

Genetyczno-epigenetyczne interakcje w etiopatogenezie osteoartrozy. Wybrane molekularne czynniki w etiopatogenezie OA

Genetic and Epigenetic Interactions in the Etiopathogenesis of Osteoarthritis. Selected Molecular Factors in OA Etiopathogenesis

Aleksandra Snochowska^{1*(A-F)}, Paulina Szmigielska^{1*(A-F)},
Ewa Brzeziańska-Lasota^{1(A,D,E)}, Wiesław Tomaszewski^{2(B,E,G)}

¹ Zakład Molekularnych Podstaw Medycyny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

² Wyższa Szkoła Fizjoterapii z siedzibą we Wrocławiu, Polska

¹ Department of Molecular Bases of Medicine, Medical University of Lodz, Lodz, Poland

² College of Physiotherapy, Wrocław, Poland

* Ex aequo / These authors contributed equally in this work

STRESZCZENIE

Osteoartroza (OA) jest występującym powszechnie w populacji schorzeniem o wieloaspektowej etiopatogenezie i skomplikowanej patofizjologii. Choroba ta cechuje się systematyczną degeneracją tkanki kostnej podchrzęstnej, chrząstki stawowej, błony maziowej stawów i zwężeniem szczeliny stawowej, co wpływa zasadniczo na przedwczesne ograniczenie funkcjonalności narządu ruchu. Wyniki wielu badań epidemiologicznych przeprowadzonych w różnych populacjach na świecie, obejmujących m. in. analizę asocjacyjną całego genomu oraz analizę zmian epigenetycznych (takich jak: miRNA, metylacja DNA oraz modyfikacja histonów) wskazały na wielopłaszczyznowy charakter choroby. Celem pracy było przedstawienie stanu aktualnej wiedzy na temat zmian profilu ekspresji genów istotnych z punktu widzenia patogenezy osteoartrozy, z uwzględnieniem udziału regulacji epigenetycznych.

Wykorzystano metodę wyszukiwania artykułów przy użyciu bazy danych PubMed. Podczas wyszukiwania zastosowano następujące słowa kluczowe: osteoarthritis, GWAS, epigenetics, miRNA.

Doniesienia przedstawione w niniejszym opracowaniu stanowią punkt wyjścia do dalszych rozważań nad poszukiwaniem celu zindywidualizowanej terapii biologicznej. Obecnie typuje się kilka hipotetycznych strategii opracowania celowanego leczenia OA, jednakże należy podkreślić, iż kluczowym w tym momencie jest dokładne zrozumienie genetyczno-epigenetycznych interakcji w patogenezie OA. Na podstawie analizy wyników dostępnych badań uwzględnionych w niniejszej publikacji, można przedstawić następujące wnioski: Zarówno czynniki środowiskowe, jak i interakcje genetyczno-epigenetyczne przyczyniają się do złożonej patogenezy OA; Wytypowano geny ryzyka OA; Różnice w ekspresji genów w OA mogą być pomocne w ocenie stopnia progresji choroby; Wskazano epigenetyczne cele terapii OA.

Słowa kluczowe: osteoartroza, epigenetyka, miRNA, SNP, GWAS

SUMMARY

Osteoarthritis (OA) is a widespread disease characterized by a multifaceted etiopathogenesis and complicated pathophysiology. OA is connected with systematic degeneration of subchondral bone tissue, articular cartilage, synovial membrane and stenosis of the joint space, which substantially contributes to premature reduction of functional mobility. The results of many epidemiological studies carried out in various populations around the world including genome-wide association studies and analysis of epigenetic modifications (such as miRNA expression, DNA methylation and histone modifications) have indicated a multifaceted nature of the disease. The aim of this paper is to present the state of the art for gene-expression level changes of relevance for the pathogenesis of osteoarthritis, including the contribution of epigenetic regulations.

The source of search data for this paper was the PubMed database. The following keywords were used as search terms: osteoarthritis, GWAS, epigenetics and miRNA.

The reports presented in this paper provide a starting point for further considerations regarding the development of personalized biological therapy. Several hypothetical strategies for the targeted OA treatment development exist nowadays. However, it is important to emphasize that in-depth understanding of the genetic-epigenetic interaction in OA pathogenesis is crucial. Based on the analysis of the aforementioned available study results, the following conclusions can be made: Both environmental factors and genetic-epigenetic interactions contribute to the complex pathogenesis of OA; OA risk genes have been identified; Differences in gene expression in OA may be helpful in assessing progression of the disease; The epigenetic goals of OA therapy have been indicated.

Key words: osteoarthritis, epigenetics, miRNA, SNP, GWAS

WSTĘP

Choroba zwyrodnieniowa stawów, osteoartroza (ang. *osteoarthritis*, OA), uznana za chorobę o złożonej etiopatogenezie i skomplikowanej patofizjologii, jest występującą powszechnie w populacjach chorobą o późnym początku. Charakteryzuje się ona systematyczną degeneracją tkanki kostnej podchrzęstnej, chrząstki stawowej, błony maziowej stawów i zwężeniem szczeliny stawowej. Wpływa to zasadniczo na ograniczenie funkcjonalności stawów i mięśni, co powoduje uszkodzenia mechaniczne w obrębie stawów.

Wyniki wielu badań epidemiologicznych przeprowadzonych w różnych populacjach na świecie, obejmujących analizy rodowodów oraz badania na bliźniętach potwierdziły, że zarówno czynniki środowiskowe, jak i interakcje genetyczno-epigenetyczne, przyczyniają się do złożonej etiopatogenezy OA. W oparciu o badania asocjacyjne całego ludzkiego genomu (ang. *genome-wide association scans*; GWAS), stworzono genomowe mapy asocjacyjne i scharakteryzowano wiele alleli genów związanych z ryzykiem wystąpienia OA.

W efekcie wytypowano wiele genów kandydackich predysponujących do wystąpienia OA, co pozwoliło na definitywne potwierdzenie genetycznego charakteru podatności na zachorowanie. Jednocześnie wykazano, że występujące polimorficzne allele genów determinują heterogenny charakter choroby w zależności od płci, pochodzenia etnicznego czy stylu życia, co potwierdziły badania funkcjonalne [2]. Wyniki badań ostatnich kilku lat, dostarczyły także dowodów na udział mechanizmów epigenetycznych, takich jak np. metylacja DNA, acetylacja/deacetylacja histonów czy regulatorowego niekodującego RNA (ang. *noncoding RNA*; ncRNA, a w szczególności miRNA) w kontroli ekspresji genów istotnych w rozwoju OA [2,3].

Wydaje się, że najnowsze odkrycia z zakresu genomiki i epigenomiki pozwalają na coraz lepsze zrozumienie złożonej patogenezy OA oraz stworzą w przyszłości szansę na rozwój zindywidualizowanych, biologicznych metod leczenia.

GENOMOWA ANALIZA SPRZEŻEŃ

Wyniki analiz przeprowadzonych na bliźniętach monozygotycznych i dzygotycznych wyraźnie pokazują, iż idiopatyczna postać OA ma istotny komponent genetyczny [4]. Na obecnym etapie badań, w celu szczegółowego rozpoznania udziału takiego czynnika genetycznego, konieczne jest posługiwanie się kombinacją wielu metod m.in.: analizą rodowodów, skanowaniem całego genomu za pomocą analizy sprzężeń, poszukiwaniem genów kandydackich za pomocą badań asocjacyjnych, czy badaniem ekspresji genów. Wyniki

BACKGROUND

Osteoarthritis (OA), considered to be a disease with a complex etiopathogenesis and complicated pathophysiology, is a common late-onset disease. It is characterized by systematic degeneration of subchondral bone tissue, articular cartilage, synovial membrane and stenosis of the joint space. It causes substantial limitation of joint and muscle functions, resulting in mechanical damage within the joints.

The results of many epidemiological studies conducted in different populations around the world (including pedigree analysis and twin studies) have confirmed that both environmental factors and genetic-epigenetic interactions contribute to the complexity of OA etiopathogenesis. Based on genome-wide association scans (GWAS), genomic associative maps have been created and many alleles of genes associated with the risk of OA have been characterized.

As a result, a number of candidate genes predisposing to OA have been identified, furnishing definitive proof of genetic susceptibility to OA. At the same time, polymorphic gene alleles have been shown to determine the disease's heterogeneity in terms of sex, ethnicity or lifestyle, as confirmed by functional studies [2]. The last few years have also brought evidence for the involvement of epigenetic mechanisms such as DNA methylation, histone acetylation/deacetylation or regulation by noncoding RNA (ncRNA, particularly miRNA) in control of gene expression in OA [2,3].

It seems that the latest discoveries in the field of genomics and epigenomics are improving our understanding of the complex pathogenesis of OA and will provide an opportunity for the development of personalized biological therapies in the future.

GENETIC LINKAGE ANALYSIS

The results of monozygotic and dizygotic twin studies clearly show that idiopathic osteoarthritis has an important genetic component [4]. A combination of many methods (including pedigree analysis, genetic linkage analysis, genome-wide association scan studies, candidate gene studies and gene expression studies) is needed to describe in detail the contribution of the genetic factor. Findings from such studies have made it possible to tentatively estimate the inheritance and genetic variability of OA. The inheri-

tych badań pozwoliły wstępnie oszacować zmienność genetyczną fenotypu choroby oraz jej „zdolności do dziedziczenia”. Odziedziczalność OA została obliczona w dwóch konfiguracjach po skorygowaniu tych danych o wpływ innych znanych czynników ryzyka, takich jak: wiek, płeć i wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*, BMI). Na podstawie wyników najnowszych badań wykazano również, że wpływ czynników genetycznych w radiograficznie stwierdzonej OA rąk, biodra i kolana u kobiet waha się pomiędzy 39%, a 65%, niezależnie od znanych środowiskowych lub demograficznych czynników zakłócających [5].

Z kolei genomowa analiza sprzężeń szacująca w oparciu o LOD score (ang. *logarithm (base 10) of odds*) szansę dziedziczenia się loci sprzężonych w chromosomie, udowodniła istnienie powiązania z występowaniem heterogennych fenotypów OA na chromosomach: 2q, 2p, 4q, 6p, 7p, 11q, 16p i chromosomie X [6].

BADANIA ASOCJACYJNE

Ostatnie dziesięciolecie przyniosło dynamiczny rozwój metod genetycznych, dzięki którym możliwe było przeprowadzenie równoczesnej analizy setek tysięcy polimorfizmów genetycznych rozmieszczonych w całym genomie. Szczególnie badania GWAS dostarczyły dowodów na poligenową naturę OA. Udowodniono, że jest ona uwarunkowana przez liczne warianty genów, mające niewielki indywidualny wpływ na ryzyko rozwoju choroby. Do znaczących badań w tym zakresie należy zaliczyć etniczne badania Rotterdam (OA stawu kolanowego, biodrowego i nadgarstka) i arcOGEN (OA stawu kolanowego i biodrowego) przeprowadzone w populacji Europejskiej na kohortach od 1000-7500 chorych, które udowodniły asocjację dla regionów zlokalizowanych na chromosomach m.in.: 1, 3, 6, 7, 9, 12, 13, 16, 22 [2].

Metaanalizy wielu opublikowanych badań asocjacyjnych wykazały, że status genu-kandydata dla OA otrzymało początkowo ponad 190 genów [7,8]. Allele tych genów zostały wyselekcjonowane pod kątem ich związku z ryzykiem OA u ludzi za pomocą programu Human Genome Epidemiology Navigator (HuGe Navigator), w którym ponad 27 tysięcy polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. *single-nucleotide polymorphism*, SNP) zgrupowano w 158 nienakładających się obszarach genomu ludzkiego. Badania te koncentrowały się na poszczególnych podgrupach genów, często powiązanych funkcjonalnie. Jako geny-kandydackie wytypowano te, które kodują m.in. białka macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*; ECM) i białka odpowiedzialne za regulację transkrypcji, proliferacji, wzrostu i regeneracji komórek, funkcjonowania kanałów jonowych,

tance of OA has been calculated in two configurations after adjustment for other known risk factors such as age, sex and body mass index (BMI). Based on the results of recent studies, it has also been shown that the influence of genetic factors in radiographic hip, knee and hand osteoarthritis in women ranges between 39% and 65%, regardless of known environmental or demographic confounders [5].

In turn, genetic linkage analysis, which estimates the chance of inheriting susceptibility loci for OA (based on a LOD [logarithm (base 10) of odds] score) has demonstrated the existence of a connection between heterogeneous phenotypes of OA with chromosomes: 2q, 2p, 4q, 6p, 7p, 11q, 16p and chromosome X [6].

ASSOCIATION STUDIES

The last decade has brought a dynamic development of genetic methods that make possible simultaneous analysis of hundreds of thousands of genetic polymorphisms spread throughout the genome. Especially, GWAS studies have provided evidence for a polygenic nature of OA. It has been demonstrated that OA is conditioned by numerous gene variants that have little individual impact on the risk of developing the disease. Significant investigations in this field include the Rotterdam (knee, hip and wrist OA) and arcOGEN (knee and hip OA) studies, performed in the European population on cohorts of 1,000 to 7,500 patients, which have demonstrated the association for chromosome-based regions incl. chromosome 1, 3, 6, 7, 9, 12, 13, 16, 22 [2].

Meta-analyses of many published association studies have shown that the OA candidate gene status was initially granted to over 190 genes [7,8]. The alleles of these genes were selected for their association with OA risk in humans by the Human Genome Epidemiology Navigator (HuGe Navigator), in which over 27,000 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were grouped in 158 non-overlapping areas of the human genome. These studies have concentrated on particular subgroups of genes that were often linked functionally. Genes encoding extracellular matrix (ECM) proteins and proteins responsible for regulating transcription, proliferation, cell growth and regeneration, ion channel function, intercellular modification, and immune system response are those identified as candidate genes involved in OA pathogenesis. Moreover, ethnic differences have been shown to play an essential role in the development of OA,

modyfikujące oddziaływania międzykomórkowe, czy procesy immunologiczne [7]. Wykazano, że różnice etniczne mają duże znaczenie w rozwoju OA, szczególnie dla populacji Azjatyckiej i Europejskiej. Różnice te mogą być związane z: (1) różną częstością występowania alleli ryzyka, (2) różnym tłem genetycznym, który ma wpływ na oddziaływanie alleli, (3) udziałem różnych czynników środowiskowych, które modulują oddziaływania alleli ryzyka w danej populacji [2]. Kolejne analizy zweryfikowały listę genów-kandydackich dla OA do kilkunastu, dla których wynik analizy asocjacyjnej był znacząco istotny statystycznie ($OR \geq 1$) [9]. Wybrane przykłady wskazujące na istotne funkcjonalne powiązanie niektórych SNP z rozwojem OA poszczególnych stawów przedstawia Tabela 1.

principally among the Asian and European populations. These differences may be related to: (1) the incidence of risk alleles, (2) different genetic backgrounds that affect alleles, and (3) the contribution of various environmental factors that modulate the effects of risk alleles in a population [2]. Subsequent analyses narrowed down the list of candidate genes for OA to a dozen or so for which the result of associative analyses was statistically significant ($OR \geq 1$) [9]. Selected examples of significant functional association of some SNPs with the development of OA are shown in Table 1.

Tab. 1. Przykłady genów o potwierdzonym znaczeniu w etiopatogenezie OA

Tab. 1. Genes involved in OA pathogenesis

GEN/LOCUS // GENE / CHROMOSOME	FUNKCJA BIAŁKA / PROTEIN FUNCTION	SNP ID / SNP ID	STAW / JOINT	REF./ REFS
COL11A1 (Collagen Type XI Alpha 1 Chain) 1p21	fibrylogeneza, białko ECM chrząstki / fibrillogenesis, cartilage ECM protein	rs4907986	biodrowy / hip	[7,31]
ADAM12 (ADAM Metallopeptidase Domain 12) 10q26	degradacja białek ECM chrząstki stawowej / matrix-degrading enzyme	rs1871054	kolanowy / knee	[32]
GDF5 (Growth Differentiation Factor 5) 20q11.22	regulator wzrostu i różnicowania komórek i aktywności białek morfogenetycznych kości, chondrogeniza / regulator of cell growth and differentiation, bone morphogenetic protein, chondrogenesis	rs143383	biodrowy, kolanowy / hip, knee	[2]
DVWA (dual von Willebrand factor A domains) 3p25.1	udział w adhezji komórkowej, interakcje białko- białko / cellular adhesion, facilitation of protein- protein interactions	rs7639618 rs11713836 rs3773472	kolanowy / knee	[33]
ASTN2 (Astrotactin 2) 9q33.1	migracja neuronów / neural migration	rs4836732	biodrowy u kobiet / hip - female	[2,34]
CHST11 (Carbohydrate sulfotransferase 11) 12q23	przeniesienie grup sulfonowych do proteoglikanów chrząstki, udział w rozwoju szkieletu / transfer of sulphate groups to the 4-O position of cartilage proteoglycans, skeletal development	rs835487	biodrowy / hip	[2,34]
SMAD3 (Mother against decapentaplegic homologue 3) 15q22.33	przebieg sygnału w szlaku TGF- β /SMAD, regulator transkrypcji / signal transducer and transcriptional modulator – TGF β signalling	rs12901499	biodrowy, kolanowy / hip, knee	[2]
ASPN (Asporin) 9q22.31	remodeling ECM chrząstki / cartilage ECM modulator	rs13301537	kolanowy / knee	[35]
IL8 (Interleukin 8) 4q12-q13	czynnik chemotaktyczny dla neutrofilów, bazofilów i limfocytów T, czynnik angiogenetyczny / chemoattractant for neutrophils, basophils and T-cells; angiogenetic factor	rs4073 rs2227306	OA	[36]

PROFIL EKSPRESJI GENÓW

Każdy etap dojrzewania i różnicowania chondrocytów charakteryzuje się innym profilem ekspresji genów warunkującym osiągnięcie określonego funkcjonalnego fenotypu dojrzałych komórek. W przebiegu OA zmiana statusu fizjologicznego chondrocytu również zdaje się znajdować swe molekularne odzwierciedlenie w zmianie profilu ekspresji [10].

Zastosowanie mikromacierzy w celu analizy profilu ekspresji genów pozwoliło na wykazanie zmian jakościowych i ilościowych w zależności od rodzaju zajętego stawu (kolanowy, biodrowy), typu komórek, fazy zaawansowania choroby, rodzaju analizowanego materiału biologicznego oraz wieku pacjentów [11-16]. W badaniu przeprowadzonym przez Geyer i wsp. [11] wykazano, że profil ekspresji genów chrząstki stawu kolanowego u tych samych pacjentów różni się znacząco w zależności od tego, czy komórki pochodzą z miejsc objętych procesem chorobowym, czy tkanki prawidłowej [11]. Co ciekawe, zmiany w ekspresji genów zaobserwować można również w odniesieniu do struktur odległych od samego stawu objętego procesem chorobowym, co wykazał zespół Sánchez-Sabaté w przypadku talerza kości biodrowej u pacjentów z OA stawu biodrowego [12]. Również w analizie proteomicznej zaobserwowano zmienny profil immunoekspresji białek w tkankach i płynach stawowych pacjentów z OA w porównaniu do osób zdrowych i z rozpoznaniem reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) [17,18].

Zaobserwowane zmiany w ekspresji genów/białek w stawach objętych procesem chorobowym w przebiegu OA w porównaniu z osobami zdrowymi dotyczą m.in. genów kodujących białka biorące udział w tworzeniu kości, syntezie białek ECM i regulacji: procesów immunologicznych, chondrogenety, angiogenezy i genów „chondroprotekcyjnych” (utrzymujących stabilny fenotyp chondrocytów prehipertroficznym) [13].

Rozwój OA jest procesem wieloetapowym, co wiąże się ze zmianami profilu ekspresji genów w czasie jej przebiegu – ekspresja niektórych genów może zmieniać się stopniowo, wraz z postępem choroby (np. *SOX9*, *ACAN*, *COL2A1*, *COL1A1*), podczas gdy ekspresja innych genów może być obecna lub nie, tylko na niektórych jej etapach (np. *COL10A1*, *GREM1*, *AXIN2* – późna OA, *BMP2* – wczesna OA), jak zostało to zilustrowane na rycinie 1 [19].

Dokładne scharakteryzowanie kinetyki zmian ekspresji może stanowić podstawę nie tylko ustalenia molekularnego stopnia progresji choroby, ale również być użyteczne w selekcji potencjalnych celów terapeutycznych [10,19].

GENE EXPRESSION PATTERN

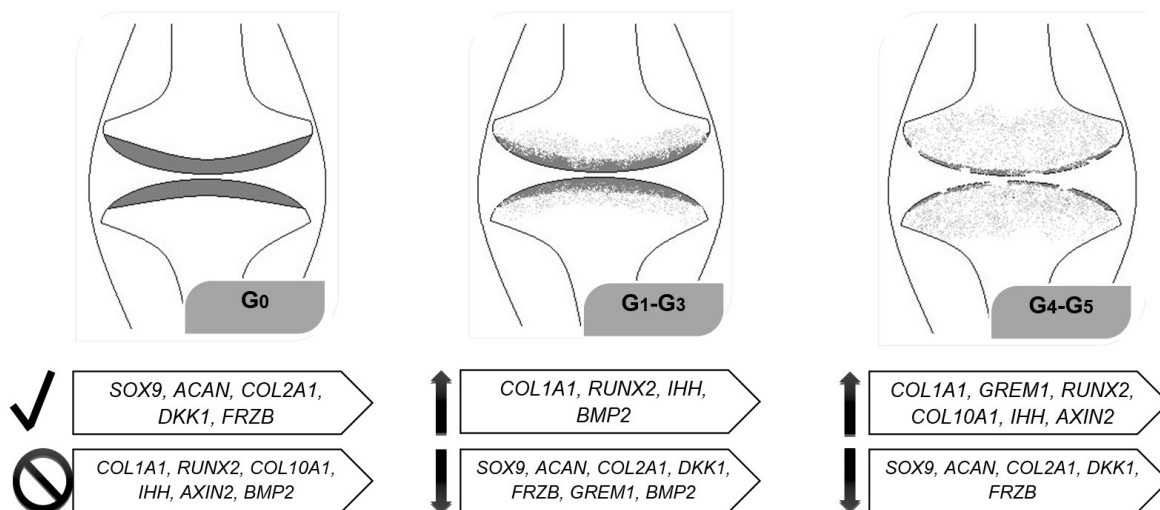
Each stage of maturation and differentiation of chondrocytes is characterized by a different gene expression pattern that determines the formation of a functional mature cell phenotype. In OA, the altered physiological status of chondrocytes also seems to be reflected on the molecular level in a modified expression pattern [10].

Microarray analysis of gene expression patterns has revealed qualitative and quantitative changes depending on the specific joint involved (knee, hip), type of cell, stage of disease, type of biological material analysed, and age of patients [11-16]. Geyer et al. showed that the gene expression pattern of cartilage in the same patient varies significantly according to whether the cells were obtained from affected or healthy tissue [11]. Interestingly, as demonstrated by Sánchez-Sabaté et al. in patients with hip OA, alterations in the gene expression pattern can also be observed for structures distant from the affected joint (iliac plate) [12]. Moreover, proteomic analysis of tissue samples and synovial fluid collected from patients with OA demonstrated dissimilarities in protein immunoexpression patterns compared to healthy subjects and those previously diagnosed with rheumatoid arthritis (RA) [17,18].

The observed modifications in gene/protein expression concern genes coding for proteins involved in bone formation, ECM protein synthesis and regulation of the immune system, chondrogenesis, angiogenesis, and „chondroprotective” genes (responsible for maintaining a stable phenotype of prehypertrophic chondrocytes) [13].

OA evolves in a multi-step manner where the gene expression signature is altered gradually in the course of the disease. The gene expression level may change gradually along with disease progression (e.g. *SOX9*, *ACAN*, *COL2A1*, *COL1A1*) whereas other genes may be expressed or not only at certain stages (e.g. *COL10A1*, *GREM1*, *AXIN2* - late OA, *BMP2* - early OA), as illustrated in Figure 1 [19].

The exact characterization of gene expression rearrangement kinetics may not only be the basis for determining the molecular level of disease progression, but also be useful in terms of the potential therapeutic target selection [10,19].



Ryc. 1. Profil ekspresji genów, a stopień zaawansowania OA

Etapy progresji choroby (G0-G5) zostały opracowane wg. Wytycznych Międzynarodowego Towarzystwa Choroby Zwrodnieniowej Stadiów (OARSI) na podstawie oceny histologicznej. Badania ujawniły stały trend kinetyki ekspresji niektórych genów (spadek/wzrost ekspresji), zależnie od etapu rozwoju choroby (G0-G5). G0 – zdrowa chrząstka stawowa, G1-G3 – wczesne stadium OA, G4-G5 – późne stadium OA [19]

Fig. 1. Gene expression profile and OA severity

The scores (0-5) represent OA severity. The scale is based on histological features according to the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) guidelines. Cartilage specimens were divided into 3 Grades: G0 (healthy cartilage), G1-G3 (early OA), G4-G5 (late OA). Certain genes have shown a steady expression trend (upregulation/ downregulation) depending on disease stage [19]

REGULACJE EPIGENETYCZNE W PRZEBIEGU OA

Badania bliźniąt monozygotycznych, które znacznie różniły się podatnością na OA, pozwoliły na postawienie hipotezy, że sama informacja genetyczna zapisana w sekwencji DNA nie determinuje podatności, czy podobnego obrazu klinicznego przebiegu choroby. Obserwacja ta skłoniła naukowców do przeprowadzenia analizy mechanizmów epigenetycznych, które mogłyby determinować zmienność w podatności osobniczej czy przebiegu choroby [4]. Są one definiowane jako stabilne modyfikacje ekspresji genów, możliwe do dziedziczenia na poziomie komórkowym, których podłożem nie są zmiany w bazowej sekwencji DNA, a mechanizmy obejmujące m.in.: regulację miRNA, metylację DNA oraz modyfikacje histonów [20–22].

miRNA

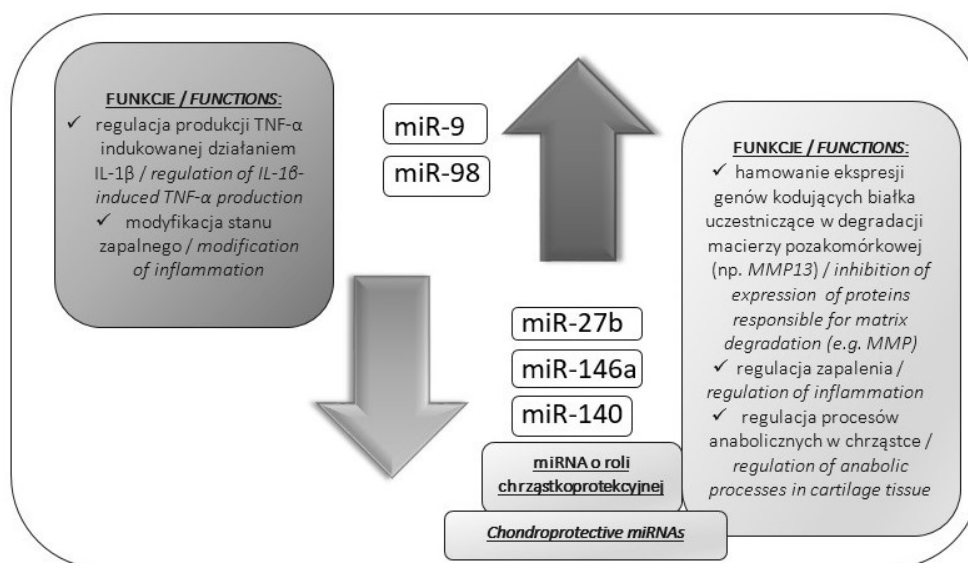
miRNA są jednoniciowymi, niekodującymi oligomerami o długości 19-25 nukleotydów, pochodzącymi z regionów genomu wykazujących aktywność transkrypcyjną. Po przyłączeniu się do regionów UTR-5' mRNA genów docelowych, miRNA mogą hamować ekspresję genów [23,24]. Ostatnio przeprowadzone badania wykazały, że miRNA mają zdolność normalizacji syntezy białek enzymatycznych odpo-

=EPIGENETIC REGULATION OF GENE EXPRESSION IN OA

Studies of monozygotic twins showing considerable differences in terms of susceptibility to OA have allowed for advancing the hypothesis that genetic information coded in the DNA sequence alone does not determine susceptibility to OA or similarity in the course of the disease. This observation prompted researchers to analyse epigenetic mechanisms that could determine variability in individual susceptibility or disease progression [4]. Molecular adjustments are defined as stable modifications of gene expression that can be inherited at the cellular level and are based not on changes in the DNA sequence, but on mechanisms that include, among others, miRNA regulation, DNA methylation and histone modifications [20-22].

miRNA

miRNAs are single-stranded, non-coding oligomers of 19-25 nucleotides derived from genomic regions that show transcriptional activity. After binding to the UTR-5' mRNA regions of target genes, miRNAs may inhibit gene expression [23,24]. Recent studies have shown that miRNAs can normalize the synthesis of enzymatic proteins responsible for ECM degradation, regulate the synthesis of proteins that are



Ryc. 2. Zmiany we wzorze ekspresji miRNA w przebiegu osteoartrozy wraz z przykładami ich funkcji
Fig. 2. Changes in the miR expression pattern in osteoarthritis with examples of miRNA function

wiedzialnych za degradację ECM, regulują syntezę białek kluczowych dla utrzymania prawidłowej struktury macierzy oraz modyfikują poziom cytokin prozapalnych w tkankach chrzęstnych [23]. Informacje te stały się podstawą do przeprowadzenia badań analizujących wzór ekspresji miRNA u osób zdrowych oraz u osób ze stwierdzoną OA [25]. Analiza wyników pozwala na odnotowanie pewnych prawidłowości, które przedstawiono na Rycinie 2.

Metylacja DNA

Zmiany we wzorze metylacji DNA (hipermetylacja/hipometylacja genomowa i promotorowa), zachodzą podczas rozwoju i różnicowania poszczególnych komórek i tkanek. W czasie życia osobniczego, zjawisko zmiany wzoru metylacji DNA (determinowane czynnikami środowiskowymi lub endogennymi), staje się wykładnikiem procesu starzenia się komórek lub procesu chorobowego [26].

Metylacja DNA jest procesem przyłączania grupy metylowej (CH₃) do cytozyny, skutkującym powstaniem 5-metylocytozyny (m⁵C). Addycja grupy metylowej zachodzi najczęściej w miejscach genomu bogatych w pary CpG (nazywanych „wyspami CpG”), zlokalizowanych głównie w okolicach regionów promotorowych genów [27].

Wyjściowym punktem do analizy zmian wzoru metylacji DNA w przebiegu OA jest analiza globalnego poziomu genomowej metylacji DNA (metylo-*mu*) w próbkach DNA pochodzących od osób zdrowych oraz uzyskanych od chorych na OA. Wyniki badań są kontrowersyjne. Opublikowano dane, które

crucial for maintaining the normal matrix structure and modify the level of proinflammatory cytokines in cartilage tissues [23]. This information became the basis for studies examining the miRNA expression pattern in healthy individuals and in those with OA [25]. Analysis of the results reveals certain regularities, as shown in Figure 2.

DNA methylation

Changes in the DNA methylation pattern (genomic and promoter hypo- or hypermethylation) take place during the development and differentiation of particular cells and tissues. During the ontogenic lifetime, the alteration of DNA methylation patterns (determined by environmental or endogenous factors) becomes an exponent of the aging of cells or of disease [26].

DNA methylation is a process whereby a methyl group (CH₃) is attached to a cytosine, resulting in the formation of 5-methylcytosine (m⁵C). The addition of the methyl group occurs predominantly at specific CpG-rich sites (called „CpG islands”) of the genome, located mainly around the promoter regions of the genes [27].

Analysis of the DNA methylation pattern in OA research begins with comparison of the global DNA methylation level between groups of healthy controls versus OA patients. The results are controversial. On the one hand, there are data that do not confirm significant differences in total genomic DNA methyla-

nie potwierdzają istotnych różnic w całkowitym poziomie metylacji genomowego DNA u chorych i zdrowych osób [3,20]. Inni autorzy wskazują na odmienne *loci* genomowej metylacji – unikalny profil metylacji – u zdrowych jak i chorych osób, a także zależnie od zajętego chorobą stawu [28].

Zmiany we wzorze metylacji określonych genów w przebiegu OA można podzielić na dwie grupy – hipermetylację promotora genu z towarzyszącym jej zmniejszeniem ekspresji genu oraz hipometylację, zwiększającą ekspresję genu. W przypadku OA będą to odpowiednio: hipermetylacyjne obniżenie ekspresji lub całkowite „wyłączenie” genów kodujących składniki chrząstki (np. geny kodujące proteoglikany oraz kolagen typu II) oraz zwiększenie ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w katabolizm chrząstki (np. geny kodujące enzymy degradujące ECM tkanki chrzęstnej – metaloproteinazy MMP oraz ADAMTS) [3,6,20]. Należy jednak tutaj podkreślić, iż istnieją geny, dla których nie udało się jednoznacznie potwierdzić związku pomiędzy obniżeniem ich ekspresji a występowaniem hipermetylacji promotora genu u chorych ze zdiagnozowaną OA, czego przykładem może być chociażby gen *ACAN* [6,29]. Aby dokładnie zdefiniować ww. związek należy przebadать cały lub znacznej wielkości region promotora genu, co nie zawsze jest możliwe ze względów praktycznych.

Modyfikacje histonów

Właściwa organizacja chromatyny jest warunkiem niezbędnym w procesie regulacji ekspresji genów – nukleosomy (odcinki dwuniciowego DNA nawinięte na oktamery histonów) wpływają represyjnie na proces transkrypcji. Precyzyjnie dostrojenie ekspresji genów jest możliwe dzięki modyfikacjom histonów. Są one katalizowane przez swoiste enzymy: metylotransferazy histonów (ang. *histone methyltransferases*, HMT), acetylotransferazy histonów (ang. *histone acetyltransferases*, HAT) czy deacetylotransferazy histonów (ang. *histone deacetylases*, HDAC). Adaptacje chromatyny wpływają na dostęp jednostki transkrypcyjnej do obszarów promotorowych genów, a także na stopień wiązania chromatyny z kompleksami regulatorowymi [3,20,30].

Największy wpływ na anaboliczny i kataboliczny fenotyp chondrocytów wywierają reakcje acetylacji i deacetylacji histonów. Obie przeciwstawnie oddziałują na proces ekspresji genów: acetylacja przyczynia się przyjmowania przez chromatynę otwartej struktury niezbędnej dla aktywacji transkrypcji. Utrata grup acetylowych w obrębie ogonów histonów powoduje ograniczenie dostępności czynników transkrypcyjnych, poprzez przywrócenie zwartej struktury

between OA patients and healthy individuals [3,20]. On the other hand, other authors point to the presence of different loci of methylation – a unique methylation profile – in healthy individuals vs. OA sufferers and also in different affected joints [28].

Changes in the methylation pattern of specific genes in OA can be subdivided into two groups: that of hypermethylation of the gene promoter with an associated reduction in gene expression and that of hypomethylation, which increases gene expression. In the case of OA, these are hypermethylation-mediated reduction or abolition of the expression of genes coding for cartilage components (e.g. genes that encode proteoglycans and type II collagen) or hypomethylation-mediated enhancement of the expression of genes that encode enzymes involved in cartilage catabolism (e.g. genes, which encode ECM cartilage degrading enzymes – the metalloproteinases MMP and ADAMTS) [3,6,20]. However, it should be emphasized that there are some genes for which the link between lower expression and hypermethylation of the gene promoter has not been unambiguously confirmed in patients with diagnosed OA, as exemplified by the *ACAN* gene [6,29]. To define this relationship precisely, an entire or large gene promoter region should be screened, which is not always possible for practical reasons.

Histone modifications

Appropriate organization of chromatin is essential for regulating gene expression. Nucleosomes (double-stranded DNA wound around histone protein cores) arrest the transcription process; thus, histone modifications are involved in the adjustment of precise gene expression. These reactions are catalyzed by specific enzymes: histone methyltransferases (HMTs), histone acetyltransferases (HATs) or histone deacetylases (HDACs). Chromatin adaptations affect the access of the transcriptional unit to the gene promoter regions, as well as the degree of chromatin binding to regulatory complexes [3,20,30].

Acetylation and deacetylation of histones exert the most marked – and opposite – effects on the anabolic and catabolic phenotype of chondrocytes. Histone acetylation is associated with transcriptional activation. The loss of acetyl groups within histone tails reduces the availability of transcription factors by restoring a condensed chromatin structure and enhancing the interaction between DNA and histones [3,24].

Increased catabolism and reduced synthesis of ECM proteins have been found in studies of OA pathogenesis. Elevated expression levels of *HDAC1* and *HDAC2* have shown to be a repressive factor for

ry chromatyny i wzmocnieniu interakcji pomiędzy DNA a histonami [3,24].

W patogenezie OA zaobserwowano zwiększony katabolizm białek ECM oraz zmniejszoną ich syntezę. Wykazano, że podwyższony poziom *HDAC1* i *HDAC2* w przebiegu choroby skutkuje represją transkrypcji genów kodujących białka macierzy – *COL2A1* i *ACAN*. Z kolei protekcyjny wpływ *HDAC4* polega na blokowaniu aktywności Runx2, co zapobiega hipertrofii chondrocytów [3,24,30]. Reakcje acetylacji histonów mogą odgrywać istotną rolę w nasilaniu katabolizmu chrząstki poprzez wpływ na ekspresję proteinaz. Różnicę w ekspresji *HDAC* pomiędzy chrząstką zdrową a objętą OA zaobserwowano w przypadku *HDAC7*. Wysoka jej aktywność korelowała z aktywnością *MMP13*. Wykazano, że zwiększona ekspresja genu *HDAC7* przyczynia się do inicjacji transkrypcji genu kodującego metaloproteinazę *MMP13*. Ekspresja metaloproteinaz jest stosunkowo niska w prawidłowej tkance chrzęstnej. W przebiegu OA wysoka aktywność *ADAMTS-4* i *ADAMTS-5* odpowiada za rozkład agrekanu, a *MMP13* – to główna kolagenaza degradująca kolagen typu II [3,20,24,30].

W aspekcie rozwoju OA coraz większą uwagę zwraca się na sirtuinę 1 (*Sirt1*). Białko to jest kluczowe dla przeżycia chondrocytów – hamuje apoptozę. *Sirt1* w warunkach hipoksji ma zdolność aktywacji *HIF-2 α* , przez co zwiększa się aktywność metaloproteinaz, co z kolei przyczynia się do destrukcji chrząstki. Zmniejszona immunoekspresja *Sirt1* – i związana z nią zmniejszona aktywność tego enzymu – obserwowana w niektórych stadiach OA, może korelować ze zwiększonym odsetkiem apoptozy chondrocytów i zmienionym wzorem ekspresji takich genów jak: ↓ *ACAN*, ↓ *COL2A1*; ↑ *ADAMTS5*, ↑ *COL10A1* [20,24].

NADZIEJE NA PRZYSZŁOŚĆ – TERAPIA CELOWANA

Badania przeprowadzone na hodowlach komórkowych ludzkich chondrocytów wykazały, że obecność inhibitorów deacetylaz histonów (*HDACi*) w medium hodowlanym przyczyniała się do obniżenia stężenia *iNOS* i *COX2* [3] oraz indukowanych cytokinami enzymów degradujących ECM poprzez hamowanie ich ekspresji [30]. Krótkotrwałe poddanie chondrocytów działaniu *HDACi*, skutkowało indukcją ekspresji genów anabolicznych: *COL9A1*, *COL2A1*, *COMP* i *ACAN* [24]. Pomimo uzyskania pozytywnych wyników badań przemawiających za możliwością wprowadzenia do leczenia celowanego *HDACi*, są też wyniki negatywne: zaobserwowano, że choć *HDACi* obniżają poziom ekspresji *MMP* chrząstki, to poprzez

transkrypcji genów kodujących białka macierzy *COL2A1* i *ACAN*. On the other hand, *HDAC4* exerts its protective effect on prevention of chondrocyte hypertrophy by blocking the activity of Runx2 [3,24,30]. Histone acetylation may play an important role in the intensification of cartilage catabolism by influencing the expression of proteinases. The difference in *HDAC* expression between healthy and affected cartilage has been observed with regard to *HDAC7*. High activity of these histone acetylases correlated with *MMP13* activity. This was also confirmed at the molecular level. It has been shown that increased expression of the *HDAC7* gene initiates the transcription of the *MMP13* gene. The expression of metalloproteinases is relatively low in normal cartilage. In OA, *ADAMTS-4* and *ADAMTS-5* activity is responsible for aggrecan degradation, while *MMP13* is the major collagenolytic enzyme [3,20,24,30].

As regards the development of OA, increasing attention has been paid to sirtuin 1 (*Sirt1*). This protein inhibits apoptosis and is therefore crucial for chondrocyte survival. Under hypoxic conditions, *Sirt1* has the ability to activate *HIF-2 α* , which leads to upregulation of metalloproteinase activity resulting in cartilage destruction. During certain stages of OA, reduced *Sirt1* immunexpression and, consequently, decreased activity of this enzyme may be associated with a high percentage of chondrocyte apoptosis and a modified expression pattern of genes such as: ↓ *ACAN*, ↓ *COL2A1*; ↑ *ADAMTS5*, and ↑ *COL10A1* [20,24].

HOPE FOR THE FUTURE – TARGETED THERAPY

Studies of human chondrocyte cell cultures have revealed that the presence of histone deacetylase inhibitors (*HDACi*) in the culture medium contributes to lower concentrations of *iNOS* and *COX2* [3] and cytokine-induced ECM-degrading enzymes by inhibiting their expression [30]. Short-term exposure of chondrocytes to *HDACi* resulted in the induction of expression of the anabolic genes *COL9A1*, *COL2A1*, *COMP* and *ACAN* [24]. Despite the positive results of research on the possibility of introducing *HDACi* to targeted treatment, there are also some disadvantages. It was observed that while *HDACi* lowered cartilage *MMP* expression, indirect activation of the repressor of type II collagen expression (*Wnt5*) contri-

niebezpośrednią aktywację represora ekspresji kolagenu typu II (Wnt5), przyczyniają się do supresji ekspresji *COL2A1*, a więc zjawiska niepożądanego w odniesieniu do objętej OA chrząstki, w której poziom ekspresji kolagenu typu II i tak jest już nieprawidłowy [24].

Inną hipotetyczną strategią opracowania terapii celowanej OA, opartą na wstępnych badaniach, będzie projektowanie inhibitorów miRNA, które ulegają nadekspresji (np. miR-9, miR-98) lub indukcja miRNA, których ekspresja ulega zahamowaniu (miR-140, miR-146) [20,24].

Pomimo znaczącego postępu w zakresie zrozumienia genetyczno-epigenetycznych interakcji w patogenezie OA, trwają dalsze badania nad typowaniem kolejnych celów terapeutycznych, które mogłyby być zastosowane w biologicznym leczeniu OA.

PODSUMOWANIE

Przedstawione powyżej wyniki badań dokumentują udział mechanizmów genetyczno-epigenetycznych w patogenezie OA. Należy jednak podkreślić, że dokładne wyjaśnienie wielu interakcji wymaga jeszcze przeprowadzenia dodatkowych badań funkcjonalnych na większych grupach pacjentów. Uzyskane jak dotąd wyniki, stanowią punkt wyjścia do dalszych rozważań nad opracowaniem celu zindywidualizowanej terapii biologicznej. Na podstawie analizy wyników dostępnych badań uwzględnionych w niniejszej publikacji, można przedstawić następujące wnioski: Zarówno czynniki środowiskowe, jak i interakcje genetyczno-epigenetyczne przyczyniają się do złożonej patologii OA; Wytypowano geny ryzyka OA; Różnice w ekspresji genów w OA mogą być pomocne w ocenie stopnia progresji choroby; Wskazano epigenetyczne cele terapii OA.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

1. Brandt KD, Dieppe P, Radin E. Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Med Clin North Am* 2009; 93(1): 1-24.
2. Reynard LN, Loughlin J. The genetics and functional analysis of primary osteoarthritis susceptibility. *Expert Rev Mol Med* 2013; 15: 1-16.
3. Reynard LN, Loughlin J. Genetics and epigenetics of osteoarthritis. *Maturitas* 2012; 71(3): 200-4.
4. Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12(Suppl A): 39-44.
5. Chapman K, Valdes AM. Genetic factors in OA pathogenesis. *Bone* 2012; 51(2): 258-64.
6. Chapman KE, Roach HI. Genetic and epigenetic aspects of osteoarthritis. W: Bronner F, Farach-Carson MC. *Bone and Osteoarthritis*. IV wyd. London: Springer; 2007. p. 131-48.
7. Rodriguez-Fontenla C, Calaza M, Evangelou E, et al. Assessment of osteoarthritis candidate genes in a meta-analysis of nine Genome-Wide Association Studies. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66(4), 940-9.
8. Ryder JJ, Garrison K, Song F, et al. Genetic associations in peripheral joint osteoarthritis and spinal degenerative disease: a systematic review. *Ann Rheum Dis* 2008; 67(5): 584-91.
9. Wang T, Liang Y, Li HH, et al. Single nucleotide polymorphisms and osteoarthritis: An overview and a meta-analysis. *Medicine* 2016; 95(7), e2811.
10. Lambert C, Dubuc JE, Montell E, et al. Gene expression pattern of cells from inflamed and normal areas of osteoarthritis synovial membrane. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66(4): 960-8.
11. Geyer M, Grässel S, Straub RH, et al. Differential transcriptome analysis of intraarticular lesional vs intact cartilage reveals new candidate genes in osteoarthritis pathophysiology. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17(3): 328-35.

buted to *COL2A1* downregulation, which is an undesirable effect with respect to OA-affected cartilage, in which type II collagen expression is already abnormal [24].

Another hypothetical strategy for OA targeted therapy, based on preliminary studies, will be the design of miRNA inhibitors that are overexpressed (e.g. miR-9, miR-98) or forced induction of those particles that are downregulated in OA (miR-140, miR-146) [20,24].

Despite significant advances in the understanding of genetic and epigenetic interactions in the pathogenesis of OA, further research is being carried out on choosing further therapeutic targets that could be used in the biological treatment of OA.

CONCLUSION

The above study results document the involvement of genetic-epigenetic mechanisms in the pathogenesis of OA. However, it should be emphasized that further clarification of many interactions still requires additional functional studies in larger patient groups. The results obtained to date provide a starting point for further considerations of the development of personalized biological therapy. Based on the analysis of the aforementioned available study results, the following conclusions can be made: Both environmental factors and genetic-epigenetic interactions contribute to the complex pathogenesis of OA; OA risk genes have been identified; Differences in gene expression in OA may be helpful in assessing progression of the disease; The epigenetic goals of OA therapy have been indicated.

12. Sánchez-Sabaté E, Alvarez L, Gil-Garay E, Munuera L, Vilaboa N. Identification of differentially expressed genes in trabecular bone from the iliac crest of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17(8): 1106-14.
13. Karlsson C, Dehne T, Lindahl A, et al. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* [Internet] 2010; 18(4): 581-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2009.12.002>
14. Xu Y, Barter MJ, Swan DC, et al. Identification of the pathogenic pathways in osteoarthritic hip cartilage: commonality and discord between hip and knee OA. *Osteoarthritis Cartilage* [Internet] 2012; 20(9): 1029-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2012.05.006>
15. Del Rey MJ, Usategui A, Izquierdo E, et al. Transcriptome analysis reveals specific changes in osteoarthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* [Internet] 2012; 71(2): 275-80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22021863>
16. Leijten JCH, Emons J, Sticht C, et al. Gremlin 1, frizzled-related protein, and Dkk-1 are key regulators of human articular cartilage homeostasis. *Arthritis and Rheumatism* 2012; 64(10): 3302-12.
17. Mateos J, Lourido L, Fernández-Puente P, et al. Differential protein profiling of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients using LC-MALDI TOF/TOF. *Journal of Proteomics* [Internet] 2012; 75(10): 2869-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.042>
18. Önnérjörd P, Khabut A, Reinholdt FP, Svensson O, Heinegård D. Quantitative proteomic analysis of eight cartilaginous tissues reveals characteristic differences as well as similarities between subgroups. *Journal of Biological Chemistry* 2012; 287(23): 18913-24.
19. Zhong L, Huang X, Karperien M, Post JN. Correlation between gene expression and osteoarthritis progression in human. *Int J Mol Med Sci* 2016; 17(7): 1126.
20. Barter MJ, Bui C, Young DA. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis Cartilage* [Internet] 2012; 20(5): 339-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2011.12.012>
21. Nugent M. MicroRNAs: Exploring new horizons in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* [Internet] 2016; 24(4): 573-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2015.10.018>
22. Blanco FJ, Rego-Pérez I. Is it time for epigenetics in osteoarthritis? *Arthritis Rheumatol* 2014; 66(9): 2324-27.
23. Chojnacki MM, Kwapisz A, Synder M, Szemraj J. Osteoartroza: etiologia, czynniki ryzyka, mechanizmy molekularne. *Postępy Hig Med Dosw (online)* 2014; 68: 640-52.
24. Goldring MB, Marcu KB. Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis. *Trends Mol Med* 2012; 18(2): 109-18.
25. Yu C, Chen WP, Wang XH. MicroRNA in osteoarthritis. *The Journal of International Medical Research* 2011; 39(1): 1-9.
26. Bell JT, Tsai P-C, Yang T-P, et al. Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population. *PLoS Genet* 2012; 8(4): 964-72.
27. Reynard LN. Analysis of genetics and DNA methylation in osteoarthritis: What have we learnt about the disease? *Semin Cell Dev Biol* [Internet] 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.04.017>
28. Rushton MD, Reynard LN, Barter MJ, et al. Characterization of the cartilage DNA methylome in knee and hip osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66(9): 2450-60.
29. Poschl E, Fidler A, Schmidt B, Kallipolitou A, Schmid E, Aigner T. DNA methylation is not likely to be responsible for age-related down regulation in aged or osteoarthritic cartilage. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 477-80.
30. Zhang M, Wang J. Epigenetic regulation of gene expression in osteoarthritis. *Genes Dis* [Internet] 2015; 2(1): 69-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2014.12.005>
31. Raine EV a, Dodd AW, Reynard LN, Loughlin J. Allelic expression analysis of the osteoarthritis susceptibility gene COL11A1 in human joint tissues. *BMC Musculoskelet Disord* [Internet] 2013; 14(85). doi:10.1186/1471-2474-14-85.
32. Wang L, Guo L, Tian F, Hao R, Yang T. Analysis of single nucleotide polymorphisms within ADAM12 and risk of knee osteoarthritis in a Chinese Han population. *Biomed Res Int* [Internet] 2015: 518643. doi:10.1155/2015/518643.
33. Miyamoto Y, Shi D, Nakajima M, et al. Common variants in DVWA on chromosome 3p24.3 are associated with susceptibility to knee osteoarthritis. *Nature genetics* 2008; 40(8): 994-8.
34. Zeggini E, Panoutsopoulou K, Southam L, et al. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. *Lancet* 2012; 380(9844): 815-23.
35. Liang W, Gao B, Xu G, Weng D, Xie M, Qian Y. Association between single nucleotide polymorphisms of asporin (ASPN) and BMP5 with the risk of knee osteoarthritis in a Chinese Han population. *Cell Biochem Biophys* 2014; 70(3): 1603-8.
36. He Y, Liang X, Wu X, et al. Association between interleukin 8 -251 A/T and +781 C/T polymorphisms and osteosarcoma risk in Chinese population: a case-control study. *Immunol Letts* 2014; 37(5): 207-11.

Liczba słów/Word count: 6180

Tabele/Tables: 1

Ryciny/Figures: 2

Piśmiennictwo/References: 36

Adres do korespondencji / Address for correspondence

mgr Aleksandra Snochowska, Zakład Molekularnych Podstaw Medycyny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Pomorska 251, budynek C5

tel. (42) 272-57-92, e-mail: ola.snochowska@gmail.com

Otrzymano / Received 20.03.2017 r.

Zaakceptowano / Accepted 15.05.2017 r.