικών μηχανισμών στην κυτταρική φυσιολογία και παθοφυσιολογία. Ως εκ τούτου, γίνεται εμφανές ότι η μελέτη της οστεοαρθρίτιδας τόσο από την κλινική όσο και από τη μοριακή οπτική, και επί προκειμένων την επιγενετική, είναι απόλυτα αναγκαία για την κατανόηση του νοσήματος, της πρόγνωσης, της διάγνωσης, αλλά και της θεραπείας του.

2. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Ο περισσότερο μελετημένος επιγενετικός μηχανισμός είναι η μεθυλίωση του DNA, κατά την οποία μια μεθυλι-

κή ομάδα προστίθεται στο πέμπτο άτομο άνθρακα ενός νουκλεοτιδίου κυτοσίνης (5-mC). Η εν λόγω διαδικασία καταλύεται από τις μεθυλοτρανσφεράσες του DNA (DNA methyltransferases, DNMTs) DNMT1, DNMT3A και 3B. Η μεθυλίωση συμβαίνει σχεδόν αποκλειστικά σε δινουκλεοτίδια κυτοσίνης-γουανίνης (CpG), είναι σταθερός δείκτης και διατηρείται κατά τη μιτωτική διαίρεση. Η μεθυλίωση του DNA διαδραματίζει ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Έτσι, η μεθυλίωση του υποκινητή ενός γονιδίου οδηγεί σε μείωση της έκφρασής του, καθώς αναστέλλει την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή. Η μεθυλίωση του σώματος του γονιδίου έχει ποικίλα αποτελέσματα στη γονιδιακή έκφραση, ενώ η μεθυλίωση των περιοχών του DNA μεταξύ των γονιδίων μπορεί να επηρεάσει τη γονιδιακή έκφραση μέσω της ρύθμισης της πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στους ενισχυτές των γονιδίων.

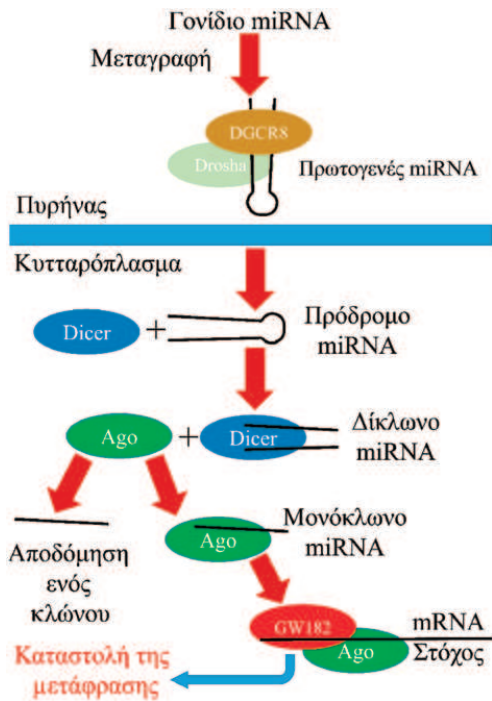
Περιοχές του DNA πλούσιες σε δινουκλεοτίδια CpG ονομάζονται νησίδια CpG (CpG islands) και ανευρίσκονται κοντά σε υποκινητές γονιδίων. Τα περιφερικά άκρα των νησιδίων CpG ονομάζονται ακτές CpG και είναι επιρρεπή στη μεθυλίωση, κατά τρόπο ιστο-εξαρτώμενο, με αποτέλεσμα αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση.⁵

3. MicroRNAs

Ένας άλλος επιγενετικός μηχανισμός είναι η παραγωγή των microRNAs (miRNAs). Τα miRNAs είναι μικρά, φυσικά μόρια RNA, τα οποία δεν κωδικοποιούν πεπτιδία. Αποτελούνται από 19–25 νουκλεοτίδια και προέρχονται από τη διάσπαση πρόδρομων μορίων miRNA, με δομή φουρκέτας και μήκος 70–100 νουκλεοτιδίων. Στα ζώα και στον άνθρωπο, τα μονόκλωνα miRNAs προσδένονται, μέσω μερικής ομολογίας, με μόρια mRNA στόχους και παρεμποδίζουν τη μετάφρασή τους ή, λιγότερο συχνά, οδηγούν στην αποδόμησή τους (εικ. 1).⁸ Με αυτόν τον τρόπο τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση.^{6,8}

4. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ

Οι ιστόνες είναι πρωτεΐνες που συνδέονται με το ευκαρυωτικό DNA για τον σχηματισμό νουκλεοσωμάτων, με σκοπό τη μείωση του όγκου που καταλαμβάνει το DNA. Οι ιστόνες τροποποιούνται μέσω ακετυλίωσης, μεθυλίωσης, φωσφορυλίωσης, σιμουλίωσης, σύνδεσης με ουμπικουΐτίνη ή με συνδυασμό των παραπάνω. Έτσι, ρυθμίζεται η μεταγραφή του DNA, καθώς μεταβάλλεται η διαμόρφωση της χρωματίνης, η έκθεση των υποκινητών των γονιδίων σε μεταγραφικούς παράγοντες και η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA. Η ακετυλίωση των



Εικόνα 1. Η σύνθεση των miRNAs και η δράση τους. Το πρωτογενές miRNA μεταγράφεται από το αντίστοιχο γονίδιο. Στη συνέχεια, η ριβονουκλεάση Drosha και η πρωτεΐνη DGCR8 μετατρέπουν αυτό στο πρόδρομο miRNA. Το πρόδρομο miRNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα και μετατρέπεται σε ώριμο miRNA από τη ριβονουκλεάση Dicer. Ο ένας κλώνος του miRNA αποδομείται και ο άλλος φορτώνεται στην πρωτεΐνη Argonaute (Ago). Το miRNA συνδεδεμένο με τις πρωτεΐνες Ago και GW182 προσδένεται στον mRNA στόχο και καταστέλλει τη μετάφρασή του (από Miao et al, προσαρμοσμένο⁹).

ιστονών και η μεθυλίωση των καταλοίπων λυσίνης 4 και 36 της ιστόνης 3 (H3K4, H3K36) διευκολύνει την πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA και ενισχύει τη γονιδιακή έκφραση. Αντίθετα, η αποακετυλίωση των ιστονών μέσω των αποακετυλασών των ιστονών (histone deacetylases, HDACs) και η μεθυλίωση του καταλοίπου λυσίνης 27 της ιστόνης 3 (H3K27) οδηγεί σε καταστολή της γονιδιακής έκφρασης.⁷

5. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

5.1. Μελέτες της μεθυλίωσης γονιδίων στην οστεοαρθρίτιδα

5.1.1. MMPs. Η μεθυλίωση του DNA στην οστεοαρθρίτιδα έχει μελετηθεί τόσο σε επίπεδο συγκεκριμένων υποψήφιων γονιδίων όσο και σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος. Οι πρώτες τέτοιες μελέτες οι οποίες διεξήχθησαν αφορούσαν στη μεθυλίωση συγκεκριμένων γονιδίων που ήταν ήδη γνωστό ότι συμμετέχουν στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας. Σε πρόσφατη μελέτη διερευνήθηκε το

κατά πόσο η παθολογική έκφραση των μεταλλοπρωτεασών (matrix metalloproteinases, MMPs) MMP-3, MMP-9, MMP-13 και της ανκρεκανάσης ADAMTS-4 από τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σχετίζεται με μεταβολή στη μεθυλίωση του DNA.⁹ Τα ένζυμα MMP-3, MMP-9, MMP-13 και ADAMTS-4 συμμετέχουν στην αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας του αρθρικού χόνδρου στην οστεοαρθρίτιδα. Επίσης, στην ίδια μελέτη επιβεβαιώθηκε ότι τα χονδροκύτταρα από οστεοαρθρικό χόνδρο παράγουν τα παραπάνω αποδομητικά ένζυμα σε μεγαλύτερη ποσότητα σε σύγκριση με τα χονδροκύτταρα από φυσιολογικό χόνδρο.⁹ Διαπιστώθηκε επίσης ότι για κάθε ένα από τα γονίδια των αποδομητικών αυτών ενζύμων υπάρχει ένας τόπος CpG στον υποκινητή τους που είναι σημαντικά υπομεθυλιωμένοι στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Συμπεράναν λοιπόν ότι η υπομεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων *MMP3*, *MMP9*, *MMP13* και *ADAMTS4* ενδεχομένως είναι υπεύθυνη για την αυξημένη έκφρασή τους. Οι εν λόγω μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA μεταφέρονται από τα κύτταρα του χόνδρου στα θυγατρικά τους και πιθανότατα συμμετέχουν στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας.⁹

Ακολούθησαν άλλες 4 μελέτες, οι οποίες επιβεβαίωσαν με τη σειρά τους την υπομεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων *MMP3*, *MMP9*, *MMP13* και *ADAMTS4* και την αυξημένη έκφρασή τους στα χονδροκύτταρα των οστεοαρθρικών χόνδρων.¹⁰⁻¹³ Σε μια από αυτές, διαπιστώθηκε ότι η επώαση ανθρώπινων χονδροκυττάρων με 5-aza-dC (5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη), η οποία είναι αναστολέας των DNA μεθυλοτρανσφερασών, προκάλεσε την απομεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *MMP13* και την αύξηση της έκφρασής του.¹² Έτσι αποδείχθηκε ότι η υπομεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *MMP13* συνδέεται με τη μείωση της έκφρασής του στα χονδροκύτταρα. Στη συνέχεια, στην ίδια μελέτη φάνηκε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας CREB (cAMP response element-binding protein) προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου *MMP13*, στη θέση -110-bp CpG, η οποία απομεθυλιώνεται, και ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα.¹² Σε άλλη πρόσφατη μελέτη αποδείχθηκε ότι η απομεθυλίωση του τόπου -110-bp CpG προκαλεί την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *MMP13* στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα.¹³ Επίσης, διαπιστώθηκε ότι, από τους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση του *MMP13*, ο HIF-2α (hypoxia-inducible factor 2α) είναι αυτός που προσδένεται στη θέση -110-bp και ενεργοποιεί το γονίδιο. Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α είναι ένας καταβολικός παράγοντας και συμμετέχει στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου στην οστεοαρθρίτιδα, ενισχύοντας τη γονιδιακή έκφραση του *MMP13*. Μάλιστα, η μεθυλίωση της θέσης -110-bp παρεμποδίζει την πρόσδεση του HIF-2α και αναστέλλει

την έκφραση του *MMP13*. Από τις μελέτες αυτές φαίνεται να επιβεβαιώνεται η άποψη ότι η πρόσδεση του παράγοντα CREB στη θέση -110-bp καταδεικνύει τον πολύπλευρο ρόλο της συγκεκριμένης μεθυλίωσης της θέσης και ότι ο μεταγραφικός παράγοντας που προσδέεται εξαρτάται κάθε φορά από το μικροπεριβάλλον του χόνδρου.^{12,13}

5.1.2. IL-1B. Εκτός από τα γονίδια των μεταλλοπρωτεϊνών, έχει μελετηθεί και η μεθυλίωση του γονιδίου της κυτταροκίνης IL-1β. Η IL-1β είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας. Σε πρόσφατες αναφορές μελετήθηκε η μεθυλίωση και η έκφραση του γονιδίου *IL1B* σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Αρχικά, διαπιστώθηκε ότι φυσιολογικά το *IL1B* δεν εκφράζεται στα χονδροκύτταρα. Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι ο TNF-α, επίσης προφλεγμονώδης κυτταροκίνη, αλλά και η ίδια η IL-1β, προκαλούν υπομεθυλίωση του υποκινητή του *IL1B*, καθώς και ενεργοποίηση και έκφρασή του.¹⁴ Αντίστοιχα, έχει δειχθεί στα χονδροκύτταρα από οστεοαρθρικό χόνδρο ότι είναι υπομεθυλωμένος ο υποκινητής του *IL1B*, με αποτέλεσμα την έκφραση του γονιδίου και την παραγωγή IL-1β στον οστεοαρθρικό χόνδρο.¹³

5.1.3. SOX9. Σε συνέχεια αυτού του μηχανισμού, φάνηκε ότι ένας πιθανός ρυθμιστής της οστεοαρθρικής παθολογίας είναι η μεθυλίωση του γονιδίου *SOX9*. Ο μεταγραφικός παράγοντας *SOX-9* είναι ένας αναβολικός παράγοντας και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη χονδρογένεση, καθώς ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου IX, το οποίο είναι απαραίτητο συστατικό του αρθρικού χόνδρου. Ο υποκινητής του *SOX9* βρέθηκε υπερμεθυλωμένος στα χονδροκύτταρα από τον οστεοαρθρικό χόνδρο σε σύγκριση με αυτά από τον φυσιολογικό χόνδρο και η σχετική υπερμεθυλίωση συνοδευόταν από ελαττωμένη έκφραση του *SOX9*.¹⁵ Η επώαση των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων με αζακτιδίνη (*azacitidine*) (5-aza-2'-deoxycytidine ή 5-aza-dC) οδήγησε σε υπομεθυλίωση του υποκινητή του *SOX9* και σε αύξηση της έκφρασής του, σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα των φυσιολογικών χονδροκυττάρων, ενώ ακόμη διαπιστώθηκε ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *SOX9* εμποδίζει την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων NF-Υ (nuclear factor-Υ) και CREB (cAMP response element-binding protein), με αποτέλεσμα την ελάττωση της έκφρασης του γονιδίου.¹⁵

5.1.4. COL9A1. Ένας άλλος παράγοντας αφορά στην έκφραση του γονιδίου *COL9A1* στα χονδροκύτταρα του οστεοαρθρικού χόνδρου και στην επίδραση της μεθυλίωσής του. Το *COL9A1*, επίσης, κωδικοποιεί την α αλυσίδα του κολλαγόνου τύπου IX, το οποίο είναι απαραίτητο συστατικό του αρθρικού χόνδρου. Διαπιστώθηκε ότι το *COL9A1*

υποεκφράζεται σημαντικά στον οστεοαρθρικό χόνδρο σε σχέση με τον φυσιολογικό. Μάλιστα, ο υποκινητής του γονιδίου βρέθηκε υπερμεθυλωμένος στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Όπως και στην περίπτωση της ρύθμισης της μεθυλίωσης του *SOX-2* από την *azacitidine*, η επώαση των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων με 5-aza-dC οδήγησε σε απομεθυλίωση του υποκινητή του *COL9A1* και σε αύξηση της έκφρασής του.¹⁶ Επί πλέον, φάνηκε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας *SOX9* προσδέεται στον υποκινητή του *COL9A1* και ενισχύει την έκφρασή του. Μάλιστα, η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *COL9A1* εμποδίζει την πρόσδεση του *SOX9* και με αυτόν τον τρόπο μειώνει την έκφραση του γονιδίου.¹⁶ Σε άλλη πρόσφατη μελέτη, διερευνήθηκε η επίδραση της υποξίας στην έκφραση και στη μεθυλίωση των γονιδίων *COL9A1*, *IL1B* και *MMP13* σε χονδροκύτταρα τα οποία προέρχονταν από οστεοαρθρικό χόνδρο. Η υποξία έχει δειχθεί ότι ευνοεί την επιβίωση των χονδροκυττάρων σε κυτταροκαλλιέργειες, αλλά και την αναβολική τους δραστηριότητα και την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας.¹⁷ Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι η υποξία οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του *COL9A1* αλλά και του *IL1B*.¹⁷ Η συγκεκριμένη αύξηση της έκφρασης συνοδευόταν από αντίστοιχη υπομεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της υποξίας και της έκφρασης και της μεθυλίωσης του *MMP13*.¹⁷

5.1.5. SOD2. Από την άλλη πλευρά, ενδιαφέρον είχε η μελέτη της μεθυλίωσης και της έκφρασης του γονιδίου *SOD2* σε χονδροκύτταρα οστεοαρθρικού χόνδρου.¹⁸ Το *SOD2* κωδικοποιεί τη δισμουτάση 2 του υπεροξειδίου (superoxide dismutase 2, *SOD2*), ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για την αδρανοποίηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). Το οξειδωτικό stress και οι ROS συμμετέχουν στην παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας, καθώς προκαλούν αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας του αρθρικού χόνδρου και ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών. Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του *SOD2* ήταν σημαντικά μειωμένη στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά και ότι η μείωση αυτή συνοδευόταν από υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου. Μάλιστα, η μείωση του *SOD2* στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των ROS.¹⁸

5.1.6. iNOS. Εκτός από τις υπόλοιπες γνωστές δράσεις του γονιδίου της επαγωγίσιμης συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (inducible nitric oxide synthase, *iNOS*), όπως η κυτταρική σηματοδότηση, η έκκριση ινσουλίνης, η περίσταση κ.ά., φάνηκε ότι το γονίδιο αυτό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον οστεοαρθρικό χόνδρο, καθώς και στην επίδραση της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου και στην επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Στον

οστεοαρθρικό χόνδρο, προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, ιδίως η IL-1β, και το μηχανικό stress επάγουν την παραγωγή της iNOS στα χονδροκύτταρα.¹⁹ Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ διαμεσολαβεί στην ενεργοποίηση του γονιδίου της iNOS από τις κυτταροκίνες. Το NO που παράγεται με τη δράση της iNOS συμβάλλει στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου της iNOS ήταν αυξημένη στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά, αλλά η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου ήταν η ίδια. Στη συνέχεια όμως οι ερευνητές εξέτασαν τη θέση πρόσδεσης του NF-κΒ και διαπίστωσαν ότι δύο τόποι CpG είναι απομεθυλιωμένοι στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την πρόσδεση του NF-κΒ και την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της iNOS. Μάλιστα, κατέδειξαν ότι η μεθυλίωση αυτών των δύο τόπων παρεμποδίζει την πρόσδεση του NF-κΒ και την έκφραση του γονιδίου.¹⁹

5.1.7. DIO2. Επίσης, ενδιαφέρον φάνηκε να υπάρχει στο γονίδιο της αποϊωδινάσης της ιωδοθυρονίνης τύπου 2 (deiodinase iodothyronine type 2, DIO2) και στο πώς αυτό επηρεάζει τον κίνδυνο εμφάνισης οστεοαρθρίτιδας. Φυσιολογικά, στα χονδροκύτταρα της αυξητικής πλάκας των οστών η DIO2 μετατρέπει ενδοκυττάρια τη θυροξίνη (T4) σε τριιωδοθυρονίνη (T3).²⁰ Η T3 στη συνέχεια προκαλεί υπερτροφία των χονδροκυττάρων, αποδόμηση της χόνδρινης μεσοκυττάριας ουσίας, επιμετάλλωση του χόνδρου και, τελικά, σχηματισμό οστού. Αυτές οι μεταβολές ομοιάζουν με τις βλάβες του χόνδρου στην οστεοαρθρίτιδα, με αποτέλεσμα να έχει προταθεί ότι με την αύξηση της ηλικίας επανενεργοποιούνται τα γονίδια που συμμετέχουν στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση και συμβάλλουν στην εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας.²⁰ Πράγματι, σε παλαιότερη μελέτη έχει δειχθεί ότι το αλληλόμορφο του γονιδίου DIO2 με τον πολυμορφισμό rs225014 αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης οστεοαρθρίτιδας.²¹ Ως εκ τούτου, φάνηκε ότι το DIO2 υπερεκφράζεται στα χονδροκύτταρα του οστεοαρθρικού χόνδρου και ότι η θέση CpG-2031 του γονιδίου είναι μεθυλιωμένη στον οστεοαρθρικό χόνδρο, ενώ στον φυσιολογικό όχι.²⁰ Η απομεθυλίωση της εν λόγω θέσης με 5-aza-dC οδήγησε σε μείωση της γονιδιακής έκφρασης, καταδεικνύοντας ότι η μεθυλίωσή της είναι υπεύθυνη για την αύξηση της έκφρασης του DIO2 στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Μάλιστα, στους φορείς του αλληλόμορφου γονιδίου του DIO2 με τον πολυμορφισμό rs225014, η μεθυλίωση και η έκφραση του γονιδίου ήταν ακόμη πιο αυξημένες στον οστεοαρθρικό χόνδρο. Επιπρόσθετα, σε μοντέλο *in vitro* χονδρογένεσης διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση του DIO2 μείωνε την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας από τα χονδροκύτταρα και αύξανε την παραγωγή των αποδομητικών ενζύμων ADAMTS5 και MMP13.

Μάλιστα, η προσθήκη T3 ενίσχυε αυτό το αποτέλεσμα, ενώ η αναστολή της DIO2 με ιωπανοϊκό το αναιρούσε. Από τη συγκεκριμένη παρατήρηση προέκυψε ένας θεραπευτικός παράγοντας, αφού φάνηκε ότι η αναστολή της πρωτεΐνης DIO2 μπορεί να αποτελέσει δυνητικά μια νέα προσέγγιση για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας.²⁰

5.1.8. SOST. Τέλος, σε άλλη μελέτη, η οποία αφορούσε στον ρόλο του γονιδίου της σκληροστίνης SOST και την επίδραση της μεθυλίωσής του στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, φάνηκε ότι η σκληροστίνη, ένας ανταγωνιστής του Wnt μονοπατιού, έχει ενοχοποιηθεί ότι συμβάλλει στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας.²² Στη συγκεκριμένη μελέτη βρέθηκε ότι το γονίδιο SOST υπερεκφράζεται στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά και ότι αυτή η υπερέκφραση συνοδεύεται από υπομεθυλίωση του υποκινητή του. Μάλιστα, διαπιστώθηκε ότι η υπομεθυλίωση ευνοεί την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων SMAD-1/5/8 στον υποκινητή του γονιδίου και με αυτόν τον τρόπο την ενεργοποίησή του.²²

5.2. Μελέτες σάρωσης της μεθυλίωσης του γονιδιώματος στην οστεοαρθρίτιδα

Ενώ η αρχική προσέγγιση στη μελέτη της μεθυλίωσης του DNA στην οστεοαρθρίτιδα αφορούσε στη μελέτη της μεθυλίωσης συγκεκριμένων υποψηφίων γονιδίων, πρόσφατες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει μικροσυστοιχίες για τη μελέτη της μεθυλίωσης ολόκληρου του γονιδιώματος. Το 2013 μελετήθηκε για πρώτη φορά το προφίλ μεθυλίωσης του γονιδιώματος που παρασκευάστηκε από σπογγώδες οστό κεφαλής μηριαίου οστού ασθενών με οστεοαρθρίτιδα ισχίου, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε αρθροπλαστική. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αρθροπλαστική ισχίου λόγω οστεοπορωτικού κατάγματος ισχίου. Αναλύθηκε η μεθυλίωση >23.000 τόπων CpG και βρέθηκαν 241 τόποι CpG με σημαντική διαφορά στη μεθυλίωση μεταξύ των οστεοαρθρικών και των οστεοπορωτικών οστών. Πολλοί από αυτούς τους τόπους σχετιζόνταν με γονίδια που συμμετέχουν στην κυτταρική διαφοροποίηση και στη σκελετική εμβρυογένεση και με γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες. Τα αποτελέσματα αυτά υπέδειξαν προς την κατεύθυνση της εμπλοκής της μεθυλίωσης του DNA στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας.²³

Μια δεύτερη μελέτη συνέκρινε το προφίλ μεθυλίωσης του DNA ανθρώπινων χονδροκυττάρων ασθενών με οστεοαρθρίτιδα και υγιών μαρτύρων. Βρέθηκαν 91 τόποι με διαφορετική μεθυλίωση που διαχώριζαν τους ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα από τους υγιείς. Αυτοί αφορούσαν σε γονίδια που σχετιζόνταν με τη φλεγμονή, με μεταγραφικούς

παράγοντες, με τη φωσφορυλίωση και με τις MAP κινάσες. Επιπρόσθετα, βρέθηκε υποομάδα ασθενών με διαφορετικό προφίλ μεθυλίωσης από τους υπόλοιπους ασθενείς, η οποία χαρακτηριζόταν από αυξημένες φλεγμονώδεις διεργασίες.²⁴

Σε περαιτέρω έρευνες, έγινε σύγκριση του προφίλ μεθυλίωσης του DNA χονδροκυττάρων ασθενών με οστεοαρθρίτιδα ισχίου, ασθενών με οστεοαρθρίτιδα γόνατος και υγιών μαρτύρων. Μελετήθηκαν περίπου 480.000 τόποι CpG και βρέθηκαν 5.322 τόποι με διαφορετική μεθυλίωση μεταξύ οστεοαρθριτικών και υγιών χόνδρων ισχίου, υποδεικνύοντας τον ρόλο της μεθυλίωσης του DNA στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας. Επιπρόσθετα, βρέθηκαν 5.547 τόποι με διαφορετική μεθυλίωση μεταξύ οστεοαρθριτικών χόνδρων ισχίου και οστεοαρθριτικών χόνδρων γόνατος, υπονοώντας ότι υπάρχουν διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια που διαχωρίζουν την οστεοαρθρίτιδα του ισχίου από αυτή του γόνατος. Επιπρόσθετα, τα δείγματα από τα οστεοαρθρικά ισχία διαχωρίζονταν σε δύο ομάδες με διαφορετικό προφίλ μεθυλίωσης, κυρίως όσον αφορά στα γονίδια που εμπλέκονται στη φλεγμονή και στην ανοσιακή απάντηση. Το ίδιο συνέβαινε και με τα δείγματα από τα οστεοαρθρικά γόνατα. Τα εν λόγω ευρήματα υποδηλώνουν ότι η φλεγμονή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας και αυτό μπορεί να αξιοποιηθεί στη διάγνωση και στη θεραπεία της νόσου.²⁵

Διαφορά στο προφίλ μεθυλίωσης του DNA μεταξύ οστεοαρθριτικών χόνδρων ισχίου και οστεοαρθριτικών χόνδρων γόνατος διαπιστώθηκε και σε άλλες δύο μελέτες,^{1,26} όπου βρέθηκαν 357²⁶ και 67¹ περιοχές DNA με διαφορετική μεθυλίωση μεταξύ οστεοαρθρικού χόνδρου ισχίου και γόνατος, αντίστοιχα. Στις συγκεκριμένες μελέτες, υπήρχε ταύτιση στη διαπίστωση ότι οι περιοχές DNA οι οποίες παρουσιάζουν διαφορά στη μεθυλίωση είναι πλούσιες σε γονίδια που συμμετέχουν στη μορφογένεση και στην ανάπτυξη του σκελετικού συστήματος. Επόμενη μελέτη, όπου έγινε σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης και της μεθυλίωσης του DNA σε χονδροκύτταρα από διαβρωμένες και από διατηρημένες περιοχές οστεοαρθρικού χόνδρου, έδειξε παρόμοια αποτελέσματα. Βρέθηκαν 9.838 γονίδια που εκφράζονταν στα χονδροκύτταρα και η έκφραση των 2.324 από αυτά επηρεαζόταν από τη μεθυλίωση 3.748 διουκλεοτιδίων CpG. Στα χονδροκύτταρα από τις διαβρωμένες περιοχές των οστεοαρθρικών χόνδρων διαπιστώθηκε υπομεθυλίωση και υπερμεθυλίωση σε 62 και 25 διουκλεοτιδία CpG, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της έκφρασης 70 γονιδίων. Περαιτέρω ανάλυση των γονιδίων που ενεργοποιούνται έδειξε ότι πολλά από αυτά συμμετέχουν στη διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης.²⁷ Το ενδιαφέρον είναι ότι όλες οι παραπάνω μελέτες φάνηκε

να συνάδουν προς το γεγονός ότι οι γονιδιακοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στην παθογένεση ή και στην παθολογία της οστεοαρθρίτιδας είναι επίσης μέρος της μεσοδερμικής διαφοροποίησης.

Επιπρόσθετα, σε άλλη μελέτη του προφίλ μεθυλίωσης του DNA σε χονδροκύτταρα του ισχίου προερχόμενα από ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα του ισχίου έγινε σύγκριση χονδροκυττάρων από διαβρωμένα και από ακέραια τμήματα του χόνδρου του ισχίου και μελετήθηκαν >480.000 τόποι CpG. Η διερεύνηση αυτή οδήγησε στην ταυτοποίηση 550 περιοχών DNA με διαφορετική μεθυλίωση, οι περισσότερες από τις οποίες ήταν υπομεθυλιωμένες και βρίσκονταν κοντά σε υποκινητές γονιδίων, επηρεάζοντας πιθανόν την έκφραση των εν λόγω γονιδίων. Μάλιστα, διαπιστώθηκε ότι υπήρχε διαφορετική μεθυλίωση σε γονίδια που έχουν συσχετιστεί με την παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας (*RUNX1, HTRA1, FGFR2, COL1A2*), η οποία συνοδεύεται από διαφορετική έκφραση των γονιδίων αυτών. Επί πλέον, βρέθηκε ότι υπήρχε διαφορετική μεθυλίωση στο ένα τρίτο του συνόλου των γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με αυξημένη προδιάθεση για την εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας. Τα εν λόγω αποτελέσματα αναδεικνύουν τον ρόλο που διαδραματίζει η διαταραχή της μεθυλίωσης του DNA και η επακόλουθη μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας.²⁸

Σε μια *post hoc* ανάλυση της παραπάνω μελέτης²⁵ φάνηκε ότι δημιουργείται μια κατηγοριοποίηση των ασθενών, αφού απομονώθηκε μια υποομάδα ασθενών η οποία χαρακτηριζόταν από διαφορετικό προφίλ μεθυλίωσης, κυρίως των γονιδίων που εμπλέκονται στη φλεγμονή και στην ανοσιακή απάντηση.²⁹ Στην υποομάδα αυτή διαπιστώθηκε υπομεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων των κυτταροκινών TNF, IL6, IL1A, του υποδοχέα της IL8 CXCR2 και των χημειοκινών CCL5 και CCL2. Σε συνέχεια της εν λόγω ταυτοποίησης, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων αυτών και διαπιστώθηκε ότι ήταν αυξημένη, όπως αναμενόταν από την υπομεθυλίωση των υποκινητών τους. Επί πλέον, διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση της κυτταροκίνης IL1B και του σχετιζόμενου με τον ψευδάργυρο μεταγραφικού παράγοντα MTF1, η οποία προκάλεσε αυξημένη έκφραση των μεταλλοπρωτεασών MMP13 και ADAMTS5. Ως εκ τούτου, γίνεται εμφανές ότι τέτοιες προσεγγίσεις μπορεί να αποτελέσουν τον θεμέλιο λίθο για την ανεύρεση θεραπευτικών ή και προγνώστικων, διαγνωστικών παραγόντων. Επίσης, όλο και περισσότεροι συγγραφείς συμφωνούν ότι οι γενωμικές προσεγγίσεις αποτελούν την αιχμή του δόρατος στη διερεύνηση περίπλοκων νοσημάτων, όπως είναι η οστεοαρθρίτιδα, αλλά και καθίσταται αναγκαία η ταυτοποίηση του γενετικού/επιγενετικού προφίλ του κάθε ατόμου για την εξατομίκευση της θεραπείας του.²⁹

6. MicroRNAs ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

6.1. miR-140

Πολλές μελέτες έχουν διερευνήσει την έκφραση των miRNAs στον οστεοαρθρικό χόνδρο σε σχέση με τον υγιή χόνδρο και την επίδρασή τους στη γονιδιακή έκφραση. Ένας από τους πρώτους παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν το miR-140 (miR-140), το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων.³⁰ Βρέθηκε ότι η έκφραση του miR-140 στα χονδροκύτταρα από οστεοαρθρικό χόνδρο είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τα χονδροκύτταρα από φυσιολογικό χόνδρο. Μάλιστα, η μείωση του miR-140 συσχετιζόταν με την αύξηση της έκφρασης της αγκρεκανάσης ADAMTS5, η οποία είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στην αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας στην οστεοαρθρίτιδα. Διαπιστώθηκε ακόμη ότι η επώαση φυσιολογικών χονδροκυττάρων με IL-1β, που είναι σημαντικός διαμεσολαβητής στην παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας, οδηγούσε σε μείωση του miR-140 και αύξηση της ADAMTS5. Η προσθήκη στη συνέχεια miR-140 στα συγκεκριμένα χονδροκύτταρα οδήγησε σε μείωση της ADAMTS5.³⁰ Επιπρόσθετα, σε επόμενη μελέτη, δείχθηκε ότι σε knock-out μυς με απαλοιφή του miR-140 παρατηρούνταν οστεοαρθρικές αλλοιώσεις και, μάλιστα, τα επίπεδα της ADAMTS5 ήταν σημαντικά αυξημένα.³¹ Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το miR-140 αναστέλλει φυσιολογικά την έκφραση της ADAMTS5 και ότι στην οστεοαρθρίτιδα η έκφραση του miR-140 ελαττώνεται, με αποτέλεσμα την αύξηση της ADAMTS5.

Από την άλλη πλευρά, έχει βρεθεί ότι το miR-140 αναστέλλει επίσης την έκφραση της δεσμειτικής πρωτεΐνης 5 του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα (insulin-like growth factor binding protein 5, IGFBP-5), η οποία συμμετέχει στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας.³² Επιπρόσθετα, από άλλη ομάδα διαπιστώθηκε ότι το miR-140 αναστέλλει την έκφραση της MMP-13, σε μοντέλο ανθρώπινων χονδροκυττάρων διεγερμένων με IL-1β.³³ Όσον αφορά στη ρύθμιση της έκφρασης του miR-140, ο αναβολικός μεταγραφικός παράγοντας SOX9 ενισχύει την έκφρασή του.³⁴ Ο μεταγραφικός παράγοντας NFAT3 επίσης ενισχύει την έκφραση του miR-140, ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας SMAD3 την αναστέλλει. Ο NFAT3 δραστηριοποιείται από μηχανικά ερεθίσματα, ενώ ο SMAD3 ενεργοποιείται από τη δράση του TGF-β, ο οποίος εμπλέκεται στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας.³⁵

6.2. miR-146

Ένα από τα miRNAs που μελετήθηκαν στον οστεοαρ-

θρικό χόνδρο ήταν το miR-146. Από τα πρώτα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ότι η έκφρασή του ανευρίσκεται αυξημένη στον οστεοαρθρικό χόνδρο σε σχέση με τον φυσιολογικό χόνδρο.³⁶ Σε μελέτη όπου οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, ανάλογα με τη βαρύτητα των αλλοιώσεων, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του miR-146 ήταν αυξημένη στην ομάδα με τις λιγότερες αλλοιώσεις και μειωνόταν όσο αύξανε η βαρύτητά τους. Επίσης, φάνηκε ότι η μείωση του miR-146 σε συνάρτηση με τη βαρύτητα των αλλοιώσεων συσχετιζόταν με την αύξηση της έκφρασης του MMP13. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη IL-1β σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα επάγει την έκφραση του miR-146 αλλά και του MMP13. Από τα ευρήματα αυτά φαίνεται ότι η έκφραση του miR-146 από τα χονδροκύτταρα επάγεται στα αρχικά στάδια της οστεοαρθρίτιδας, ως προστατευτικός μηχανισμός, έτσι ώστε να διατηρεί τα επίπεδα των αποδομητικών ενζύμων, όπως το MMP13, σε χαμηλά επίπεδα.³⁶ Μάλιστα, σε παρόμοια μελέτη αποδείχθηκε ότι, ενώ η IL-1β επάγει σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα την έκφραση της MMP-13 και της ADAMTS5, η προσθήκη miR-146 αναιρεί την εν λόγω δράση και άρα η miR-146 στοχεύει τα συγκεκριμένα γονίδια και μειώνει την έκφρασή τους.³⁷ Επίσης, βρέθηκε ότι η επαγόμενη από την IL-1β έκφραση του miR-146 σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα αρουραίου αναστέλλει την έκφραση του SMAD4. Ο SMAD4 είναι μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος διαμεσολαβεί τη δράση του TGF-β και εμπλέκεται στην παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας.³⁸

6.3. miR-210 και miR-130

Η μελέτη της έκφρασης του miR-210 συσχετίστηκε επίσης με τον οστεοαρθρικό χόνδρο και την επίδρασή του στα χονδροκύτταρα. Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του miR-210 είναι μειωμένη στα χονδροκύτταρα του οστεοαρθρικού χόνδρου σε σχέση με τον φυσιολογικό.³⁹ Στη μελέτη αυτή καταδείχθηκε ότι στόχος του miR-210 είναι το γονίδιο DR6, το οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα θανάτου 6 (death receptor 6, DR6). Ο DR6 προκαλεί απόπτωση των κυττάρων, ενεργοποιεί το μονοπάτι του NF-κB και εμπλέκεται στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας. Ενώ λοιπόν το miR-210 καταστέλλει φυσιολογικά το DR6, στον οστεοαρθρικό χόνδρο ελαττώνεται, με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του DR6.³⁹ Από την άλλη πλευρά, βρέθηκε ότι η έκφραση του miR-130 παρουσιάζει μείωση στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, η οποία μάλιστα συσχετίζεται με αύξηση της έκφρασης του γονιδίου του TNF-α. Ο TNF-α είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που συμμετέχει στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας. Επιπρόσθετα, η προσθήκη ανταγωνιστή του miR-130 (anti-miR-130) σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα οδήγησε σε αύξηση

της έκφρασης του *TNF-α*, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το miR-130 αναγνωρίζει και μειώνει την έκφραση του γονιδίου του *TNF-α*.⁴⁰

Πλήθος άλλων μελετών έχουν δημοσιευτεί για τη μεταβολή της έκφρασης των miRNAs στην οστεοαρθρίτιδα.^{32,41-54} Στον πίνακα 1 αναφέρονται συνοπτικά τα miRNAs τα οποία εκφράζονται διαφορετικά στην οστεοαρθρίτιδα και τα γονίδια που στοχεύουν. Διαφορετικά miRNAs μπορεί να σκοπεύουν το ίδιο γονίδιο και το ίδιο miRNA μπορεί να στοχεύει διαφορετικά γονίδια.

7. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Δύο είδη τροποποίησης των ιστονών έχουν μελετηθεί κυρίως στην οστεοαρθρίτιδα: η ακετυλίωση και η μεθυλίωση. Περισσότερο έχει μελετηθεί η μεταβολή της ακετυλίωσης των ιστονών στα χονδροκύτταρα του οστεοαρθρικού χόνδρου, οι συνέπειές της και οι προοπτικές φαρμακευτικής διόρθωσής της. Έχει δειχθεί ότι η αποακετυλάση των ιστο-

Πίνακας 1. Τα microRNAs των οποίων μεταβάλλεται η έκφραση στην οστεοαρθρίτιδα και τα γονίδια που στοχεύουν αυτά.

MicroRNA	Γονίδιο στόχος	Βιβλιογραφική παραπομπή
miR-140	ADAMTS5 IGFBP5 MMP13	Miyaki et al, ³⁰ Miyaki et al ³¹ Tardif et al ³² Liang et al ³³
miR-146	MMP13 MMP13, ADAMTS5 SMAD4	Yamasaki et al ³⁶ Li et al ³⁷ Li et al ³⁸
miR-210	DR6	Zhang et al ³⁹
miR-130	TNF-α	Li et al ⁴⁰
miR-16	SMAD3	Li et al ⁴¹
miR-335	–	Tornero-Esteban et al, ⁴² Tornero-Esteban et al ⁴³
miR-122	IL1A	Yang et al ⁴⁴
miR-26a	NF-κB	Xie et al ⁴⁵
miR-21	GDF5	Zhang et al ⁴⁶
miR-24	INK4A	Philipot et al ⁴⁷
miR-148	COL10A1, MMP13, ADAMTS5	Vonk et al ⁴⁸
miR-149	TNF-α, IL1B, IL6	Santini et al ⁴⁹
miR-483	BMP7, TGFB, MMP13	Qi et al ⁵⁰
miR-488	ZIP8	Song et al ⁵¹
miR-558	COX2	Park et al ⁵²
miR-125b	ADAMTS4	Matsukawa et al ⁵³
miR-27a	MMP13	Tardif et al ³²
miR-27b	MMP13	Akhtar et al ⁵⁴

τών HDAC7 εκφράζεται σε αυξημένα επίπεδα στον οστεοαρθρικό χόνδρο σε σχέση με τον φυσιολογικό. Μάλιστα, η αναστολή της έκφρασης της HDAC7 σε χονδροκύτταρα οδήγησε σε μείωση της έκφρασης της MMP13, υποδηλώνοντας ότι η HDAC7 αυξάνει την έκφραση της MMP13 μέσω της αποακετυλίωσης των ιστονών.⁵⁵ Οι εν λόγω παρατηρήσεις οδήγησαν σε δοκιμές αναστολέων των αποακετυλασών των ιστονών, με την προοπτική αξιοποίησής τους στη θεραπευτική αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι αναστολείς των αποακετυλασών τριχοστατίνη A, MS-275 και βαλπροϊκό μειώνουν την έκφραση των αποδομητικών ενζύμων MMP1, MMP3, MMP13 και ADAMTS5 σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα.⁵⁵⁻⁵⁷

Επιπρόσθετα, φάνηκε ότι οι αναστολείς των αποακετυλασών βορινοστάτη και πανομπινοστάτη αυξάνουν την έκφραση του miR-146 σε οστεοαρθρικά υμενοκύτταρα, αυξάνοντας την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Η αύξηση του miR-146 είχε ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της σηματοδότησης της IL-1β και τη μείωση της παραγωγής IL-6.⁵⁸ Ομοίως, σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι ο αναστολέας των αποακετυλασών δενβινοβίνη αυξάνει την έκφραση του miR-146 στα οστεοαρθρικά οστεοκύτταρα, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της σηματοδότησης της IL-1β.⁵⁹ Επιπρόσθετα, δείχθηκε ότι η τριχοστατίνη A αυξάνει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 [nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2] στον οστεοαρθρικό χόνδρο ποντικών. Ο Nrf2 έχει βρεθεί ότι λειτουργεί προστατευτικά στον αρθρικό χόνδρο στην οστεοαρθρίτιδα. Η αύξηση του Nrf2 από την τριχοστατίνη A είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των μεταλλοπρωτεασών MMP1, MMP3 και MMP13 και των κυτταροκινών TNF-α, IL-1β και IL-6, καθώς και τη μείωση της βλάβης του οστεοαρθρικού χόνδρου των ποντικών.⁶⁰

Η SirT1, μια αποακετυλάση των ιστονών, εμπλέκεται στην παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας. Τα επίπεδα της SirT1 έχουν βρεθεί μειωμένα στον οστεοαρθρικό χόνδρο. Θεωρείται ότι δρα προστατευτικά στον χόνδρο, αναστέλλοντας την απόπτωση των χονδροκυττάρων και καταστέλλοντας τη φλεγμονή που προκαλούν η IL-1β και ο TNF-α. Έχει προταθεί μάλιστα η χρήση της στη θεραπευτική αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας.⁶¹⁻⁶⁴

Ο ρόλος της μεθυλίωσης των ιστονών στην οστεοαρθρίτιδα δεν έχει ακόμη μελετηθεί εξ ίσου με αυτόν της ακετυλίωσης. Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η επαγωγή της έκφρασης της iNOS και της COX-2 από την IL-1 σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα συνοδεύεται από αυξημένη διμεθυλίωση και τριμεθυλίωση της λυσίνης 4 της ιστόνης H3 (H3K4) στους υποκινητές των iNOS και COX2. Η iNOS και η COX-2 (cyclooxygenase 2, κυκλοξυγενάση 2) εμπλέκονται ενεργά

στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας. Οι παραπάνω μεταβολές συσχετίζονται με την αυξημένη δράση της μεθυλοτρανσφεράσης των ιστονών SET-1A στους υποκινητές των iNOS και COX2 στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Η αναστολή της SET-1A με 5'-δεοξυ-5'-μεθυλθειοαδενοσίνη (MTA) μείωσε τη μεθυλίωση της H3K4 και την έκφραση των iNOS και COX2.⁶⁵ Άλλωστε, μεταβολές στη μεθυλίωση των ιστονών στους υποκινητές των γονιδίων *SOX9* και *NFAT1*, τα οποία εμπλέκονται στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας, έχουν συσχετιστεί με μεταβολή στην έκφραση των εν λόγω γονιδίων σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα.^{15,66}

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Διαρκώς αυξανόμενος αριθμός μελετών καταδεικνύει τον ρόλο των επιγενετικών μεταβολών στην ανάπτυξη της οστεοαρθρίτιδας. Έχει αναδειχθεί η συμμετοχή τόσο της μεθυλίωσης του DNA όσο και των miRNAs και της τροποποίησης των ιστονών στην παθογένεση της νόσου. Τα ευρήματα των σχετικών μελετών προσφέρουν νέες προοπτικές για τη διαλεύκανση των παθογενετικών μηχανισμών, για τη διαγνωστική προσέγγιση και για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας. Η αναγνώριση μιας υποομάδας ασθενών με οστεοαρθρίτιδα ισχίου, οι οποίοι παρουσιάζουν υπομεθυλίωση και αυξημένη

έκφραση γονιδίων της φλεγμονής, έχει προεκτάσεις στη θεραπευτική αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας, καθώς θέτει την πρόκληση της προσαρμογής της θεραπείας στο γενετικό/επιγενετικό προφίλ του κάθε ατόμου.²⁹ Επί πλέον, η αναστολή της αποϊωδινάσης της ιωδοθυρονίνης τύπου 2 (DIO2), η οποία παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα λόγω μεταβολής της μεθυλίωσης του υποκινητή της, προκύπτει ως ένας νέος πιθανός θεραπευτικός στόχος της οστεοαρθρίτιδας.²⁰ Από την άλλη πλευρά, οι αναφορές για μεταβολή των επιπέδων συγκεκριμένων miRNAs στον ορό του αίματος στην οστεοαρθρίτιδα^{67,68} ανοίγει νέες προοπτικές για τη χρήση τους ως βιοδείκτες της νόσου. Επιπρόσθετα, ο ανταγωνισμός miRNAs, τα οποία είναι αυξημένα στην οστεοαρθρίτιδα, ή η εξωτερική χορήγηση miRNAs, τα οποία είναι μειωμένα, προσφέρει ένα νέο πεδίο στην έρευνα για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου. Τέλος, η αναστολή των αποακετυλασών των ιστονών είναι ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο στην ανάπτυξη νέων θεραπειών για την οστεοαρθρίτιδα. Η μελέτη των επιγενετικών μηχανισμών που συμμετέχουν στην οστεοαρθρίτιδα συνεχίζεται και η καλύτερη κατανόηση των συγκεκριμένων μηχανισμών θα οδηγήσει στην περαιτέρω διαλεύκανση της παθογένειας της οστεοαρθρίτιδας και θα δημιουργήσει νέες προοπτικές για τη διάγνωση και τη θεραπεία της νόσου.

ABSTRACT

Osteoarthritis and epigenetics

P.K. PANAGOPOULOS,¹ G.I. LAMBROU^{1,2}

¹Post-graduate Programme "Metabolic bone diseases", School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, ²Choremeio Research Laboratory, First Department of Pediatrics, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2016, 33(6):727–738

Osteoarthritis is the most common chronic disease of the joints, with possible deleterious effects on the quality of life of patients. Its etiology is thought to be a combination of genetic and environmental factors. During recent years high throughput gene expression studies have made it possible to detect the role of a range of genes in the pathogenesis of osteoarthritis, but the mechanism is not yet fully understood. Documentation of epigenetic regulation in osteoarthritis is constantly increasing, and the epigenetic mechanisms identified include DNA methylation, histone modification and miRNA regulation. It has been found that genes responsible for pathogenesis are methylated, resulting in aberrant expression and or regulation. In addition, aberrant histone methylation and acetylation have been found to be linked to osteoarthritis and the use of methylase and acetylase inhibitors has been proposed as treatment. On the other hand, numerous microRNAs (miRNAs) have been shown to participate in gene regulation resulting in osteoarthritis. Recent research findings confirm that epigenetic regulation is a significant factor in the etiology of osteoarthritis, providing at the same time, the promise of novel diagnostic and or therapeutic methods. Further investigation is necessary to elucidate the role of epigenetics in the development of osteoarthritis and shed more light on the disease pathogenesis.

Key words: DNA methylation, Histone modification, MicroRNA, Osteoarthritis

Βιβλιογραφία

- AREF-ESHGHI E, ZHANG Y, LIU M, HARPER PE, MARTIN G, FUREY A ET AL. Genome-wide DNA methylation study of hip and knee cartilage reveals embryonic organ and skeletal system morphogenesis as major pathways involved in osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 2015, 16:287
- BIJLSMA JW, BERENBAUM F, LAFEBER FP. Osteoarthritis: An update with relevance for clinical practice. *Lancet* 2011, 377:2115–2126
- arcOGEN CONSORTIUM; arcOGEN COLLABORATORS, ZEGGINI E, PANTOPOULOU K, SOUTHAM L, RAYNER NW ET AL. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): A genome-wide association study. *Lancet* 2012, 380:815–823
- WADDINGTON CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 2012, 41:10–13
- CARRIÓ E, SUELVE M. DNA methylation dynamics in muscle development and disease. *Front Aging Neurosci* 2015, 7:19
- BARTEL DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004, 116:281–297
- PICK H, KILIC S, FIERZ B. Engineering chromatin states: Chemical and synthetic biology approaches to investigate histone modification function. *Biochim Biophys Acta* 2014, 1839:644–656
- MIAO CG, YANG YY, HE X, XU T, HUANG C, HUANG Y ET AL. New advances of microRNAs in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, with a focus on the crosstalk between DNA methylation and the microRNA machinery. *Cell Signal* 2013, 25:1118–1125
- ROACH HI, YAMADA N, CHEUNG KS, TILLEY S, CLARKE NM, OREFFO RO ET AL. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum* 2005, 52:3110–3124
- CHEUNG KS, HASHIMOTO K, YAMADA N, ROACH HI. Expression of ADAMTS-4 by chondrocytes in the surface zone of human osteoarthritic cartilage is regulated by epigenetic DNA demethylation. *Rheumatol Int* 2009, 29:525–534
- DA SILVA MA, YAMADA N, CLARKE NM, ROACH HI. Cellular and epigenetic features of a young healthy and a young osteoarthritic cartilage compared with aged control and OA cartilage. *J Orthop Res* 2009, 27:593–601
- BUI C, BARTER MJ, SCOTT JL, XU Y, GALLER M, REYNARD LN ET AL. cAMP response element-binding (CREB) recruitment following a specific CpG demethylation leads to the elevated expression of the matrix metalloproteinase 13 in human articular chondrocytes and osteoarthritis. *FASEB J* 2012, 26:3000–3011
- HASHIMOTO K, OTERO M, IMAGAWA K, DE ANDRÉS MC, COICO JM, ROACH HI ET AL. Regulated transcription of human matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and interleukin-1 β (IL1B) genes in chondrocytes depends on methylation of specific proximal promoter CpG sites. *J Biol Chem* 2013, 288:10061–10072
- HASHIMOTO K, OREFFO RO, GIBSON MB, GOLDRING MB, ROACH HI. DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2009, 60:3303–3313
- KIM KI, PARK YS, IM GI. Changes in the epigenetic status of the SOX-9 promoter in human osteoarthritic cartilage. *J Bone Miner Res* 2013, 28:1050–1060
- IMAGAWA K, DE ANDRÉS MC, HASHIMOTO K, ITOI E, OTERO M, ROACH HI ET AL. Association of reduced type IX collagen gene expression in human osteoarthritic chondrocytes with epigenetic silencing by DNA hypermethylation. *Arthritis Rheumatol* 2014, 66:3040–3051
- ALVAREZ K, DE ANDRÉS MC, TAKAHASHI A, OREFFO RO. Effects of hypoxia on anabolic and catabolic gene expression and DNA methylation in OA chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord* 2014, 15:431
- SCOTT JL, GABRIELIDES C, DAVIDSON RK, SWINGLER TE, CLARK IM, WALLIS GA ET AL. Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann Rheum Dis* 2010, 69:1502–1510
- DE ANDRÉS MC, IMAGAWA K, HASHIMOTO K, GONZALEZ A, ROACH HI, GOLDRING MB ET AL. Loss of methylation in CpG sites in the NF- κ B enhancer elements of inducible nitric oxide synthase is responsible for gene induction in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2013, 65:732–742
- BOMER N, DEN HOLLANDER W, RAMOS YF, BOS SD, VAN DER BREGGEN R, LAKENBERG N ET AL. Underlying molecular mechanisms of DIO2 susceptibility in symptomatic osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2015, 74:1571–1579
- MEULENBELT I, MIN JL, BOS S, RIYAZI N, HOUWING-DUISTERMAAT JJ, VAN DER WIJK HJ ET AL. Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Hum Mol Genet* 2008, 17:1867–1875
- PAPATHANASIOU I, KOSTOPOULOU F, MALIZOS KN, TSEZOU A. DNA methylation regulates sclerostin (SOST) expression in osteoarthritic chondrocytes by bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induced changes in Smads binding affinity to the CpG region of SOST promoter. *Arthritis Res Ther* 2015, 17:160
- DELGADO-CALLE J, FERNÁNDEZ AF, SAINZ J, ZARRABEITIA MT, SAÑUDO C, GARCÍA-RENEDO R ET AL. Genome-wide profiling of bone reveals differentially methylated regions in osteoporosis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2013, 65:197–205
- FERNÁNDEZ-TAJES J, SOTO-HERMIDA A, VÁZQUEZ-MOSQUERA ME, CORTÉS-PEREIRA E, MOSQUERA A, FERNÁNDEZ-MORENO M ET AL. Genome-wide DNA methylation analysis of articular chondrocytes reveals a cluster of osteoarthritic patients. *Ann Rheum Dis* 2014, 73:668–677
- RUSHTON MD, REYNARD LN, BARTER MJ, REFAIE R, RANKIN KS, YOUNG DA ET AL. Characterization of the cartilage DNA methylation in knee and hip osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014, 66:2450–2460
- DEN HOLLANDER W, RAMOS YF, BOS SD, BOMER N, VAN DER BREGGEN R, LAKENBERG N ET AL. Knee and hip articular cartilage have distinct epigenomic landscapes: Implications for future cartilage regeneration approaches. *Ann Rheum Dis* 2014, 73:2208–2212
- DEN HOLLANDER W, RAMOS YF, BOMER N, ELZINGA S, VAN DER BREGGEN R, LAKENBERG N ET AL. Transcriptional associations of osteoarthritis-mediated loss of epigenetic control in articular cartilage. *Arthritis Rheumatol* 2015, 67:2108–2116
- JEFFRIES MA, DONICA M, BAKER LW, STEVENSON ME, ANNAN AC,

- HUMPHREY MB ET AL. Genome-wide DNA methylation study identifies significant epigenomic changes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheumatol* 2014, 66:2804–2815
29. RUSHTON MD, YOUNG DA, LOUGHLIN J, REYNARD LN. Differential DNA methylation and expression of inflammatory and zinc transporter genes defines subgroups of osteoarthritic hip patients. *Ann Rheum Dis* 2015, 74:1778–1782
30. MIYAKI S, NAKASA T, OTSUKI S, GROGAN SP, HIGASHIYAMA R, INOUE A ET AL. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis Rheum* 2009, 60:2723–2730
31. MIYAKI S, SATO T, INOUE A, OTSUKI S, ITO Y, YOKOYAMA S ET AL. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev* 2010, 24:1173–1185
32. TARDIF G, HUM D, PELLETIER JP, DUVAL N, MARTEL-PELLETIER J. Regulation of the *IGFBP-5* and *MMP-13* genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord* 2009, 10:148
33. LIANG ZJ, ZHUANG H, WANG GX, LI Z, ZHANG HT, YU TQ ET AL. MiRNA-140 is a negative feedback regulator of *MMP-13* in IL-1 β -stimulated human articular chondrocyte C28/I2 cells. *Inflamm Res* 2012, 61:503–509
34. NAKAMURA Y, HE X, KOBAYASHI T, YAN YL, POSTLETHWAIT JH, WARMAN ML. Unique roles of microRNA140 and its host gene *WWP2* in cartilage biology. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008, 8:321–322
35. TARDIF G, PELLETIER JP, FAHMI H, HUM D, ZHANG Y, KAPOOR M ET AL. NFAT3 and TGF- β /SMAD3 regulate the expression of miR-140 in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2013, 15:R197
36. YAMASAKI K, NAKASA T, MIYAKI S, ISHIKAWA M, DEIE M, ADACHI N ET AL. Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum* 2009, 60:1035–1041
37. LI X, GIBSON G, KIM JS, KROIN J, XU S, VAN WIJNEN AJ ET AL. MicroRNA-146a is linked to pain-related pathophysiology of osteoarthritis. *Gene* 2011, 480:34–41
38. LI J, HUANG J, DAI L, YU D, CHEN Q, ZHANG X ET AL. miR-146a, an IL-1 β responsive miRNA, induces vascular endothelial growth factor and chondrocyte apoptosis by targeting *Smad4*. *Arthritis Res Ther* 2012, 14:R75
39. ZHANG D, CAO X, LI J, ZHAO G. MiR-210 inhibits NF- κ B signaling pathway by targeting *DR6* in osteoarthritis. *Sci Rep* 2015, 5:12775
40. LI ZC, HAN N, LI X, LI G, LIU YZ, SUN GX ET AL. Decreased expression of microRNA-130a correlates with *TNF- α* in the development of osteoarthritis. *Int J Clin Exp Pathol* 2015, 8:2555–2564
41. LI L, JIA J, LIU X, YANG S, YE S, YANG W ET AL. MicroRNA-16-5p controls development of osteoarthritis by targeting *SMAD3* in chondrocytes. *Curr Pharm Des* 2015, 21:5160–5167
42. TORNERO-ESTEBAN P, HOYAS JA, VILLAFUERTE E, GARCIA-BULLÓN I, MORO E, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ B ET AL. Study of the role of miRNA in mesenchymal stem cells isolated from osteoarthritis patients. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol* 2014, 58:138–143
43. TORNERO-ESTEBAN P, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ L, ABÁSULO L, TOMÉ M, LÓPEZ-ROMERO P, HERRANZ E ET AL. Signature of microRNA expression during osteogenic differentiation of bone marrow MSCs reveals a putative role of miR-335-5p in osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 2015, 16:182
44. YANG F, HU A, ZHAO D, GUO L, YANG L, WANG B ET AL. An insertion/deletion polymorphism at the microRNA-122 binding site in the interleukin-1 α 3'-untranslated region is associated with a risk for osteoarthritis. *Mol Med Rep* 2015, 12:6199–6206
45. XIE Q, WEI M, KANG X, LIU D, QUAN Y, PAN X ET AL. Reciprocal inhibition between miR-26a and NF- κ B regulates obesity-related chronic inflammation in chondrocytes. *Biosci Rep* 2015, 35, pii:e00204
46. ZHANG Y, JIA J, YANG S, LIU X, YE S, TIAN H. MicroRNA-21 controls the development of osteoarthritis by targeting GDF-5 in chondrocytes. *Exp Mol Med* 2014, 46:e79
47. PHILIPOT D, GUÉRIT D, PLATANO D, CHUCHANA P, OLIVOTTO E, ESPINOZA F ET AL. p16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2014, 16:R58
48. VONK LA, KRAGTEN AH, DHERT WJ, SARIS DB, CREEMERS LB. Overexpression of hsa-miR-148a promotes cartilage production and inhibits cartilage degradation by osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2014, 22:145–153
49. SANTINI P, POLITI L, VEDOVA PD, SCANDURRA R, SCOTTO D'ABUSCO A. The inflammatory circuitry of miR-149 as a pathological mechanism in osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2014, 34:711–716
50. QI Y, MA N, YAN F, YU Z, WU G, QIAO Y ET AL. The expression of intronic miRNAs, miR-483 and miR-483*, and their host gene, *Igf2*, in murine osteoarthritis cartilage. *Int J Biol Macromol* 2013, 61:43–49
51. SONG J, KIM D, LEE CH, LEE MS, CHUN CH, JIN EJ. MicroRNA-488 regulates zinc transporter SLC39A8/ZIP8 during pathogenesis of osteoarthritis. *J Biomed Sci* 2013, 20:31
52. PARK SJ, CHEON EJ, KIM HA. MicroRNA-558 regulates the expression of cyclooxygenase-2 and IL-1 β -induced catabolic effects in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2013, 21:981–989
53. MATSUKAWA T, SAKAI T, YONEZAWA T, HIRAIWA H, HAMADA T, NAKASHIMA M ET AL. MicroRNA-125b regulates the expression of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2013, 15:R28
54. AKHTAR N, RASHEED Z, RAMAMURTHY S, ANBAZHAGAN AN, VOSS FR, HAQQI TM. MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2010, 62:1361–1371
55. HIGASHIYAMA R, MIYAKI S, YAMASHITA S, YOSHITAKA T, LINDMAN G, ITO Y ET AL. Correlation between *MMP-13* and *HDAC7* expression in human knee osteoarthritis. *Mod Rheumatol* 2010, 20:11–17
56. SAITO T, NISHIDA K, FURUMATSU T, YOSHIDA A, OZAWA M, OZAKI T. Histone deacetylase inhibitors suppress mechanical stress-induced expression of RUNX-2 and ADAMTS-5 through the inhibition of the MAPK signaling pathway in cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2013, 21:165–174
57. CULLEY KL, HUI W, BARTER MJ, DAVIDSON RK, SWINGLER TE, DESTUMENT AP ET AL. Class I histone deacetylase inhibition modulates metalloproteinase expression and blocks cytokine-induced cartilage degradation. *Arthritis Rheum* 2013, 65:1822–1830
58. WANG JH, SHIH KS, WU YW, WANG AW, YANG CR. Histone deacet-

- ylase inhibitors increase microRNA-146a expression and enhance negative regulation of interleukin-1 β signaling in osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2013, 21:1987–1996
59. YANG CR, SHIH KS, LIOU JP, WU YW, HSIEH IN, LEE HY ET AL. Denb-
inobin upregulates miR-146a expression and attenuates IL-
1 β -induced upregulation of ICAM-1 and VCAM-1 expressions
in osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes. *J Mol Med (Berl)*
2014 [Epub ahead of print]
60. CAI D, YIN S, YANG J, JIANG Q, CAO W. Histone deacetylase inhi-
bition activates *Nrf2* and protects against osteoarthritis. *Ar-
thritis Res Ther* 2015, 17:269
61. GAGARINA V, GABAY O, DVIR-GINZBERG M, LEE EJ, BRADY JK, QUON
MJ ET AL. *Sirt1* enhances survival of human osteoarthritic chon-
drocytes by repressing protein tyrosine phosphatase 1B and
activating the insulin-like growth factor receptor pathway. *Arthritis Rheum* 2010, 62:1383–1392
62. DVIR-GINZBERG M, STEINMEYER J. Towards elucidating the role
of *Sirt1* in osteoarthritis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2013,
18:343–355
63. MATSUSHITA T, SASAKI H, TAKAYAMA K, ISHIDA K, MATSUMOTO T,
KUBO S ET AL. The overexpression of *SIRT1* inhibited osteoar-
thritic gene expression changes induced by interleukin-1 β
in human chondrocytes. *J Orthop Res* 2013, 31:531–537
64. MOON MH, JEONG JK, LEE YJ, SEOL JW, JACKSON CJ, PARK SY. *SIRT1*,
a class III histone deacetylase, regulates TNF- α -induced in-
flammation in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*
2013, 21:470–480
65. EL MANSOURI FE, CHABANE N, ZAYED N, KAPOOR M, BENDERDOUR
M, MARTEL-PELLETIER J ET AL. Contribution of H3K4 methyl-
ation by SET-1A to interleukin-1-induced cyclooxygenase 2
and inducible nitric oxide synthase expression in human os-
teoarthritis chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2011, 63:168–179
66. RODOVA M, LU Q, LI Y, WOODBURY BG, CRIST JD, GARDNER BM
ET AL. *Nfat1* regulates adult articular chondrocyte function
through its age-dependent expression mediated by epige-
netic histone methylation. *J Bone Miner Res* 2011, 26:1974–
1986
67. MURATA K, YOSHITOMI H, TANIDA S, ISHIKAWA M, NISHITANI K, ITO
H ET AL. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential bi-
omarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis
Res Ther* 2010, 12:R86
68. BORGONIO CUADRA VM, GONZALEZ-HUERTA NC, ROMERO-COR-
DOBA S, HIDALGO-MIRANDA A, MIRANDA-DUARTE A. Altered ex-
pression of circulating microRNA in plasma of patients with
primary osteoarthritis and *in silico* analysis of their pathways.
PLoS One 2014, 9:e97690

Corresponding author:

G.I. Lambrou, Choremeio Research Laboratory, First Depart-
ment of Pediatrics, Thivon & Levadeias street, GR-115 27 Ath-
ens, Greece
e-mail: glamprou@med.uoa.gr

.....