



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departament de MEDICINA

**ESTUDI DE LA IMPLICACIÓ DELS PETITS PROTEOGLICANS
RICS EN LEUCINA I LES METAL-LOPROTEASES EN ELS
MECANISMES PATOLÒGICS DE L'ARTROSI**

Tesi doctoral presentada per Jordi Monfort i dirigida per Juan Pedro-
Botet, per optar al grau de Doctor en Medicina

Jordi Monfort

Dr. Juan Pedro-Botet

Barcelona, 2013

"Havia donat mitja volta de sobte, i el seu llarg i fi dit assenyalava un orifici que travessava el marc inferior de la finestra, a uns dos centímetres de la vora.

- Per Sant Jordi! -va exclamar l'inspector-. Com ha pogut trobar això?

- Ho he trobat perquè ho estava buscant"

El Misteri dels Ballarins

Sir Arthur Conan Doyle

" Oh! Qui tinguéss una Mussa de foc que escalés al més brillant cel de la invenció!"

Enric V

William Shakespeare

A l'Alba, el Jordi i el Francesc pel seu amor incondicional

*A la meva mare Kati i la Pili Daví perquè en el seu cor vellet hi he trobat sempre el cau de
la tendresa*

Al meu germà Xavier per la bellesa del seu cor

*A la dolça memòria del meu pare que va saber descobrir el metge que hi havia dins meu i
d'en Jaume Gurt per la seva immensa bondat*

*Als meus amics Martí Pons, Vicente Bertolín, Aurelio Modrego, Toni Gutiérrez, Delfí Rotés,
Josep Vergés i Jaume Gurt per haver-me ensenyat el valor de la paraula amistat*

Agraïments

El meu primer agraïment al Dr Joan Carles Pedro-Botet. Per la seva dedicació i ajuda en tots els moments d'aquesta tesi. Li professo l'admiració més absoluta per saber ser tan bon metge, tan bon mestre i tan bon amic

Voldria agrair als Drs Jordi Carbonell i Pere Benito, el fet d'haver-me donat l'oportunitat de treballar al Servei de Reumatologia de l'Hospital del Mar. Tenen i tindran el meu respecte per dirigir un Servei amb tanta saviesa i bondat

Voldria també mostrar el meu agraïment envers els meus companys del Servei de Reumatologia de l'Hospital del Mar sobretot per saber fer fàcil el complicat art de treballar en equip. Moltes de les coses que he fet porten el segell de la seva col·laboració

Menció especial per la Laura Tío i la Jone Llorente, sense oblidar-me és clar de l'Aina Farran. Elles són el nucli dur de la unitat d'artrosi, però són sobretot la il·lusió i la intel·ligència en perfecta harmonia, són el treball dur, duríssim però combinat amb l'alegria, el seny i la rauxa, són en definitiva el futur en majúscules i jo un ésser afortunat pel plaer de treballar amb elles cada dia.

El meu agraïment a la resta dels investigadors que treballen o han treballat a la Unitat de Recerca en Fisiopatologia Òssia i Articular en especial a la Natàlia García. La seva contribució en els primers treballs publicats va ésser decisiva

Un agraïment especial per la Mònica Gratacòs. Sense el rigor de les seves correccions i la seva ajuda aquesta tesi difícilment hagués vist la llum

El meu sincer agraïment als Drs Pelletier i tota la gent que treballa al seu laboratori a Montreal, Ginette Tardif, François Mineau, Alex Watson, David Hum, Changshan Geng, Martin Boily i François-Cyril Jolicoeur. Va ésser un goig treballar amb ells durant dos anys. A tots ells els hi dec les primeres passes fermes en el terreny de la recerca

A la resta d'investigadors de la Unitat d'Investigació en Cartílag de l'Hospital Notre-Dame a Montreal i molt especialment al Daniel Lajeneusse i el Hassan Fahmi per les incontables qüestions resoltes, sempre amb un somriure als llavis

Al Dr Peter Roughley que em va proporcionar part dels anticossos que he utilitzat en els diversos treballs de recerca. En va tenir prou amb una conversació per obrir-me les portes del seu laboratori al Shriners's Hospital for children de Montreal

A Christelle Boileau per ajudar-me tant durant les llargues hores d'experimentació a la Unitat de Recerca en Cartílag de l'Hospital Notre-Dame a Montreal i perquè la seva amistat m'acompanya a cada revolt del camí

El darrer dels mots per mostrar la meva gratitud a Pascal Reboul. Pascal és per a mi tot el que un científic hauria d'ésser, rigorós, honest i precís. Ell va estat darrera de cada càlcul i cada hipòtesi dels meus primers treballs de recerca. A banda d'això a ell i a la seva família els hi dec les més belles imatges del hivern del Quebec.

SUMARI

SUMARI	7
LLISTAT D'ABREVIATURES	9
INTRODUCCIÓ	11
L'artrosi	13
Definició.....	13
Epidemiologia, factors de risc i cost econòmic.....	14
Diagnòstic i classificació.....	15
Tractaments.....	15
Fisiologia Articular	17
Component cel·lular del cartílag: el condrocit.....	17
La matriu extracel·lular del cartílag.....	17
Col·lagen.....	18
Proteoglicans.....	18
PGs de la família de l'agrecà.....	18
PGs no agregats.....	19
SLRPs de Classe 1.....	22
SRLPs de Classe 2.....	23
SLRPs de Classe 3.....	25
SLRPs de Classe 4.....	25
SLRPs de Classe 5.....	26
Citoarquitectura del cartílag articular.....	26
Propietats biomecàniques del cartílag articular.....	28
Fisiopatologia de l'artrosi	29
Mecanismes patogènics de l'artrosi.....	29
Les agrecanases.....	33
Les metal·loproteases de la matriu.....	34
Perspectives de futur	38
Biomarcadors.....	38
Tractaments de futur.....	40
JUSTIFICACIÓ DE LA TESI, HIPÒTESI I OBJECTIUS	45
RESULTATS	49
1. Estudi de la resposta del cartílag normal i artròsic a la càrrega mecànica.....	51
2. Estudi del perfil proteolític d'MMP-13 en la degradació de diferents SLRPs del cartílag normal i artròsic.....	65
3. Identificació i caracterització del SLRP opticina en teixits articulars humans.....	77

DISCUSIÓ	88
CONCLUSIONS	105
BIBLIOGRAFIA	109

LLISTAT D'ABREVIATURES

OA	Artrosi
OMS	Organització mundial de la Salut
ACR	Col·legi Americà de Reumatologia
EULAR	Lliga Europea contra el Reumatisme
OARSI	Societat Internacional de Recerca en Artrosi
AINEs	Antiinflamatoris no esteroïdals
SYSADOA	Modificadors dels símptomes d'acció lenta en OA
CS	Condroítin Sulfat
MEC	Matriu extracel·lular
AH	Àcid hialurònic
PGs	Proteoglicans
GAGs	Glicosaminoglicans
SLRP	Petits proteoglicans rics en leucina
LRR	Regió rica en residus de leucina
PDL	Lligament periodontal
KO	Knock-out
TGF	Factor de creixement transformant
BMP	Proteïna morfogènica de l'os
PRELP	Prolargina
FGF	Factor de creixement fibroblàstic
ON	Òxid nítric
PGE-2	Prostaglandina E-2
IL	Interleucina

TNF- α	Factor de necrosi tumoral
MMP	Metal·loproteasa de matriu
TIMPs	Inhibidors tissulars de les MMPs
ADAMTS	Desintegrines i metal·loproteases amb un domini trombospondina
COMP	Proteïna oligomèrica de la matriu del cartílag
MT-MMP	MMPs de tipus membrana
DMOAD	Teràpies modificadores de la malaltia OA
CTX-II	Telopèptid C del col·lagen II
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
RMN	Ressonància magnètica nuclear

INTRODUCCIÓ

L'ARTROSI

Definició

L'artrosi (osteoartritis [OA] per la seva terminologia anglesa) és una malaltia crònica caracteritzada per la degeneració idiopàtica de l'articulació. Una articulació és la unió entre dos ossos, formada per una sèrie d'estructures mitjançant les quals aquests s'uneixen entre sí. Les funcions més importants de l'articulació són la de formar ponts d'unió entre els diferents components de l'esquelet, facilitar els moviments mecànics i permetre el creixement. Quan hi ha una alteració mecànica o fisiològica que compromet la funció, afectant la mobilitat i/o la capacitat de suportar les forces de tensió i compressió a les que es troba sotmesa l'articulació, poden aparèixer diferents patologies, entre les que destaca l'OA per la seva elevada prevalença.

Les articulacions es poden dividir en sinovials, fibroses i cartilaginoses segons la seva estructura (Athesian and Mow, 2005). L'articulació sinovial està considerada com un únic òrgan complex format per diferents teixits: l'os subcondral, el cartílag articular, la membrana sinovial, els tendons, els lligaments i la càpsula articular. L'OA afecta bàsicament a les articulacions sinovials que suporten pes, com ara els genolls o els malucs, però també a altres sense suport de pes, com les mans, o articulacions fibroses, com la columna vertebral. Inicialment, l'OA va ser identificada com una malaltia que afectava només al cartílag articular, ja que la patologia es detecta primerament per la degradació d'aquest teixit. Actualment, però, és àmpliament acceptat que en l'OA es troben involucrats la totalitat dels teixits de l'articulació, ja que la degradació del cartílag porta a la inflamació de la membrana sinovial i la remodelació de l'os subcondral (Samuels et al., 2008) i a més afecta al menisc (en el cas concret del genoll) així com als teixits tous com ara tendons, lligaments i músculs. Tots aquests canvis s'acompanyen de dolor persistent, condueixen a una pèrdua de la capacitat de moviment i suposen un impacte real en la qualitat de la vida dels pacients.

Epidemiologia, factors de risc i cost econòmic

La incidència i prevalença de l'OA depèn de la definició que s'utilitza i de com es determina el seu inici, però en qualsevol cas, és la malaltia musculoesquelètica més comuna. S'estima que afecta a un 3,6% de la població mundial (Vos et al., 2012), i que un 9,6 d'homes i el doble (18%) de dones majors de 60 anys té OA simptomàtica (Woolf and Pfleger, 2003). A l'Estat Espanyol, la prevalença de l'OA simptomàtica de genoll i mans és del 10,2% i 6,2%, respectivament (Fernandez-Lopez et al., 2008).

A més del sexe, l'edat és el primer factor de risc no modificable associat amb el desenvolupament de la malaltia. Així, la incidència s'incrementa exponencialment a partir dels 40 anys i arriba al 60% en majors de 65 anys, trobant-se evidències radiològiques de la malaltia en alguna articulació en la gran majoria d'individus majors de 60 anys (Dieppe and Lohmander, 2005). Altres factors de risc associats són el pes i l'ètnia: s'ha descrit una incidència més elevada en individus obesos (índex de massa corporal $>30\text{Kg/m}^2$) (Samuels et al., 2008) i un risc dues vegades major en dones afroamericanes respecte les caucasianes (Felson et al., 1987). Finalment, cal afegir la predisposició genètica (Im and Choi, 2013) i altres factors de risc generals o locals, com ara un augment de la massa òssia, un trauma o l'estrès mecànic repetit, la laxitud lligamentosa i articular, o la pràctica d'esports d'elit (Spector et al., 1996; Tveit et al., 2012).

El darrer informe de la Organització Mundial de la Salut (OMS) sobre anys viscuts amb discapacitat situa l'OA en 11è lloc i n'és la causa més comuna a llarg termini en les persones de més de 65 anys d'edat de tots els grups ètnics (Vos et al., 2012). El tractament i l'incapacitat que acompanya l'OA s'associa a despeses sanitàries i socioeconòmiques molt elevades (Bitton, 2009). En el cas de l'Estat Espanyol, el cost anual mitjà dels recursos directes (diagnòstic, tractament i seguiment) o indirectes (pèrdua de productivitat laboral, ajuts econòmics, etc.) destinats a l'OA de genoll i maluc és de 917€ per pacient simptomàtic (Loza et al., 2009).

Donada l'alta prevalença de la malaltia en edats avançades i el progressiu envelliment de la població, s'ha estimat que la mitjana de persones amb OA al 2030 serà d'un 22% als Estats

Units (Elders, 2000). Aquestes xifres són alarmants i prediuen un augment progressiu de les despeses socio sanitàries que requereix la seva atenció.

Diagnòstic i classificació

El diagnòstic de l'OA es pot fer sense necessitat de res més que les troballes clíniques o combinant les clíniques i radiològiques, ja que la presència d'OA radiològica no implica necessàriament que hi hagi símptomes associats. Els signes i símptomes clínics cardinals en l'OA inclouen dolor mecànic a les articulacions, pèrdua de la funció, rigidesa després d'un període curt d'inactivitat i crepitacions de l'articulació. Les articulacions més freqüentment afectades per la degeneració articular són les de les mans, els malucs, els genolls, els peus i la columna vertebral, però poden afectar qualsevol altra articulació, ja sigui sinovial o no. Tot i que la malaltia pot ser monoarticular, en general els pacients pateixen OA en més d'una articulació. Els signes radiològics clàssics són la disminució de l'espai articular, presència d'osteòfits, esclerosi subcondral i quists ossis.

Hi ha diferents guies clíniques i recomanacions pel diagnòstic i classificació de l'OA que varien segons les diferents localitzacions anatòmiques, com les del Col·legi Americà de Reumatologia (ACR) (Altman et al., 1991; Altman et al., 1990), la Lliga Europea contra el Reumatisme (EULAR) (Zhang et al., 2009b; Zhang et al., 2010a) o la Societat Internacional de Recerca en Artrosi (OARSI) (Zhang et al., 2010b). El més utilitzat és la de l'ACR, tot i que és discutible que els seus criteris es puguin extrapolar a la població general donat que deriven de pacients d'un entorn hospitalari.

Tractaments

Els tractaments disponibles fins al moment per l'OA són només simptomàtics, és a dir, ajuden a alleujar cert grau del dolor i la inflamació, però no incideixen sobre la progressió de la malaltia ni eviten la degradació de l'articulació per mantenir la seva integritat i preservar la funció articular. El consens és que s'ha de fer servir un abordatge terapèutic que combini el tractament farmacològic amb el no farmacològic (**Figura 1**) (Jordán, Arden et al 2003; Zhang, Doherty et al 2005; Zhang, Moskowitz et al 2007; Zhang, Moskowitz et al 2008; Zhang, Nuki et al. 2010).

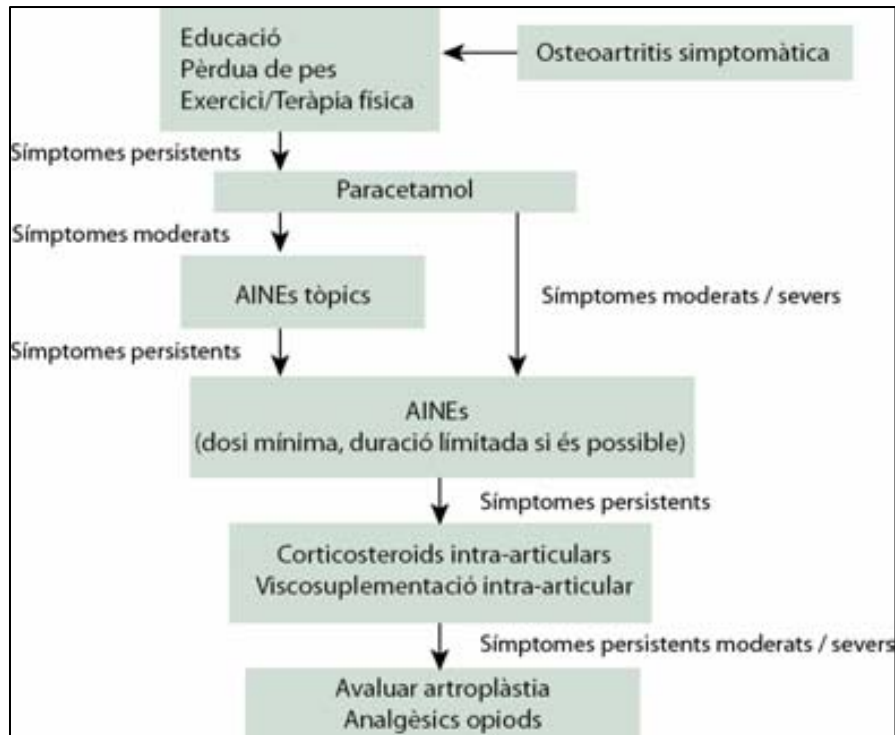


Figura 1. Esquema de l'estratègia terapèutica en l'OA.

Els tractaments no farmacològics inclouen l'educació del pacient amb la modificació o adaptació d'estil de vida, la pèrdua de pes i la realització d'exercici per tal de reduir la càrrega sobre les articulacions afectades. L'abordatge farmacològic és similar per totes les localitzacions i el tractament de primera elecció és el paracetamol, que és segur, eficaç i ben tolerat. Quan el paracetamol no és suficient, es pot recórrer als antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs). Si els efectes secundaris gastrointestinals associats als AINEs són un problema, es poden combinar amb un inhibidor de la bomba de protons o es pot utilitzar un inhibidor selectiu de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). A més d'aquests fàrmacs que modifiquen ràpidament la simptomatologia, hi ha fàrmacs coneguts com a modificadors dels símptomes d'acció lenta (SYSADOA, de l'anglès *Symptomatic Slow Action Drugs for OA*), com ara, el condroitín sulfat (CS), la diacereïna o el sulfat de glucosamina. Tots ells han demostrat ser eficaços en l'OA (Brzusek and Petron 2008; Fidelix et al., 2006; Kubo et al., 2009; Vangness et al., 2009), tot i que els resultats són en alguns casos controvertits (Wandel et al., 2010). Si els símptomes de la malaltia persisteixen, es recomana l'administració intra-articular de corticosteroides, en els casos amb un component inflamatori important, o la viscosuplementació intra-articular en forma d'àcid hialurònic (AH) o hialuronat. En alguns

pacients en els que el dolor associat amb la patologia és important, especialment en fases avançades de la malaltia, es pot recórrer a l'ús d'opioides com la codeïna o el tramadol, entre d'altres. Finalment, i si els símptomes persisteixen i són moderats o severes, es pot efectuar la substitució de l'articulació mitjançant la col·locació de pròtesis complertes o parcials per tal de millorar el dolor i recuperar la funció articular.

FISIOLOGIA ARTICULAR

El cartílag articular, també anomenat cartílag hialí pel seu alt contingut en AH, cobreix les articulacions diartrodials (permeten gran varietat de moviment). La seva funció principal és la de disminuir la fricció pròpia dels moviments de l'articulació, així com absorbir i dissipar les càrregues mecàniques (Poole et al., 2001). Aquestes capacitats li són conferides principalment per la seva composició i estructura. Com tots els teixits, el cartílag es compon de cèl·lules mesenquimals i d'una matriu extracel·lular (MEC) secretada per aquestes.

Component cel·lular del cartílag: el condròcit

Els condrocits són l'únic tipus cel·lular que es troba en el cartílag i suposen només un 2% del seu volum total. La seva funció és sintetitzar els diferents components de la MEC del cartílag i s'encarreguen del seu remodelatge, ja que són els responsables de mantenir la resposta a estímuls com una lesió o la càrrega, incrementant la síntesi de col·lagen i proteoglicans (PGs) (Sophia Fox et al., 2009).

La matriu extracel·lular del cartílag

En relació al pes total, la MEC del cartílag està formada per un 70-80% d'aigua i sals inorgàniques, essent la resta sòlida. En relació al pes sec, està composta d'un 50-60% de col·lagen, un 30-35% de PGs, i un 15-20% de glicoproteïnes i proteïnes no col·lagen (Sophia Fox et al., 2009). L'aigua té un paper important en el manteniment de la plasticitat del teixit i també contribueix a la seva nutrició i lubricació (Mow and Rosenwasser, 1987). El col·lagen li confereix la resistència a la tensió i els PGs estableixen les fibres de col·lagen i proporcionen elasticitat al teixit (Kempson et al., 1973; Kempson et al., 1976)

Col·lagen

El col·lagen del cartílag articular es troba organitzat en fibres que formen una xarxa. El principal col·lagen d'aquest teixit és el tipus II (Buckwalter et al., 1991; Mankin and Brandt, 1992). Els altres tipus de col·lagen, anomenats menors perquè representen una petita porció del col·lagen del cartílag, inclouen els tipus V, VI, IX, X i XI (Buckwalter et al., 1991; Eyre, 1991; Mankin and Brandt, 1992). Les funcions dels col·làgens menors no es coneixen bé, però podrien contribuir de forma important a l'organització estructural de la matriu (Eyre, 1991). A més de les propietats mecàniques de les fibres de col·lagen, les més importants de les quals són la rigidesa i la resistència a la tracció, els enllaços entre les molècules de col·lagen i altres proteïnes de la MEC són comuns i importants pel manteniment de l'arquitectura del cartílag (Buckwalter and Mankin, 1998).

Proteoglicans

Els PGs constitueixen la segona porció major de la fase sòlida en el cartílag articular i es poden trobar de manera individual units a altres components matricials o formant part d'agregats supramoleculars complexos. Aquestes estructures estan formades per monòmers de proteoglicà de mida variable que s'agreguen a un esquelet central d'AH (Buckwalter, Smith et al 1989; Hardingham i Bayliss 1990). Segons la seva capacitat d'agregació a l'AH, els PGs es divideixen en dos subtipus: els PGs de massa molecular elevada (o agregans, ja que estan representats en la seva majoria per l'agrecà) i els de massa molecular reduïda, que no es troben formant agregats (PGs no agregats) (Knudson and Knudson, 2001).

PGs de la família de l'agrecà

Dins d'aquesta família trobem els PGs versicà, neurocà, brevicà i el propi agrecà. Aquests PGs es componen d'un esquelet proteic lligat a una o més cadenes de glicosaminoglicans (GAGs). Les molècules de GAGs són una llarga cadena de repetició d'oligosacàrids: condroitín 6-sulfat (que és el més abundant i representa el 60-90%), condroitín 4-sulfat i queratà sulfat. L'estructura d'aquests PG consta de 6 dominis estructurals diferents: hi ha tres dominis globulars (G1, G2 i G3) i dues regions d'unió a GAGs (E1 i E2), una d'elles

INTRODUCCIÓ

dividida en 2 regions, segons els GAGs que s'uneixen (Hardingham, Fosang et al. 1994) (**Figura 2**). Els monòmers individuals són sintetitzats dins de la cèl·lula i posteriorment secretats a la MEC, on es dona l'agregació amb l'esquelet d'AH (Buckwalter, Smith et al 1989;. Hardingham i Bayliss 1990) per mitjà d'una proteïna anomenada proteïna d'unió (*link protein*).

La funció principal de l'agrecà és distribuir la càrrega, una funció fonamental en una articulació que suporta pes, ja que actuen en la MEC com un gel hidratat atrapat en una xarxa insoluble de col·lagen (Knudson and Knudson, 2001). Això és possible perquè tenen càrregues negatives que atrauen l'aigua, generant una pressió osmòtica que és contrarestada per les forces de tracció de la xarxa de col·lagen. Quan el cartílag rep pressions, l'aigua surt, cosa que augmenta la concentració d'agrecans que retroben el seu estat original de gel (Handley, Lowther et al, 1985;. Heinegard i Oldberg 1989).

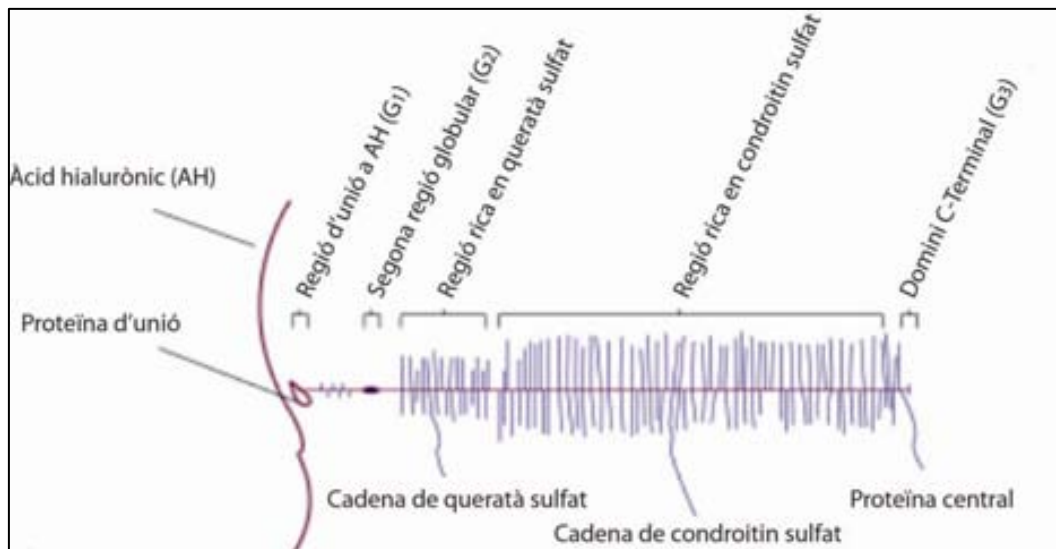


Figura 2. Detall de l'estructura d'un monòmer de proteoglicà de la família agrecà, que mostra cadenes de CS i queratà sulfat i la interacció amb l'AH i la proteïna d'unió. El domini globular N-terminal (G1) conté un lloc d'interacció amb AH i també amb la proteïna d'unió. El domini G2 no interactua amb cap proteïna de la matriu i la seva funció precisa segueix sent desconeguda. El tercer domini globular (G3) es troba a l'extrem carboxil-terminal i sembla estar implicat en les interaccions amb altres glicoproteïnes de la MEC. Dues regions s'estenen entre el dominis globulars: un domini curt (E1) està entre G1 i G2 i una regió més gran (E2) estesa entre G2 i G3 que conté els llocs d'unió a queratà sulfat i CS. Adaptat de Lee et al (DeLee)

PGs no agregats

Tot i que els PGs no agregats a AH representen només un 1-2% de la massa total de PGs del cartílag (Kresse et al., 1993), estan en proporcions molars similars a les del grans

INTRODUCCIÓ

agregats. Entre els PGs no agregats es troba la família dels SLRPs (de l'anglès *Small Leucine-Rich Proteoglycans*) (Iozzo, Crit Rev Biochem, mol ; Biol, 1997 ; Hocking, Matrix Biol, 1998 ; Iozzo, JBC, 1999). Els SLRPs són PGs de baix pes molecular que es caracteritzen per la presència, dins la seva cadena polipeptídica, d'un domini ric en leucina, que habitualment conté entre 10 i 11 repeticions d'aquest aminoàcid (Kalamajski and Oldberg, 2010). Els SLRPs estan particularment involucrats en la regulació de l'estructura de la matriu, en particular en el manteniment de la distància entre les fibres de col·lagen (Hedbom and Heinegard, 1993), així com en el manteniment i creixement de diversos teixits com ara la còrnia, l'os, les dents, el cartílag, la pell, els tendons i els vasos sanguinis (Knudson and Knudson, 2001). Aquestes capacitats es deuen al seu domini ric en leucina, ja que és la regió on s'acumulen la gran majoria de cadenes de GAGs. Al mateix temps, aquesta regió és la responsable del procés d'adhesió i migració cel·lular.

L'estructura proteica dels SLRPs consta d'un pèptid senyal, un propèptid que controla la substitució de GAGs i l'esmentada regió rica en leucina (LRR) flanquejada per regions riques en cisteïna, que en la regió N-terminal conté típicament 5 residus i on les tirosines poden estar sulfatades o unides a GAGs (**Figura 3**). La família dels SLRPs té actualment 17 membres que comparteixen propietats funcionals i es classifiquen en cinc classes en base a la conservació i homologia a nivell proteic i genòmic, a la seqüència del clúster ric en residus cisteïna a l'extrem N-terminal i a la seva organització cromosòmica (**Figura 3**).

A la **Taula 1** es presenten resumidament les característiques dels principals SLRPs, i a continuació es fa una breu revisió d'aquestes en funció de la classe a la que pertanyen.

Taula 1. Característiques de cadascun dels SLRPs

SLRP	Teixit(s) on s'expressa	Fenotip en models KO	Sobreexpressat en
Biglicà	Pell, tendó, os, cartílag fetal i madur, ronyó, múscul i lligament periodontal (PDL)	Retard en el creixement post-natal, reducció de la massa òssia, ruptura aòrtica i tendons dèbils	Fibrosi i aterosclerosi
Decorina	Pell, tendó, os, cartílag fetal i madur, ronyó, múscul i PDL	Assemblatge de les fibres desorganitzat, amb pell fràgil, tendons dèbils, menor resistència de les vies aèries, retard en la cicatrització i angiògenesis	Fibrosi, càncer i aterosclerosi
Asporina	Fetge, cor, aorta, úter, pericondri, periosti, predentina i PDL		Esclerodèrmia i OA
Fibromodulina	Tendó, lligament, cartílag, predentina i PDL	Tendons dèbils i OA	Amb l'edat de forma natural i en la fibrosi, càncer i aterosclerosi
Lumicà	Estesa, predentina i PDL	Pell fràgil i còrnia aplanada	Amb l'edat de forma natural i en esclerodèrmia i càncer
PRELP	Cartílag, pulmó, ronyó i pell		
Osteoadherina	Os mineralitzat, tendons, medul·la òssia i a la interfase entre os i cartílag en el cap femoral		
Queratocà	Còrnia, escleròtica, tendó, lligament i cartílag	Còrnia més prima i aplanada	
Epificà	Cartílag epifisari		Desenvolupament embrionari
Opticina	Vitri, iris, retina, lligaments i pell		
Osteoglicina	Còrnia, escleròtica, os, cartílag i pell	Pell lleugerament fràgil, però còrnia normal	
Condroadherina	Cartílag, tendons, còrnia, cristal·lí i retina i medul·la òssia		
Tsukushin	Estria primitiva i nòdul de Hensen (gastrulació)		

SLRPs de Classe 1

Els principals components d'aquesta classe són el biglicà, la decorina i l'asporina. La regió N-terminal d'aquests SLRPs presenta una estructura típica formada per un clúster cisteïna que forma dos enllaços disulfur (**Figura 3**).

La decorina i el biglicà tenen una considerable homologia, s'expressen tant en el cartílag fetal com en el cartílag madur (on es troben en les mateixes proporcions que l'agrecà) i són més abundants a la superfície i a les àrees al voltant dels condrocits (Poole et al., 1996). En models *in vitro* i *in vivo* de condrocits i osteoblasts, s'ha demostrat que la decorina i el biglicà tenen més afinitat pel col·lagen tipus II que per a altres tipus de col·lagen, però el col·lagen s'uneix preferentment al biglicà (Douglas et al., 2006). Recentment s'ha demostrat que en la còrnia la formació de fibres de col·lagen és coordinada per un mecanisme de col·laboració entre decorina i biglicà (Zhang et al., 2009a). De fet, les diferents capacitats d'unió de decorina i biglicà a diferents tipus de col·lagen fan d'aquestes molècules importants candidates en el camp de la enginyeria de teixits (Douglas et al., 2006).

El biglicà presenta dues cadenes de condroitín i dermatà sulfat (**Figura 3**). La seva funció està relacionada amb la regulació de la massa i estructura òssia (Wallace et al., 2006), ja que s'ha vist que els ratolins deficients per biglicà -i que presenten nivells normals de decorina- mostren un retard en el creixement post-natal, però no defectes en les fibres de col·lagen tipus II. A més d'unir-se al col·lagen II, el biglicà pot unir-se al col·lagen tipus VI (Wiberg et al., 2001).

Pel que fa a la decorina, la seva forma de ferradura i la mida del seu arc poden ésser considerades com un model d'interacció amb la triple hèlix de col·lagen (Knudson and Knudson, 2001). Quan la decorina s'uneix a la superfície de les fibres, l'assemblatge de més triples hèlix queda bloquejada, determinant així el diàmetre final de la fibra (Hedborn i Heinegard 1993;. Schönherr, Hausser et al 1995). Els models murins knock-out (KO) per decorina mostren un assemblatge de les fibres desorganitzat i amb propietats de tensió reduïdes de la pell (Danielson et al., 1997) tot i que alguns autors no referencien canvis en el diàmetre de les fibres de col·lagen tipus II en aquest model animal (Knudson and Knudson,

2001). Per altra banda, la cadena polipeptídica de la decorina pot interaccionar amb altres components matricials, com ara la fibronectina i la trombospondina, inhibint l'adhesió dels fibroblasts a aquests substrats (Schmidt et al., 1991; Winnemoller et al., 1991; Winnemoller et al., 1992), així com la unió de la fibromodulina a les fibres de col·lagen (Viola et al., 2007). A més d'interaccionar amb el factor de creixement transformant (TGF) β , també ho fa amb la proteïna morfogènica de l'os (BMP)-2 i regula la seva activitat (Ikegawa, 2008).

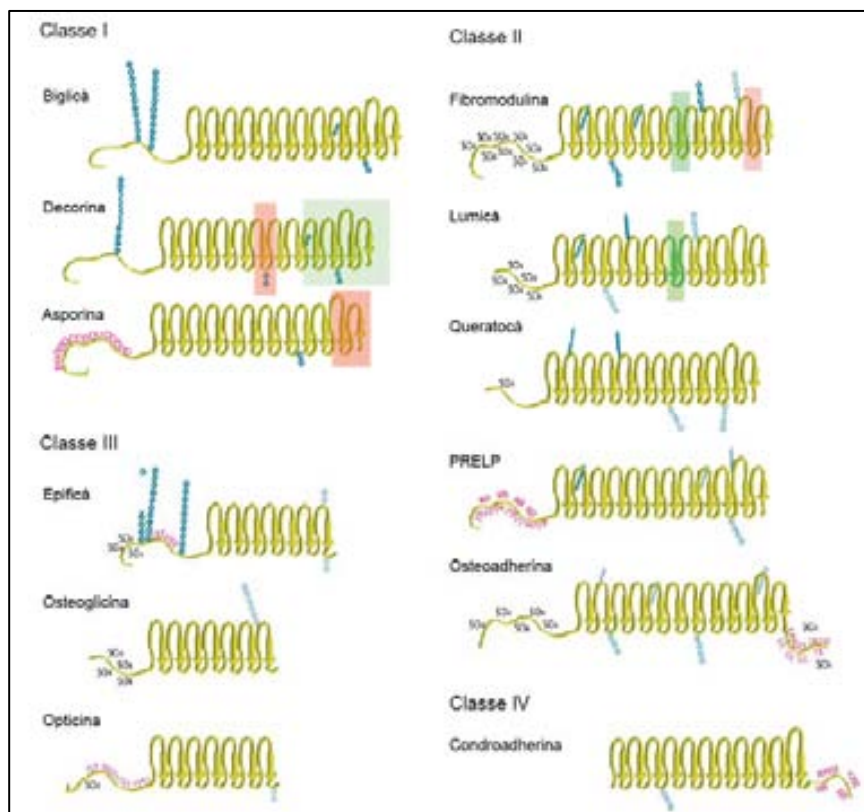


Figura 3. Esquema de la família d'SLRPs. Les regions identificades com a unió a col·lagen es mostren com a rectangles vermells (alta afinitat) i verds (baixa afinitat). Les modificacions proteiques es mostren com segueix: glicosilacions (cadena blava) que s'han confirmat experimentalment (cadena sòlida) o potencials extrapolades de seqüències consens de proteïnes (cadena semisòlida); les possibles tirosines sulfatades es marquen com a SO₄. Les lletres vermelles indiquen aminoàcids característics en els SLRPs específics. (Adaptat de Kalamajski i Oldberg (Kalamajski and Oldberg, 2010))

SRLPs de Classe 2

Aquesta classe de SLRPs està formada per la fibromodulina, el lumicà, el queratocà, la prolargina (PRELP) i l'osteoaderina. Tots ells contenen un clúster de tirosina sulfatada a la regió N-terminal (Schaefer and Iozzo, 2008) (**Figura 3**).

INTRODUCCIÓ

La fibromodulina és el principal representant de la classe II i en la seva estructura té 4 cadenes de queratà sulfat (Plaas et al., 1990). S'expressa en la majoria de teixits i al cartílag humà la seva expressió augmenta de manera natural amb l'edat. És capaç d'unir-se al col·lagen, actuant també com un factor regulador de la formació de les fibres de col·lagen tipus I i II (Hedbom and Heinegard, 1989; Scott and Haigh, 1985a, b) i de les interaccions amb altres components de la matriu, incloent altres SLRPs. Els estudis de microscòpia electrònica mostren que pot jugar una paper important en el procés de maduració de les fibres i, en particular, en la formació de la xarxes i en l'optimització de les propietats tènsils del teixit (Svensson et al., 1999).

El lumicà, com la fibromodulina, també té quatre cadenes de queratà sulfat (**Figura 3**) i la seva expressió també augmenta en el cartílag adult (Melching and Roughley, 1999). Tot i que és molt abundant a la còrnia, es troba àmpliament distribuït a tots els teixits de l'organisme. En el cartílag i en la còrnia es troba associat amb les fibres de col·lagen i s'ha suggerit que pot regular l'assemblatge de les fibres perquè, en la seva absència, el diàmetre de les fibres és excessiu en alguns teixits (Chakravarti, 2002; Chakravarti et al., 1998).

El queratocà s'expressa quasi exclusivament a la còrnia i escleròtica dels mamífers adults (Corpuz et al., 1996). S'uneix per mitjà de la seva cadena polipeptídica a les fibres de col·lagen, regulant d'aquesta manera el seu diàmetre, mentre que les seves cadenes de GAGs regulen la distància interfibril·lar. Això ve corroborat pel fet que un model murí KO per aquests SLRP presenta a l'estroma corneal canvis en l'espai entre les fibres i en el seu diàmetre (Corpuz et al., 1996).

Respecte a l'osteoadherina, és una proteïna rica en residus d'aspartat que s'expressa en els osteoblasts madurs i es troba en la matriu de l'os mineralitzat (Ramstad et al., 2003), però també es troba en altres teixits com ara tendons, medul·la òssia i a la interfase entre os i cartílag en el cap femoral (Ramstad et al., 2003).

La PRELP és una proteïna rica en arginina que finalitza en una regió rica en leucina que té una seqüència similar a la fibromodulina i el lumicà, presentant també quatre llocs de N-glicosilació (**Figura 3**). Es caracteritza per tenir un domini ric en arginina i prolina

específicament dissenyat per unir-se a l'heparina i/o heparà sulfat (Sommarin and Heinegard, 1986). Això fa que pugui influir en l'organització de la matriu i en les reaccions i interaccions amb la superfície cel·lular, ja que actuaria com a enllaç entre el col·lagen de la MEC i els PGs que contenen heparà sulfat a la superfície de la cèl·lula (Bengtsson et al., 2002). A més, hi ha estudis que la relacionen amb el metabolisme del condrocits per mitjà de la regulació dels efectes del factor de creixement fibroblàstic (FGF) (Felson, 2003).

SLRPs de Classe 3

En aquesta classe es troben l'epificà, l'osteoglicina i l'opticina. L'epificà un PG dermatà sulfat que es localitza al cartílag epifisari, d'on rep el seu nom (Iozzo, 1998). Com la decorina i el biglicà, té dos residus de serina que donen lloc a la seqüència típica d'enllaç als GAGs (**Figura 4**) i conté només 7 repeticions de la seqüència rica en leucina. S'expressa durant el desenvolupament embrionari i és secretat pels precursors dels condrocits hipertròfics (Johnson et al., 1999). També s'ha suggerit que l'epificà podria jugar un paper en l'organització de la placa de creixement, especialment en l'àrea dels condrocits aplanats, on és abundant (Knudson and Knudson, 2001).

L'osteoglicina (o mimecà) s'expressa a l'escleròtica, la còrnia i en els cultius de queratinòcits, però també es troba en petites quantitats a l'os i el cartílag (Bentz et al., 1989; Funderburgh et al., 1997; Iozzo, 1997; Madisen et al., 1990).

L'opticina conté només sis repeticions de la seqüència rica en leucina (**Figura 4**). Originalment es va caracteritzar a la retina (Pellegrini et al., 2002; Reardon et al., 2000) i en l'iris humà (Friedman et al., 2000; Friedman et al., 2002) on interactua amb les fibres de col·lagen, però també es troba en els lligaments i la pell (Pellegrini et al., 2002).

SLRPs de Classe 4

Aquesta classe està formada per la condroadherina, la nictalopina i la proteïna Tsukushin. La condroadherina s'expressa en condicions fisiològiques en el cartílag, tendons, os, medul·la òssia i ulls (Tasheva et al., 2004). També s'expressa en les regions més profundes de la placa de creixement, entre la zona de la proliferació i la zona hipertròfica (Shen et al., 1998). La seva expressió és regulada per l'osteoglicina/mimecà (Tasheva et al., 2004), que

INTRODUCCIÓ

també pot afavorir l'expressió del biglicà (Tasheva et al., 2004). És capaç de proporcionar senyals de retroalimentació a la cèl·lula mitjançant la seva interacció amb el receptor integrina $\alpha 2\beta 1$, que s'expressa sobre la superfície dels condrocits (Camper et al., 1997), i també podria estar implicada en la regulació de la proliferació cel·lular. Tot i que la seva funció no està clarament definida, podria jugar un paper en l'organització de grans agregats en les fibres properes a la superfície articular (Halberg et al., 1988).

Els altres dos membres, la nictalopina (Bech-Hansen et al., 2000; Pesch et al., 2003) i la proteïna Tsukushin, tot i pertànyer a la classe IV per estructura, comparteixen les mateixes propietats funcionals dels membres de classe 1 (Chen et al., 2004). Actuen com un inhibidor de BMPs, ja que s'uneixen a elles i formen un complex terciari juntament amb la cordina (Ohta et al., 2004). Aquest és un paper molt important en el correcte desenvolupament embrionari.

SLRPs de Classe 5

Consta de dos membres: podocà (Ross et al., 2003) i proteïna tipus podocà. Presenten un número de LRRs i exons, així com una composició del *clúster* cys N-terminal diferents a la resta de SLRPs, raó per la qual s'han associat en aquesta nova classe. El podocà és capaç d'unir-se al col·lagen tipus I i inhibir el creixement cel·lular a través de la inducció de p21, una proteïna relacionada amb el cicle cel·lular (Shimizu-Hirota et al., 2004).

Citoarquitectura del cartílag articular

Els diferents components del cartílag articular es disposen en quatre zones responsables de diferents funcions (Buckwalter et al., 1991; Mow et al., 1990) (**Figura 4**). Des de la superfície articular fins les capes més profundes trobem: la zona superficial o tangencial, la zona mitja o de transició, la zona profunda o radial i la zona calcificada, que es troba immediatament per sota de la línia de demarcació (en anglès *tide mark*) i per sobre de l'os subcondral. En totes les zones el condrocit es troba embolcallat per una MEC comuna o àrea pericel·lular, formada d'una capa fina de material no fibril·lar integrat per PGs i glicoproteïnes que són sintetitzats pel propi condrocit (Buckwalter et al., 1991; Mow et al.,

1990). Immediatament adjacent a l'àrea pericel·lular hi ha la matriu territorial, que està formada per una densa malla de fibres de col·lagen que formen una estructura en forma de càpsula al voltant dels condrocits, proporcionant-los protecció mecànica (Buckwalter et al., 1991; Schenk et al., 1986; Stockwell, 1990).

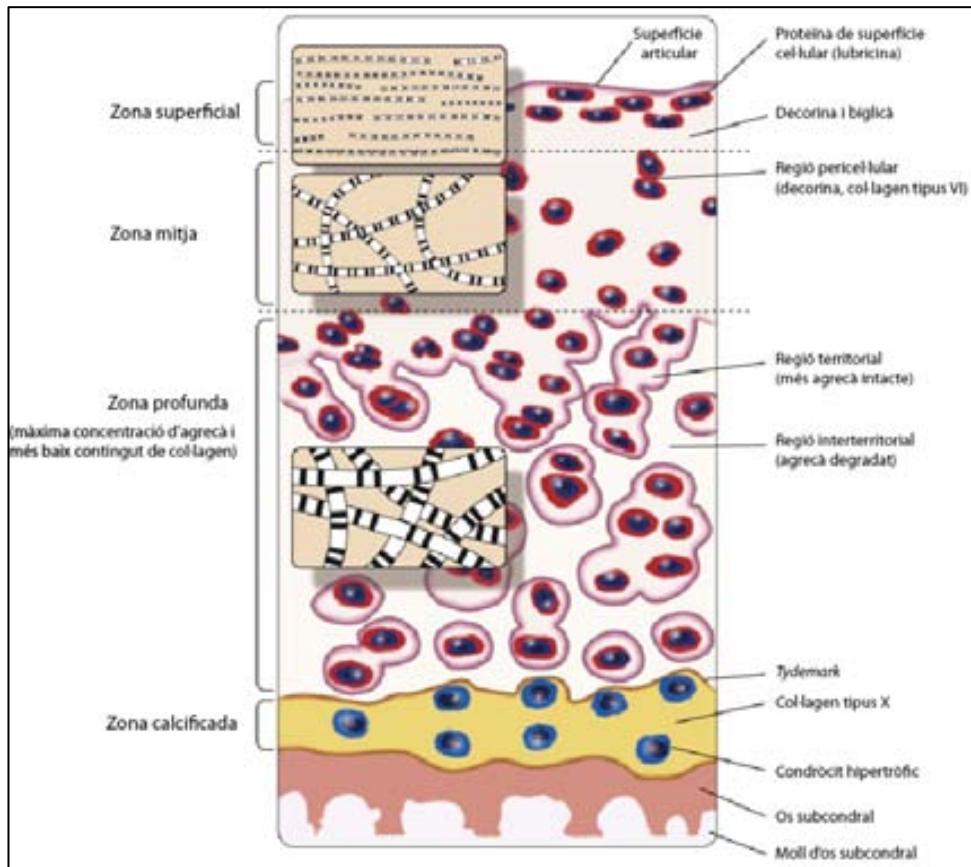


Figura 4: Estructura del cartílag articular humà adult, que mostra les zones de distribució cel·lular i les regions pericel·lulars, territorials, i inter-territorial de l'organització matricial. La figura mostra els diàmetres relatius i les orientacions de les fibres de col·lagen en les diferents zones, la situació de l'os subcondral i la *tyde mark* (adaptat de Poole, Kojima et al. 2001)

La zona superficial està formada per fibres fines de col·lagen amb una orientació tangencial, un baix contingut en PGs (Venn, 1979) i condrocits allargats i alineats de forma paral·lela a la superfície. Aquesta zona està en contacte amb el líquid sinovial i és responsable de la majoria de les propietats tènsils del cartílag que possibiliten que resisteixi a les forces de tensió i compressió imposades pel moviment de l'articulació (Akizuki et al., 1986; Kempson et al., 1973).

INTRODUCCIÓ

La zona mitja representa un 40-60% del gruix total del cartílag. Està formada per PGs i fibres de col·lagen més gruixudes organitzades en feixos radials o en capes. La densitat de condrocits en aquesta zona és baixa i aquests presenten una forma arrodonida.

En la zona profunda els condrocits, també en baixa densitat, tenen la mateixa forma que els de la zona mitja i estan alineats i perpendiculars a la superfície articular (Mitrovic et al., 1983; Stockwell, 1990). Aquesta zona conté les fibres de col·lagen més gruixudes i en disposició radial, però a una concentració força baixa (Venn, 1979). Per contra, el contingut dels PGs (principalment agreçà) és més elevada (Buckwalter and Rosenberg, 1988).

La zona calcificada és una capa d'unió més rígida entre el cartílag articular i l'os subcondral on la població de cèl·lules és escassa i els condrocits són hipertròfics. Es troba separada de la capa profunda de cartílag per la *tide mark*, que representa el front de mineralització que separa aquestes dues zones. La unió entre la zona calcificada i l'os subcondral, anomenada unió osteocondral, es dona per mitjà de fibres de col·lagen de la zona radial que penetren en el cartílag calcificat, adopten un perfil molt irregular i ancoren el cartílag a l'os subcondral. L'estructura corrugada de l'àrea calcificada permet transformar les diverses forces rebudes en forces de tensió i compressió que són molt més suportables per les fibres de col·lagen i els PGs (Redler et al., 1975).

Propietats biomecàniques del cartílag articular

En una articulació normal, el manteniment de la viabilitat del condrocit i l'homeòstasi del cartílag es deu a la combinació d'efectes mecànics amb diversos mediadors fisiològics (Buckwalter and Martin, 2004; O'Hara et al., 1990). El cartílag articular suporta i distribueix la càrrega gràcies a les seves propietats biomecàniques, que, com hem dit abans, li venen donades pels components de la MEC, principalment l'aigua, el col·lagen i l'agreçà, que li proporcionen una important capacitat de resistència a la compressió i a la tensió.

INTRODUCCIÓ

El cartílag articular té dues funcions primàries: una funció dinàmica i una funció estàtica. La funció dinàmica assegura el lliscament de les superfícies articulars en condicions de mínima fricció, i l'estàtica la transmissió i amortiment de les càrregues.

La funció dinàmica es deu a la interacció entre la capa superficial i el fluid sinovial, que es compon principalment d'AH i forma una fina pel·lícula protectora que actua com un lubricant a la superfície del cartílag. Durant el lliscament, la pel·lícula protectora es deforma evitant el desgast del cartílag, i les forces mecàniques produeixen un desplaçament del contingut d'aigua del cartílag des de les zones de màxima pressió fins a les regions circumdants, cosa que permet atenuar les forces de compressió.

La funció estàtica esmorteix les càrregues articulars migrant l'aigua i els electròlits a les àrees on la pressió és més baixa, cosa que origina un augment tant de la concentració de PGs com de la pressió osmòtica. Això comporta una major resistència com a resposta a l'increment de pressió i una moderada deformació del cartílag per tal de distribuir millor les forces de tensió.

A més de les funcions dinàmica i estàtica, el cartílag té una tercera funció que és assegurar el seu propi trofisme a través de l'intercanvi de fluids amb el líquid sinovial. El cartílag és un teixit no vascularitzat i, per tant, els condrocits desenvolupen al seu voltant una matriu deformable i porosa que permet el moviment de líquids i electròlits a través de la seva estructura estàtica. D'aquesta manera, la mobilització de les articulacions proporciona els elements necessaris pel metabolisme cel·lular del cartílag.

FISIOPATOLOGIA DE L'ARTROSI

Mecanismes patogènics de l'artrosi

Des d'un punt de vista fisiopatològic l'OA està considerada com una malaltia multifactorial que implica factors genètics i canvis bioquímics i biomecànics en diferents compartiments

INTRODUCCIÓ

de l'articulació. Així, hi ha evidències de que no només afecta el cartílag, la sinovial i l'os, sinó que en l'inici i progressió de la malaltia també estan involucrats els meniscs, els lligaments, els músculs i els teixits neurals (Brandt et al., 2006).

La hipòtesi més acceptada sobre la patogènesi de l'OA postula que les càrregues inadequades i l'edat contribueixen a una alteració del balanç entre síntesi i degradació de la MEC a favor del procés catabòlic. Això comporta una progressiva degeneració dels diferents constituents de la matriu degut bàsicament a factors catabòlics sintetitzats pels condrocits. Com a resposta a aquests canvis s'originaria una resposta de l'os subcondral que modificaria les seves propietats biomecàniques i finalment resultaria en la seva esclerosi (**Figura 5**). Les cèl·lules sinovials, per la seva part, pateixen inflamació o sinovitis, que inclou hiperplàsia, infiltració de macròfags i limfòcits que al seu torn tenen un efecte catabòlic en els condrocits, neoangiogènesi i fibrosi (Scanzello and Goldring, 2012). Conseqüentment, en l'OA és característic observar lesions articulars que es localitzen a les zones de càrrega i s'associen amb una degradació del cartílag, neosíntesi d'os en els marges de l'articulació (osteòfits), canvis en l'os subcondral, diferents graus de sinovitis i engruiximent de la càpsula articular (**Figura 5**). En etapes avançades de la malaltia, el dany es fa radiològicament visible, de manera que en una radiologia convencional podem observar estretament de l'espai articular causat per la pèrdua de cartílag, presència d'osteòfits, i fins i tot canvis més profunds en l'os subcondral (Dieppe and Lohmander, 2005).

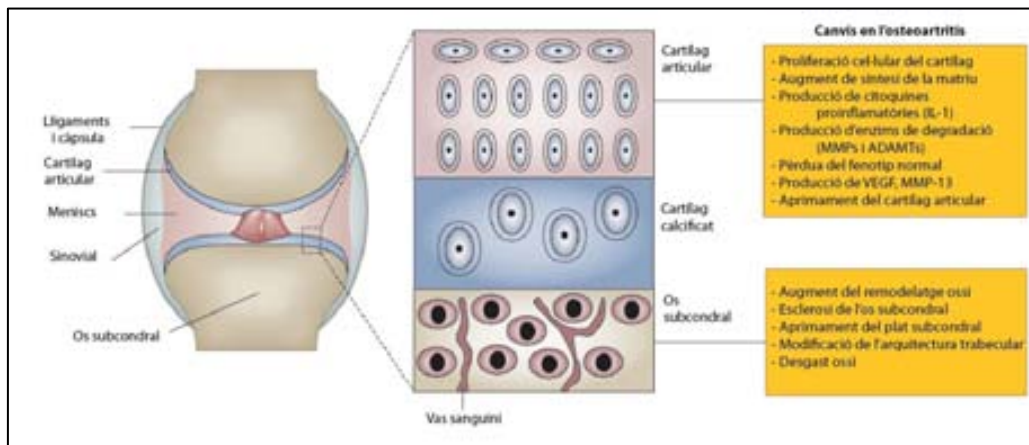


Figura 5. Esquema de la progressió de l'OA amb canvis simultanis en diferents teixits de l'articulació. Adaptat de (Lories and Luyten, 2011)

La degradació del cartílag és una conseqüència de la degradació de la MEC per enzims procedents dels condrocits i cèl·lules sinovials que condueix a la fibril·lació del teixit i la posterior sortida dels fragments a la cavitat articular. La degradació, deguda a la pèrdua local de PGs i a la degradació del col·lagen tipus II, té lloc inicialment en les zones superficials, causant un increment de la retenció d'aigua a l'espai articular i una pèrdua de les forces de resistència a la tensió de la matriu del cartílag. Les propietats bioquímiques del cartílag també es troben alterades i com a conseqüència s'alliberen fragments del cartílag al líquid sinovial, que actuen al seu torn com a activadors tant de l'ambient inflamatori com catabòlic.

En les etapes inicials de la malaltia, els condrocits responen amb un augment transitori de la proliferació que indueix un increment en la síntesi de la matriu del cartílag en un intent de reparació. Paral·lelament, i en resposta a la seva estimulació per part dels productes de degradació del cartílag, es dona un increment en la síntesi de les citocines catabòliques produïdes pels condrocits o pels macròfags de la membrana sinovial. Entre aquestes molècules podem trobar grans quantitats d'òxid nítric (ON), prostaglandines (entre les que destaca la Prostaglandina E-2 (PGE-2), interleucina (IL)-1 β , i el factor de necrosi tumoral (TNF- α), IL-6 i IL-8 (Pelletier et al., 2001b) (**Figura 6**).

INTRODUCCIÓ

Aquests elements indueixen la mort del condròcit per apoptosi i l'expressió dels enzims responsables de la degradació de la MEC, promovent tant la degradació del cartílag com la inflamació sostinguda i la progressió contínua de la malaltia (Blanco et al., 1998; Notoya et al., 2000; Pelletier et al., 2001a; Pelletier et al., 2000). Els enzims de destrucció tissular (o proteases matricials) secretats pels condròcits, i responsables de la digestió dels components matricials del cartílag, són les MMPs, les agrecanases i altres enzims de la família de les tiol i serin proteases (Figura 6). Les MMPs són inhibides per agents quelants anomenats inhibidors tissulars de les MMPs (TIMPs), però tot i que els nivells d'aquests inhibidors naturals (per exemple la TIMP-1) també estan augmentats en els diferents teixits articulars, la posterior progressió de la degradació de la matriu del cartílag es correlaciona amb el desequilibri entre els nivells de proteases i els seus inhibidors (Goldring, 2000b; Martel-Pelletier et al., 2001).

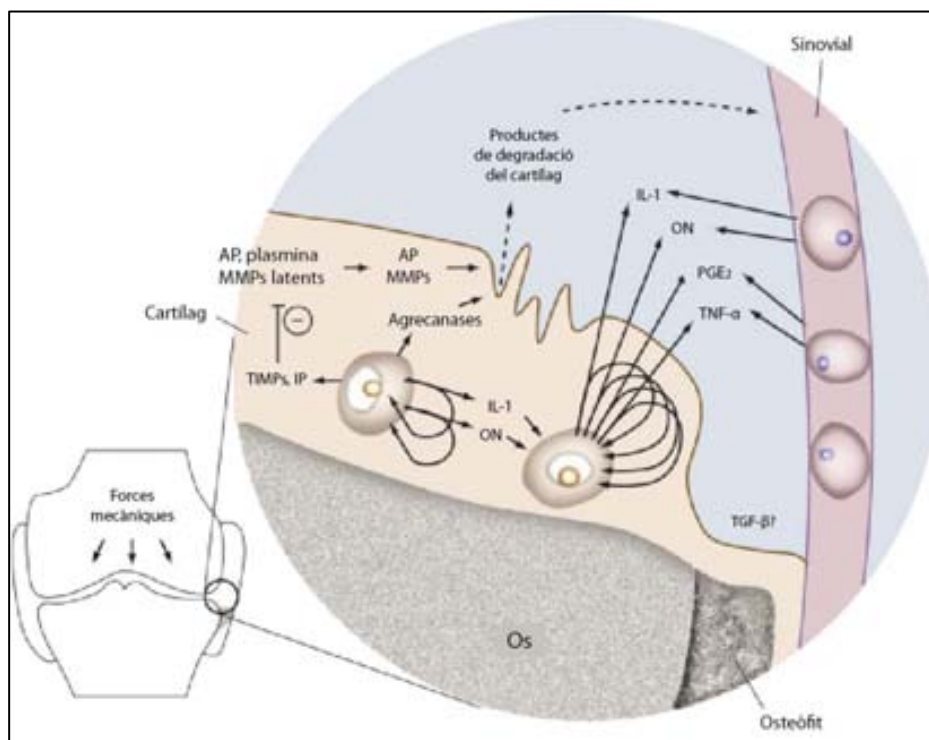


Figura 6. Esquema dels mecanismes patològics de l'OA. L'estrès mecànic inicia les alteracions metabòliques caracteritzades per l'alliberament de metal·loproteases de matriu (MMPs), citocines pro-inflamatòries, i mediadors com ara l'ON i la PGE₂. Els productes de la degradació del cartílag juguen un important paper estimulant l'alliberament de citocines des de les cèl·lules del revestiment sinovial, induint la producció de MMPs per part dels condròcits. La perpetuació del dany del cartílag s'amplifica per les accions autocrina i paracrina de l'IL-1 β i el factor de necrosi tumoral TNF- α produït pels condròcits. AP=activador del plasminogen; IP=inhibidor del plasminogen; TGF- β =factor transformant β ; TIMPs=inhibidors tissulars de les MMPs. (Adaptada de (Abramson and Attur, 2009))

De tot l'exposat anteriorment es desprèn que, tot i que l'OA ha estat considerada durant molt temps com una malaltia no inflamatòria, hi ha moltes evidències que les diverses citocines pro-inflamatòries sintetitzades per la membrana sinovial i pels condrocits tenen un paper important en el procés de degradació del cartílag artròsic (Goldring, 2000a; Martel-Pelletier et al., 2007; Martel-Pelletier et al., 2003; Pelletier et al., 2001b).

A més dels canvis en l'estructura i/o contingut en col·lagen i agrecà associats al procés artròsic, s'han observant alteracions d'altres components de la matriu. S'ha demostrat, per exemple, que en models experimentals d'OA, la concentració de biglicà, decorina i fibromodulina està augmentada (Bock et al., 2001; Dourado et al., 1996), un augment que es podria interpretar com un intent de reparació del cartílag. De fet, un model murí KO per fibromodulina va demostrar que els animals tenien una pronunciada tendència a desenvolupar OA amb l'edat (Gill et al., 2002; Svensson et al., 1999) probablement degut a una pobre qualitat dels lligaments. De manera similar, en un model murí doble KO per fibromodulina i lumicà, els canvis en els lligaments provoquen una hiperomotilitat que afavoreix el desenvolupament d'OA (Jepsen et al., 2002). A més, la fibromodulina també pot intervenir en la destrucció del cartílag articular per la seva capacitat d'activar la fracció del complement C1q que condueix a l'activació de la cascada del complement (Sjoberg et al., 2009).

En resum, juntament amb el trencament de l'agrecà, la degradació del col·lagen és l'esdeveniment central en l'OA (Billinghurst et al., 1997; Lohmander et al., 2003). Donada la importància i el pes específic dels enzims que participen en la digestió dels components matricials del cartílag en aquesta tesi, a continuació es fa una breu revisió de les seves famílies, substrats pels que són específics, estructura proteica i funció.

Les agrecanases

Les agrecanases són un tipus de desintegrines i metal·loproteases amb un domini trombospondina (ADAMTS) que són considerades el segell de la degradació del cartílag articular en l'OA, ja que són responsables dels esdeveniments inicials en el remodelatge del cartílag (Nagase and Kashiwagi, 2003). Les MMPs entren en el procés durant el

desenvolupament de la malaltia i continuen amb la degradació del col·lagen.

Dels 19 membres que constitueixen la família de les agrecanases, en el cartílag artròsic només s'han aïllat les ADAMTS-4 (o agrecanasa-1) i l'ADAMTS-5 (o agrecanasa-2), essent les agrecanases més eficients *in vitro* (Gendron et al., 2007). Mentre que ADAMTS-5 només és capaç de digerir PGs (Apte, 2009), l'espectre proteolític d'ADAMTS-4 és més ampli, ja que pot hidrolitzar altres components com brevicà, versicà, fibromodulina, decorina, biglicà o proteïna oligomèrica de la matriu del cartílag (COMP) (Gao et al., 2002; Matthews et al., 2000; Melching et al., 2006).

Tant ADAMTS-4 com ADAMTS-5 tenen una organització similar, amb un prodomini, un domini catalític metal·loproteasa, un domini desintegrina, un domini ric en cisteïna i un domini espaiador. ADAMTS-5 conté a més un domini trombospondina després del domini espaiador. Ambdós enzims són secretats amb un prodomini que ha de ser escindit per part de les proproteïnes convertases constitutives per passar a la seva forma activa. Finalment, cal destacar que les agrecanases -1 i -2 degraden l'agrecà en un lloc concret del domini interglobular diferent del lloc de digestió de les MMPs (Miwa et al., 2009).

La implicació d'ADAMTS-4 com d'ADAMTS-5 en l'OA s'ha demostrat experimentalment, ja que l'abolició de la seva funció (KO) en explants de cartílag humà resulta en depleció de l'activitat proteolítica que degrada l'agrecà (Song et al., 2007). En ratolins, sembla que ADAMTS-5 és la principal agrecanasa responsable del desenvolupament d'OA, ja que els ratolins KO per ADAMTS-5 (però no per ADAMTS-4) estan protegits de la pèrdua d'agrecà i l'erosió del cartílag en models inflamatoris i no inflamatoris d'OA (Glasson et al., 2005; Stanton et al., 2005).

Les metal·loproteases de la matriu

Les MMPs són una família d'endopeptidases amb homologia estructural i funcional de les que fins al moment s'han identificat 28 membres (MMP-1 a -28) (**Taula 2**). Són sintetitzades en forma de zimogen latent o inactiu que ha d'ésser escindit per tal que l'enzim s'activi. El mecanisme cel·lular proposat per explicar l'activació dels enzims MMPs s'anomena "pas a

pas": comença amb un primer clivatge a la regió del propèptid que elimina només una part d'aquest, i segueix amb l'escissió completa del propèptid per l'acció d'una MMP intermèdia o per una altra MMP activa (Nagase et al., 1990).

A nivell estructural, les diferències en l'organització i composició dels diferents dominis estableixen les seves propietats proteolítiques (Nagase et al., 2006): una MMP típica conté un pèptid senyal responsable de secretar l'enzim, un propèptid encarregat de mantenir l'enzim inactiu -i que per tant ha de ésser escindit per passar a la forma activa-, un domini catalític metal·loproteasa, un pèptid d'unió de llargada variable i un domini hemopexina que, en el cas de l'MMP-13, s'ha demostrat que és essencial per l'activitat col·lagenolítica (Freije et al., 1994) i l'activació de l'enzim (Knauper et al., 2002).

Segons el seu substrat preferencial i la seva activitat enzimàtica les MMPs es classifiquen en cinc grups: col·lagenases, gelatinases, estromelisines, un grup variat compost de matrilisines, enamelisines i macròfag metal·loelastases i les MMPs de tipus membrana (MT-MMPs) (**Taula 2**) (Nagase et al., 2006; Page-McCaw et al., 2007).

L'activitat de les MMPs està controlada tant per l'activació dels proenzims com per la inhibició pels inhibidors endògens (TIMPs). Per tant, un desequilibri entre MMPs i TIMPs afectarà el contingut de col·lagen i conseqüentment les propietats mecàniques del teixit. És important tenir en compte que mentre que la pèrdua d'agrecà és reversible, la degradació del col·lagen és irreversible i el cartílag ja no es pot reparar (Karsdal et al., 2008).

L'activitat de la majoria de les MMPs és molt baixa o negligible en els teixits normals i la seva expressió està controlada transcripcionalment per citocines inflamatòries, factors de creixement, hormones, i interaccions cèl·lula-cèl·lula i matriu-cèl·lula (Nagase and Woessner, 1999).

La família de les col·lagenases és la més important en la degradació del cartílag artròsic i es defineix per la seva capacitat de digerir la triple hèlix de col·lagen, però també poden digerir altres molècules i proteïnes de la MEC (Visse and Nagase, 2003).

INTRODUCCIÓ

L'MMP-1 (o col·lagenasa-1) és capaç de degradar una àmplia varietat de col·làgens com ara els de tipus I, II, III, VII i X (Visse and Nagase, 2003). La seva expressió al cartílag artròsic és superior a la de la MMP-13, però en canvi té una eficiència de degradació del col·lagen II inferior. L'MMP-13 (o col·lagenasa-3) a més de degradar el col·lagen de tipus I, II i III, és activa front a altres components com ara l'agrecà (Fosang et al., 1996b), la fibromodulina (Heathfield et al., 2004), la fibronectina, la fibrilina, la gelatina i els col·làgens tipus IV, IX, X i XIV (Billinghurst et al., 1997; Fosang et al., 1996a; Knauper et al., 1997; Knauper et al., 1996; Mitchell et al., 1996; Reboul et al., 1996). Una altra proteïna d'aquesta família capaç de digerir altres components de la matriu és la MMP-3 o estromelisina-1, que hidrolitza PGs, col·lagen i procol·lagen (Welgus, 1991). Cal destacar que a més de la seva capacitat proteolítica, MMP-3 és capaç de realitzar el clivatge necessari per l'activació d'ella mateixa o d'altres MMPs (Nagase, 1997).

En general està acceptat que les col·lagenases (MMP-1, -8, -13 i -14) digereixen els col·làgens I, II, i III hidrolitzant el pèptid a una distància d'uns $\frac{3}{4}$ de l'extrem N-terminal, donant així lloc a dos fragments característics de $\frac{1}{4}$ i $\frac{3}{4}$. El col·lagen desnaturalitzat, o gelatina, és després degradat per les gelatinases (MMP-2 i -9) (Visse and Nagase, 2003). Els membres més importants en OA són les col·lagenases MMP-1 i l'MMP-13, essent aquesta darrera àmpliament reconeguda com a iniciadora de la col·lagenòlisi (Reboul et al., 1996). A diferència d'altres MMPs, la MMP-13 (o col·lagenasa-3) té un perfil de distribució molt limitat en els teixits humans normals i en condicions fisiològiques es troba quasi exclusivament en el cartílag (Mitchell et al., 1996; Reboul et al., 1996).

Taula 2: Classificació de les MMPs i els seus substractes preferents.

MMP	Família i enzims	Substrat Preferent
Col·lagenases		
MMP-1	Col·lagenasa Intersticial	Col·lagen I, II, III, V, VII , VIII, X, agregà, gelatina, serpines, pro-MMP-2 i pro-MMP-9
MMP-8	Col·lagenasa dels neutròfils	Col·lagen I, II, III, V
MMP-13	Col·lagenasa-3	Col·lagen I, II, III, IV, V, IX, X, XI, gelatina, agregà, LN, FN i tenascina
MMP-18	Col·lagenasa-4	Col·lagen helicoïdal
Gelatinases		
MMP-2	Gelatinasa A	Col·lagen I, IV, V, VII, X, gelatina, elastina, FN, LN, nidogen, MMP-9 i MMP-13
MMP-9	Gelatinasa B	Col·lagen IV, gelatina, agregà, LN i nidogen
Estromelisinés		
MMP-3	Estromelisin-1	Col·lagen II, IV, IX, X, LN, FN, nidogen, agregà, PGs, elastina, gelatina, pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8 i pro-MMP-9
MMP-10	Estromelisin-2	Col·lagen IV, LN, FN, nidogen, PGs i gelatina
MMP-11	Estromelisin-3	LN, α 1-antitripsina i inhibidor de la α 1-proteinasa
MMPs de matriu (MT-MMPs)		
MMP-14	MT1-MMP	Col·lagen I, II, III, gelatina, LN, FN, VN, nidogen, agregà, PGs, perlecà, tenascina, pro-MMP-2 i pro-MMP-13
MMP-15	MT2-MMP	Col·lagen I, II, III, gelatina, LN, FN, VN, nidogen, agregà, perlecà, pro-MMP-2 i pro-MMP-13
MMP-16	MT3-MMP	Col·lagen I, III, gelatina, caseïna, LS, FN, VN, agregà, perlecà, pro-MMP-2 i pro-MMP-13
MMP-17	MT4-MMP	FN, fibrina, gelatina
MMP-24	MT5-MMP	Pro-MMP-2 i pro-MMP-13
MMP-25	MT6-MMP	Pro-MMP-2

Altres		
MMP-7	Matrilisina-1	Col·lagen IV, gelatina, elastina, proteoglicà i glicoproteïna
MMP-12	Metal·loelastasa	Elastina
MMP-19	Sense nom	Desconegut
MMP-20	Enamelisina	Amelogenina, agregà i COMP
MMP-26	Matrilisina	Gelatina, FN, VN, col·lagen IV, inhibidor de la α 1-proteinasa
MMP-27	Estromelisina	Desconegut
MMP-28	Epilisina	Desconegut

LN=laminina ; FN=fibronectina ; VN=vitronectina; COMP= cartilage oligomeric matrix protein

S'expressa principalment durant l'ossificació fetal i en alguns teixits de remodelació (Johansson et al., 1997; Stahle-Backdahl et al., 1997); en adults l'expressió es limita a condicions patològiques, com ara carcinomes mamaris, carcinomes de cèl·lules escamoses i condrosarcoma. També s'ha vist que està augmentada en el cartílag en l'OA i en l'artritis reumatoide (Mitchell et al., 1996; Moldovan et al., 1997; Reboul et al., 1996; Wernicke et al., 1996). Finalment, en un model quirúrgic d'OA s'ha descrit que els ratolins KO per MMP-13 són resistents a l'erosió del cartílag (Little et al., 2009), i que l'expressió constitutiva d'MMP-13 en ratolins transgènics indueix una degeneració del cartílag similar a l'observada en l'OA (Neuhold et al., 2001).

PERSPECTIVES DE FUTUR

Biomarcadors

El diagnòstic de l'OA es dona principalment per símptomes clínics i troballes radiològiques. Això comporta que en el moment que un pacient és diagnosticat d'aquesta patologia, els processos fisiopatològics que la generen estan àmpliament instaurats, amb un inici estimat d'entre 5 i 10 anys previs. Aquesta manca diagnòstica precoç provoca que el fre de la malaltia sigui més difícil, ja que la degradació articular ja està molt avançada. A més,

dificulta el disseny de fàrmacs per la patologia, ja que no hi ha una tècnica que pugui comprovar, en un període curt de temps, l'eficàcia del tractament (Garnero, 2007; Sumer et al., 2006).

En aquest sentit s'estudia la determinació dels nivells sistèmics, tant a orina com a sèrum, de biomarcadors del cartílag que puguin informar de la seva activitat metabòlica. Tot i que és un camp d'investigació recent, s'ha demostrat que els nivells d'alguns biomarcadors poden servir com a indicadors pel diagnòstic de la OA, poden predir el desenvolupament de la malaltia en els seus estadis inicials o poden avaluar la severitat i/o la progressió d'aquesta (Attur et al., 2013; Kraus et al., 2011; Mobasheri and Henrotin, 2010; Mobasheri and Henrotin, 2011; Ramonda et al., 2013).

La importància d'identificar biomarcadors de pronòstic també radica en el fet que la identificació de pacients amb un risc elevat de progressió podria permetre seleccionar aquests pacients per a ser inclosos en assajos clínics per observar l'efecte de les teràpies modificadores de l'OA (DMOAD; de l'anglès *Disease-Modifying Osteoarthritis Drug*) (Kraus et al., 2011).

La majoria dels biomarcadors que s'han identificat fins ara tenen limitacions importants: encara no s'ha demostrat que siguin pre-radiogràfics, no són específics dels estadis de la malaltia i podrien no ser específics del cartílag OA o de l'articulació afectada (Mobasheri and Henrotin, 2011).

D'entre tots els biomarcadors estudiats (**Taula 3**), n'hi ha quatre de post-radiogràfics que destaquen: l'AH en sèrum, la COMP també en sèrum, el telopèptid C del col·lagen II (CTX-II) en orina i el Coll2-1 i la seva forma nitrada Coll2-1NO2 en sèrum i en orina (Henrotin et al., 2012).

Tot i que la investigació en biomarcadors de l'OA s'ha centrat en la degradació i síntesi del cartílag, l'os i la sinovial, també s'han estudiat biomarcadors implicats en els processos inflamatoris que es donen en les articulacions artròsiques. Els candidats inclouen citocines i quimiocines com ara d'IL 18, que s'ha associat a la progressió radiològica (Denoble et al.,

2011); l'IL1-beta, associada a la presència d'osteòfits (Fraenkel et al., 1998); nivells elevats en plasma d'IL-6 i TNF- α (Stannus et al., 2010); nivells d'MMP-9 i IL-1R- α predictius d'aprimament de l'espai articular (Attur et al., 2013); i IL-7 incrementada en líquid sinovial (Rubenhagen et al., 2012). Finalment, un estudi proteòmic recent va trobar que les proteïnes sèriques MIP-1- α , IL-1- α , IL2, IL-15 i MMP-7 poden discriminar pacients amb OA inicial de controls (Ling et al., 2009).

Tractaments de futur

Com ja s'ha apuntat, els tractaments actualment a l'abast per l'OA actuen sobre els símptomes mitjançant la reducció del dolor i el control de la inflamació. Malgrat que alguns dels fàrmacs, especialment els SYSADOAs, han demostrat certa capacitat per modificar estructuralment la malaltia, cap d'ells ha estat aprovat pel seu ús com a DMOAD, és a dir, ésser capaç de preservar el cartílag o de compensar-ne la pèrdua. En aquest sentit, el tractament d'elecció per al maneig de l'OA seria un DMOAD que fos a la vegada capaç de millorar el dolor i la funcionalitat dels pacients.

S'han fet diversos intents per trobar nous tractaments modificadors de l'estructura, però fins al moment han estat infructuosos o es troben encara en fase experimental (Davies et al., 2013). Entre els més estudiats s'inclouen els inhibidors de la sintasa de l'ON, els TIMPs i els inhibidors de les agrecanases ADAMTS-4 i ADAMTS-5.

Taula 3. Principals biomarcadors de síntesi i degradació del cartílag que s'han investigat en OA.

Biomarcador	Procés	Teixit d'origen	En OA vs normalitat	Referències
PIICP	Síntesi de col·lagen II	Cartílag	Nivells 2-4 vegades més elevats en el LS i 7.6 en cartílag	(Lohmander et al., 1996; Nelson et al., 1998)
Queratà sulfat	Catabolisme de l'agrecà	Cartílag	La concentració en sèrum es correlaciona amb el dany del cartílag	(Wakitani et al., 2007)
Condroitín sulfat (epítip 846)	Síntesi de l'agrecà	Cartílag	Concentracions elevades en LS artròsic; els nivells circulants correlacionen amb la durada de la malaltia	(Poole et al., 1994)
YKL-40	Catabolisme del cartílag	Cartílag, sinovial	Incrementat en sèrum i LS de pacients amb OA de maluc.	(Conrozier et al., 2000)
COMP	Estimula la formació de fibres de col·lagen II i formació d'osteòfits	Cartílag, tendó, meniscs, sinovial	<ul style="list-style-type: none"> - Nivells elevats en LS i sèrum de pacients amb OA. - Correlaciona amb la progressió de la malaltia. - Els nivells elevats prediuen la incidència d'aprimament de l'espai articular i formació d'osteòfits - Els nivells de fragments en sèrum es correlacionen amb la severitat radiogràfica de l'OA 	(Erhart-Hledik et al., 2012; Golightly et al., 2011; Kumm et al., 2013; Lai et al., 2012; Sharif et al., 2004; Wislowska and Jablonska, 2005)
Col12-1NO2	Clivatge i nitració de col·lagen II	Cartílag	<ul style="list-style-type: none"> - Marcador de dany del cartílag articular - Nivells en orina predictius de progressió radiològica d'OA - Nivells elevats en sèrum en OA de la mà 	(Deberg et al., 2008; Deberg et al., 2005; Punzi et al., 2012)
Piridolina (PYD)	<i>Crosslink</i> del col·lagen	Sinovial	<ul style="list-style-type: none"> - Nivells en orina associats a severitat radiogràfica, aprimament de l'espai articular i presència d'osteòfits - Marcador de la degradació sinovial 	(Gineyts et al., 2001; Jordan et al., 2006)
C2C, C1,2C	Clivatge de col·làgens I i II	Cartílag, os, sinovial	<ul style="list-style-type: none"> - Nivells augmentats en ratolins transgènics per MMP-13 - Nivells augmentats en model murí i boví amb OA inflamatòria 	(Billinghurst et al., 1997; El-Maadawy et al., 2003; Song et al., 1999)
CTX-II	Catabolisme del col·lagen II i formació d'osteòfits	Cartílag mineralitzat, cartílag de creixement, os	<ul style="list-style-type: none"> - Nivells en orina correlacionats amb la progressió radiològica, amb la puntuació clínica i amb la gravetat de la lesió del cartílag - Nivells elevats prediuen la progressió dels osteòfits 	(Christgau and Cloos, 2004; Garnero et al., 2005; Garnero et al., 2001; Jordan et al., 2006; Kumm et al., 2013)

INTRODUCCIÓ

Biomarcador	Procés	Teixit d'origen	En OA vs normalitat	Referències
Hèlix II	Catabolisme del col·lagen II	Cartílag	Incrementat a l'orina del pacients artròsics vs sans	(Charni et al., 2005)
Àcid hialurònic	Formació d'osteòfits, sinovitis	Cartílag, meniscs, sinovial	<ul style="list-style-type: none"> - Nivells elevats en sèrum prediuen la incidència d'aprimament de l'espai articular - Nivells basals en sèrum prediuen la resposta clínica a les injeccions intra-articulars d'AH - Nivells incrementats es correlacionen amb una ràpida progressió radiològica 	(Conrozier et al., 2012; Elliott et al., 2005; Golightly et al., 2011; Pavelka et al., 2004)

En el cas dels TIMPs, per exemple, s'ha reportat que els ratolins KO per TIMP-3 amb l'edat pateixen degradació del col·lagen i agreçà a les articulacions (Sahebjam et al., 2007). S'han investigat TIMPs que tenen com a diana diferents MMPs, però el tractament amb aquests inhibidors d'ampli espectre s'ha associat a efectes secundaris severos. En concret, aquesta toxicitat s'ha anomenat "síndrome musculoesquelètica", i inclou pèrdua indolora de l'amplitud de moviment en grans articulacions, inflamació articular, rigidesa, dolors a teixits tous i contractura de Dupuytren (Krzieski et al., 2007). Tot i que la causa d'aquesta síndrome és encara desconeguda, ha impedit que aquest grup de fàrmacs arribin a assaigs clínics de fase III i ha donat peu a dirigir les investigacions a inhibidors selectius de les MMP. Un estudi en rates tractades amb un inhibidor específic de l'MMP-13, per exemple, va observar una reducció del 67% en la degradació del cartílag sense aparició de l'esmentada síndrome (Baragi et al., 2009), però no hi ha encara evidències d'estudis clínics en fase III.

Els inhibidors de les agrecanases també s'han investigat, ja que el bloqueig de l'activitat enzimàtica o per competició dels llocs de clivatge de les agrecanases podrien evitar la degradació de l'agreçà i revertir la degradació de la matriu cartilaginosa (Little et al., 2007). Fins al moment, però, només hi ha evidències d'un model murí amb lesió articular tractat amb un inhibidor d'ADAMTS-4 i ADAMTS-5, i que ha mostrat una reducció en els fragments d'agreçà en l'articulació (Chockalingam et al., 2011). Aquest és l'únic inhibidor que ha completat la fase I, però encara no s'han publicat els resultats (Davies et al., 2013)

INTRODUCCIÓ

Pel que fa als inhibidors de la sintasa de l'ON, un estudi en un model d'OA induïda en gossos tractats amb un inhibidor selectiu (L-NIL) va mostrar que prevenia la progressió de la malaltia (Pelletier et al., 2000). En humans, un assaig clínic randomitzat ha demostrat que aquest inhibidor alientia la progressió d'OA moderada (tot i que aquesta no es sostenia a les 96 setmanes), però no va ser efectiu en l'OA radiològica severa (Hellio le Graverand et al., 2013).

De tot l'exposat anteriorment es dedueix que el desenvolupament de tractaments per l'OA és difícil i pateix de grans inconvenients (Bondeson, 2011): en primer lloc els models animals actuals no són adequats, en segon lloc és molt difícil determinar el moment idoni d'intervenció en una malaltia d'evolució lenta, i finalment és problemàtic seleccionar els pacients per assajos clínics, ja que l'OA és sovint asimptomàtica.

En resum, encara no hi ha evidències que suportin l'ús dels DMOADs en la pràctica clínica, però és una àrea d'investigació molt jove i és d'esperar que, junt amb els avenços en l'ús de biomarcadors i marcadors radiològics de la progressió de la malaltia, doni fruits en els propers anys.

**JUSTIFICACIÓ DE LA TESI, HIPÒTESI I
OBJECTIUS**

JUSTIFICACIÓ, HIPÒTESI I OBJECTIUS

El paper de les MMPs i les col·lagenases en la fisiopatologia de l'OA està ben establert i passa per la digestió dels components de la MEC, especialment el col·lagen tipus II i l'agrecà, però també dels SLRPs u subtipus de PGs no agregats. Tot i que l'estudi d'aquests darrers ha despertat molt menys interès, el coneixement dels productes de degradació dels SLRPs i dels enzims que s'encarreguen de la seva proteòlisi és fonamental, perquè els seus catabòlits podrien ajudar en la detecció precoç de l'OA, podrien estar correlacionats amb la severitat de la malaltia i, finalment, podrien ser dianes terapèutiques a l'hora de buscar medicacions modificadores del curs de la malaltia. Basant-nos en aquestes hipòtesis generals, i per tal d'aprofundir en el paper de diferents SLRPs i MMPs en la degradació del cartílag articular que s'observa en l'OA, es van plantejar les següents hipòtesis i objectius específics:

TREBALL 1

Hipòtesi:

- La càrrega mecànica afecta l'expressió de les MMPs i per tant el contingut de la MEC.
- Les zones sotmeses a màxima càrrega presenten una composició del cartílag diferent a les zones de mínima càrrega.
- La càrrega mecànica afecta la viabilitat dels condrocits.
- Els efectes de la càrrega mecànica són diferents en el cartílag sa i artròsic.

Objectius:

- Obtenir mostres de cartílag de cap femoral humà sanes i artròsiques d'una zona de màxima càrrega i una de mínima càrrega.
- Quantificar, en aquestes mostres, el nivell d'expressió (mRNA) i de proteïna d'MMP-1 i MMP-3, col·lagen 2A1 i agreçà.
- Quantificar, en aquestes mostres, la viabilitat i apoptosi dels condrocits.
- Comparar els resultats obtinguts entre cartílag normal i OA, i estratificar-los segons el nivell de càrrega.

TREBALL 2

Hipòtesis:

- Els principals SLRPs implicats en l'OA (biglicà, fibromodulina, lumicà i decorina) són substrats de l'MMP-13.
- La potència degradadora d'MMP-13 difereix entre els diferents SLRPs.
- L'activitat proteolítica d'MMP-13 és diferent en el cartílag humà normal i en l'artròsic.
- L'activitat proteolítica d'MMP-13 és diferent segons el grau d'afectació del cartílag.

JUSTIFICACIÓ, HIPÒTESI I OBJECTIUS

Objectius:

- Obtenir mostres de cartílag de còndil femoral i meseta tibial humanes sanes i artròsiques, aquestes darreres amb diferents graus de degradació.
- Determinar, en aquestes mostres, els nivells proteics de biglicà, fibromodulina, lumicà i decorina.
- Determinar, en aquestes mostres, l'activitat proteolítica d'MMP-13 sobre el biglicà, fibromodulina, lumicà i decorina.
- Comparar, en aquestes mostres, la degradació induïda per MMP-13 i els nivells proteics de cada SLRP.

TREBALL 3

Hipòtesis:

- L'SLRP opticina s'expressa en teixits articulars humans.
- L'opticina és un substrat d'MMP-13.
- Els nivells d'opticina difereixen entre el cartílag normal i l'artròsic.

Objectius:

- Obtenir mostres de cartílag i membrana sinovial de genolls humans sans i artròsics.
- Determinar la presència d'opticina en aquests teixits a través dels nivells de proteïna i d'mRNA.
- Determinar, en aquestes mostres, l'activitat proteolítica i el patró de clivatge d'MMP-13 sobre l'opticina.
- Comparar els nivells d'opticina entre les mostres sanes i les artròsiques.

RESULTATS

L'apartat de resultats d'aquesta tesi està dividit en tres seccions, cadascuna de les quals ha derivat en una publicació en una revista internacional indexada a la base de dades PubMed.

1. Estudi de la resposta del cartílag normal i artròsic a la càrrega mecànica

En aquesta secció es presenten els resultats d'un estudi que es va dur a terme al grup de Recerca Cel·lular en Inflamació i Cartílag de l'IMIM (Parc de Salut Mar, Barcelona). L'estudi va comptar amb la col·laboració del Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo de la Corunya.

En aquest estudi es van fer servir mostres humanes de cartílag del cap femoral per a avaluar l'expressió i contingut d'MMP-1, MMP-3, agregà i col·lagen tipus II, així com la presència d'apoptosi de condrocits en regions fisiològicament sotmeses a màxima càrrega mecànica respecte a regions sotmeses a mínima càrrega.

Els resultats d'aquest estudi van donar lloc a la següent publicació:

Monfort, J., Garcia-Giralt, N., Lopez-Armada, M.J., Monllau, J.C., Bonilla, A., Benito, P., Blanco, F.J., 2006. **Decreased metalloproteinase production as a response to mechanical pressure in human cartilage: a mechanism for homeostatic regulation.** Arthritis Res Ther 8, R149.

Research article

Open Access

Decreased metalloproteinase production as a response to mechanical pressure in human cartilage: a mechanism for homeostatic regulationJordi Monfort¹, Natalia Garcia-Giralt¹, María J López-Armada², Joan C Monllau¹, Angeles Bonilla², Pere Benito¹ and Francisco J Blanco²¹Unitat de recerca en fisiopatologia òssia i articular- Institut Municipal d'Investigació Mèdica (URFOA-IMIM), Hospital del Mar, Universitat Autònoma de Barcelona, Dr. Aiguader 80, 08003-Barcelona, Spain²Osteoarticular and Aging Research Unit, Rheumatology Division, Biomedical Researcher Center, Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, Xubias 84, 15006 – A, Coruña, SpainCorresponding author: Francisco J Blanco, fblagar@canalejo.org

Received: 11 Apr 2006 Revisions requested: 9 Jun 2006 Revisions received: 8 Aug 2006 Accepted: 14 Sep 2006 Published: 14 Sep 2006

Arthritis Research & Therapy 2006, **8**:R149 (doi:10.1186/ar2042)This article is online at: <http://arthritis-research.com/content/8/5/R149>© 2006 Monfort *et al.*; licensee BioMed Central Ltd.This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.**Abstract**

Articular cartilage is optimised for bearing mechanical loads. Chondrocytes are the only cells present in mature cartilage and are responsible for the synthesis and integrity of the extracellular matrix. Appropriate joint loads stimulate chondrocytes to maintain healthy cartilage with a concrete protein composition according to loading demands. In contrast, inappropriate loads alter the composition of cartilage, leading to osteoarthritis (OA). Matrix metalloproteinases (MMPs) are involved in degradation of cartilage matrix components and have been implicated in OA, but their role in loading response is unclear. With this study, we aimed to elucidate the role of MMP-1 and MMP-3 in cartilage composition in response to mechanical load and to analyse the differences in aggrecan and type II collagen content in articular cartilage from maximum- and minimum-weight-bearing regions of human healthy and OA hips. In parallel, we analyse the apoptosis of chondrocytes in maximal and minimal load areas. Because human femoral heads are subjected to different loads at defined sites, both areas were obtained from the same hip and subsequently evaluated for differences in aggrecan, type II collagen, MMP-1, and MMP-3 content (enzyme-linked immunosorbent assay) and gene expression (real-time

polymerase chain reaction) and for chondrocyte apoptosis (flow cytometry, bcl-2 Western blot, and mitochondrial membrane potential analysis). The results showed that the load reduced the MMP-1 and MMP-3 synthesis ($p < 0.05$) in healthy but not in OA cartilage. No significant differences between pressure areas were found for aggrecan and type II collagen gene expression levels. However, a trend toward significance, in the aggrecan/collagen II ratio, was found for healthy hips ($p = 0.057$) upon comparison of pressure areas (loaded areas > non-loaded areas). Moreover, compared with normal cartilage, OA cartilage showed a 10- to 20-fold lower ratio of aggrecan to type II collagen, suggesting that the balance between the major structural proteins is crucial to the integrity and function of the tissue. Alternatively, no differences in apoptosis levels between loading areas were found – evidence that mechanical load regulates cartilage matrix composition but does not affect chondrocyte viability. The results suggest that MMPs play a key role in regulating the balance of structural proteins of the articular cartilage matrix according to local mechanical demands.

Introduction

Articular cartilage is a tissue optimised for bearing mechanical loads. Chondrocytes are the only cells present in mature cartilage and they are responsible for the synthesis and integrity of the extracellular matrix (ECM) [1,2]. The matrix of hyaline

articular cartilage is composed mainly of proteoglycans (PGs) and type II collagen. The PGs provide elasticity to the tissue, whereas the collagen fibrils form a network that confers tensile strength. Changes in these structural components can affect the mechanical stability of the tissue and chondrocyte survival

ECM = extracellular matrix; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; FAC = flow cytometry; IP = inferior pole; MMP = matrix metalloproteinase; OA = osteoarthritis; OF = osteoporotic fracture; PBS = phosphate-buffered saline; PCR = polymerase chain reaction; PG = proteoglycan; PI = propidium iodide; SE = standard error; SP = superior pole.

[3], which consequently may fail to support mechanical loads. The final phase of osteoarthritis (OA) seems to reflect a failure of the reparative process, resulting in degradation of the matrix, cell death, and total loss of cartilage integrity.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are involved in the degradation of the components of the cartilage matrix. Among MMPs, collagenase-1 (MMP-1) cleaves a variety of collagens such as collagen I, II, III, VII, and X, and stromelysin-1 (MMP-3) cleaves a variety of ECM components, including certain PGs, collagens, and procollagens [4]. In addition to its proteolytic activity, MMP-3 can activate itself and other MMPs [5] such as MMP-1. MMP-1 and MMP-3 have been implicated in OA [6-9]. Among the earliest changes to cartilage in OA is a loss of PGs, primarily due to proteolytic cleavage of the aggrecan core by MMPs and aggrecanases [10,11]. The breakdown of type II collagen appears at late stages of OA after PG depletion and increases significantly with the severity of the disease [12,13].

Apoptosis, or programmed cell death, differs from necrosis. Apoptosis is involved in the maintenance of homeostasis in adult and embryonic tissue [14]. However, chondrocyte apoptosis has been related to the development of OA [15,16]. Chondrocyte death has a significant role in the development of OA and in the repair of the ECM [17]. A direct relationship between the severity of OA and the frequency of apoptotic chondrocyte death has been observed [18].

The mechanical loading generated during daily activity is a fundamental stimulus for the activity of chondrocytes. Articular cartilage responds to increased mechanical demands by changing the composition of its organic matrix [19-24]. Although mechanical load is a known regulatory factor of cartilage metabolism, the role of proteolytic enzymes in the integrity of matrix maintenance is unclear. Loading effects on cartilage have been widely studied *in vitro* [19-23,25-29]. Although these studies have allowed monitoring of cellular response under closely controlled loading conditions, they have generated inconsistent results due to experimental variation, namely in the tissue evaluated (that is, anatomical location of tissue harvest, species, and age) and test conditions used (for example, loading pressure, time, and frequency and the mechanism used to apply pressure). *In vivo* research, performed primarily with animals, has also led to controversial results due to physiological differences between the species studied [24,30-35]. Furthermore, the results obtained from animals cannot always be extrapolated to humans. Bjelle [36] has analysed the mechanical response of human knees and found an increase in glycosaminoglycan production in load-bearing areas. On the other hand, there are no human *in vivo* studies relating, in the hip joint, the grade of apoptosis with the biomechanical loads.

Table 1

Demographic data of cartilage donors

	Osteoporotic fracture		Osteoarthritis	
	<i>n</i>	Mean age ± SD (years)	<i>n</i>	Mean age ± SD (years)
Women	11	77.8 ± 2.49	7	69.6 ± 8.87
Men	3	84 ± 2.31	10	64.6 ± 8.6

Samples used for protein matrix analysis. Gender and mean age ± SD of patients with osteoarthritis and healthy subjects included in this study. SD, standard deviation.

With this study, we aimed to elucidate the role of MMP-1 and MMP-3 in cartilage composition and to analyse the apoptosis of chondrocytes in response to mechanical load in articular cartilage obtained from maximum- and minimum-weight-bearing regions of human femoral heads. The results suggest that MMPs play a key role in regulating the balance of structural proteins of the articular cartilage matrix according to local mechanical demands. Moreover, no differences in apoptosis levels were found for femur poles, suggesting that mechanical load regulates cartilage matrix composition but does not affect chondrocyte viability.

Materials and methods

Obtaining articular cartilage

Human articular cartilage was obtained from hip joints after hip replacement under institutional review. All subjects provided written informed consent before being included in the study. Osteoarthritic specimens were collected from patients with primary symptomatic OA diagnosed by American College of Rheumatology criteria [37], and normal cartilage samples were collected from patients with osteoporotic fracture (OF) with no history of joint disease and with macroscopically normal cartilage. Patients with inflammatory pathology, crystal deposition diseases, osteonecrosis, hip dysplasia or malalignment, or senile ankylosing vertebral hyperostosis (Forestier's disease), as well as patients receiving corticoids or SYSA-DOA (slow-acting drugs that can modify the symptoms of OA), were excluded. A total of 17 OA and 14 OF femoral heads were used to analyse the ECM proteins (Table 1), and a different joint set of 19 OA and 14 OF femoral heads was employed to carry out experiments focused on apoptosis (Table 2).

General procedure

The cartilage was dissected from subchondral bone and separated into zones of maximum and minimum mechanical load according to the topographic division of Li and Aspden [38]. Cartilage samples from high loaded areas were named superior pole (SP) and those from low loaded areas were named inferior pole (IP). The laminate tissue was cryopreserved at -80°C until use for protein analysis. The cartilage used for RNA quantification was diced and incubated with RNAlater (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) overnight at 4°C prior to storage

at -80°C. Femoral heads lacking sufficient cartilage to perform RNA and protein quantification were discarded. Cartilage was digested to isolate chondrocytes. Recently isolated chondrocytes (non-culture chondrocytes) were used to quantify apoptosis and mitochondrial depolarisation.

Extraction and quantification of cartilage matrix proteins

The procedure was performed according to a previous study [39] with some modifications. Briefly, cartilage samples were suspended in an appropriate volume of cold extraction buffer (0.05 M Tris-HCl [pH 7.5], 0.1% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate), and Complete EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)-free protease inhibitor cocktail [Roche Diagnostics, Basel, Switzerland]) to obtain 10% (wt/vol) total cartilage homogenate. Samples were homogenised using a T8 Ultra-Turrax homogeniser (IKA Works, Inc., Wilmington, NC, USA). A 200- μ l volume of homogenate was then mixed with 100 μ l of 8 M guanidine hydrochloride, and 500 μ l of 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) was added to the mixture. The solution was incubated overnight at 4°C with constant stirring before centrifugation at 10,000 *g* for 5 minutes at 4°C. The supernatant, containing the soluble fraction of cartilage matrix (PGs and MMPs), was carefully removed, aliquotted into separate tubes, and stored at -80°C until use. The pellet, which contained the collagen fibers, was washed extensively with cold distilled water and dissolved for native type II collagen detection according to the manufacturer's protocol (Chondrex, Inc., Redmond, WA, USA, distributed by MD Biosciences, Zürich, Switzerland). The supernatant aliquots were used to determine the concentrations of aggrecan (PG EASIA; BioSource Europe S.A., now part of Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), MMP-1 and MMP-3 (Biotrak ELISA System; Amersham Biosciences, now part of GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer instructions, and total soluble protein via Bradford's method [40]. This last value was used to normalise the respective ELISA data for comparing the samples.

Total RNA isolation and gene expression quantification of cartilage matrix proteins

Cartilage samples (50 mg) were suspended in 1 ml of Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) and homogenised using a T8 Ultra-Turrax homogeniser (IKA Works, Inc.) and, finally, the RNA was extracted according to Tri Reagent manufacturer instructions. Total RNA was quantified at 260 nm, and 150 ng was used to synthesise the DNA complementary strand according to the protocol of TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The product was diluted by half with RNase-free pure water, and 1 μ l of the resultant solution was used to determine gene expression (aggrecan [AGC1], type II collagen [COL2A1], and MMP-1 and MMP-3) using quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). Briefly, real-time PCR was conducted in a volume of 20 μ l containing gene-

specific Assay on Demand primers and TaqMan-MGB probe and 10 μ l TaqMan Universal PCR MasterMix 2X (Applied Biosystems) in the following sequence: 2 minutes at 50°C, followed by 50 cycles at 95°C for 15 seconds, and then at 60°C for 60 seconds in 384-well plates with the ABI PRISM 7900 HT Detection System (Applied Biosystems). Results were analysed using the SDS software version 2.1 (Applied Biosystems), and expression levels were calculated versus 18S expression (relative expression) using arbitrary units. All real-time PCRs for each sample were performed in triplicate. Real-time PCR for 18S was carried out under the same conditions, using an 18S endogenous control Assay on Demand (Applied Biosystems).

Chondrocyte viability analysis

The cartilage surfaces were rinsed with saline and sliced full thickness, excluding the mineralised cartilage and the subchondral bone. To isolate the cells, the cartilage surfaces were rinsed with saline and the tissue was incubated at 37°C with trypsin for 10 minutes. After the trypsin solution was removed, the cartilage slices were treated with type IV collagenase (2 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 12 to 16 hours. Human chondrocytes were recovered, cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion, and chondrocytes were employed to quantify apoptosis and mitochondrial depolarisation.

DNA labeling technique for flow cytometric analysis

Cells were fixed in 70% ethanol at 4°C for 60 minutes, washed with water, incubated with RNase (50 μ g/ml) and propidium iodide (PI) (100 μ g/ml) for 15 minutes at room temperature in the dark, and then stored at 4°C. PI fluorescence of nuclei was measured by flow cytometry (FAC) on a FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) using a 560-nm dichromatic mirror and a 600-nm band-pass filter. Data are expressed as percentage apoptotic (hypodiploid) nuclei in total cell population.

Determination of mitochondrial membrane potential

The fluorescent probe JC-1 (5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazole carbocyanide iodide) was used to measure the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ m) of chondrocytes. JC-1 exists as a monomer at low values of $\Delta\psi$ m (green fluorescence) but forms aggregates at high $\Delta\psi$ m (red fluorescence). Thus, for mitochondria with normal $\Delta\psi$ m, JC-1 forms aggregates (red fluorescence), whereas with de-energised or depolarised $\Delta\psi$ m, JC-1 remains a monomer (green fluorescence).

Chondrocytes (5×10^5) were washed in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) and incubated with 10 μ g/ml JC-1 at 37°C for 15 minutes. Cells were pelleted at 200 *g* for 5 minutes, washed in PBS, and then analysed by FAC using a FACScan and Cell-Quest software (Becton Dickinson). The analyser threshold was adjusted on the forward scatter chan-

nel to exclude the majority of subcellular debris. Photomultiplier settings were adjusted to detect JC-1 monomer fluorescence signals on the FL1 detector (green fluorescence, centered at approximately 390 nm) and JC-1 aggregate fluorescence signals on the FL2 detector (red fluorescence, centered at approximately 340 nm). The data were analysed with Paint-a-Gate Pro software (Becton Dickinson). Mean fluorescence intensity values for FL1 and FL2, expressed as relative linear fluorescence channels (arbitrary units scaled from channels 0 to 10,000), were obtained for all experiments. In each experiment, at least 20,000 events were analysed. The relative aggregate/monomer (red/green) fluorescence intensity values and percentage depolarisation were used for data presentation.

Western blot

Cells were washed in ice-cold PBS (pH 7.5) and lysed in 0.2 M Tris-HCl (pH 6.8) containing 2% SDS, 20% glycerol, 1 µg/ml cocktail inhibitor (Sigma-Aldrich), and 1 mM PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride) (Sigma-Aldrich). Whole-cell lysates were boiled for 5 minutes, and protein concentrations were determined using a BCA (bicinchoninic acid) reagent assay (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA). The protein extracts (30 µg) were resolved on 12.5% SDS-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon P; Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were first blocked in Tris buffered saline (pH 7.4) containing 0.1% Tween-20 and 5% non-fat dried milk for 60 minutes at room temperature and then incubated overnight with anti-bcl-2 (mouse anti-human bcl-2; R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, Oxfordshire, UK) at 4°C. After washing, the membranes were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies and developed using an ECL chemiluminescence kit (GE Healthcare). To ensure that equal amounts of total proteins were charged, we also hybridised each membrane with anti-tubuline (Sigma-Aldrich).

Data analysis

Data was analysed with SSPS 10.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The ratio of aggrecan to type II collagen was calculated from ELISA data. Both sets of data were obtained from the same protein extraction tube: the PG was located in the supernatant, whereas the type II collagen was located in the pellet. MMP-1 and MMP-3 data obtained from ELISAs were normalised using data from total soluble protein quantification after PG extraction. Thus, the ELISA values were not representative of the protein concentration in the tissue. The results were expressed as a percentage of total protein content. Real-time PCR results were normalised using the endogenous control 18S and the same sample was used for relative quantification. Apoptosis results were expressed as mean ± standard deviation. Individual donors were studied in triplicate; cells from different donors were not pooled in any experiment.

Table 2

Demographic data of cartilage donors

	Osteoporotic fracture		Osteoarthritis	
	<i>n</i>	Mean age ± SD (years)	<i>n</i>	Mean age ± SD (years)
Women	13	78.1 ± 3	15	68.8 ± 8
Men	1	81	4	73.5 ± 6

Samples used for apoptotic studies. Gender and mean age ± SD of patients with osteoarthritis and healthy subjects included in this study. SD, standard deviation.

To examine the statistical significance of differences between cartilage areas (that is, SP versus IP), pair-wise comparisons between poles from the same sample were assessed using the Wilcoxon paired-sample test. The test was used to reduce the variance due to the high inter-individual variability. Differences between OA and OF cartilages were evaluated using the Mann-Whitney *U* test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

Results

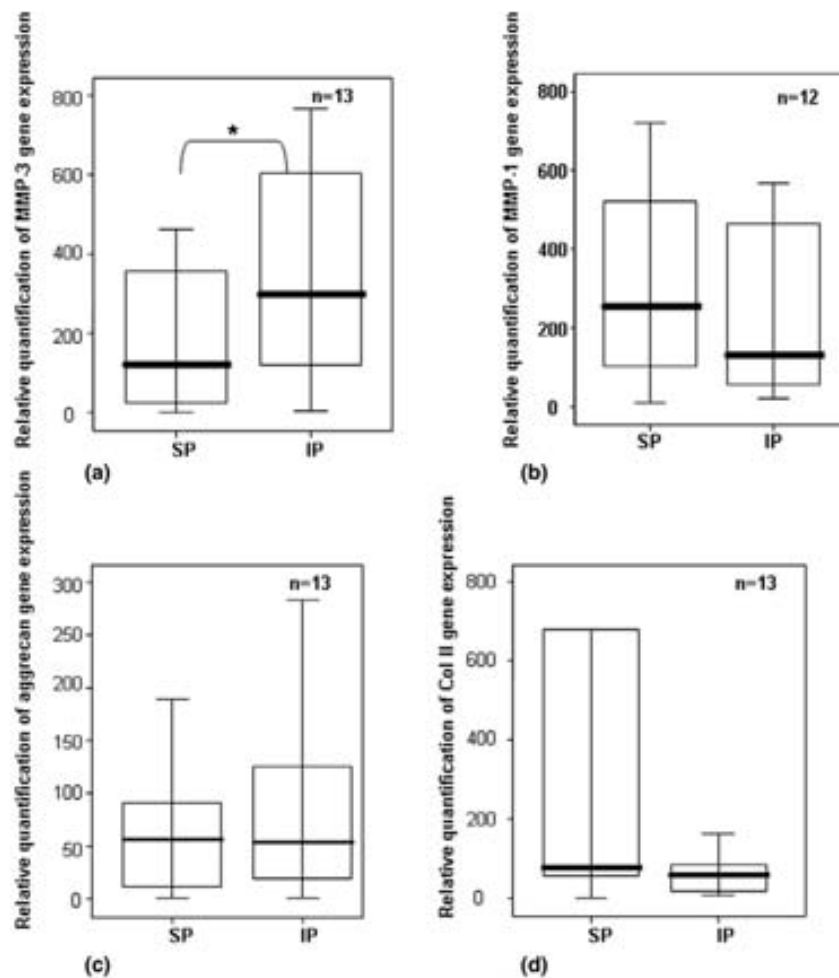
Effect of load on matrix cartilage

Because data from ELISA and from real-time PCR did not follow a normal distribution, according to the K-S test ($p < 0.05$), and the variances were not homogeneous, according to the Levene test ($p < 0.05$), non-parametric tests were used. The Wilcoxon signed rank test was used to compare related samples obtained from the same joint (SP versus IP), whereas the Mann-Whitney *U* test was used to analyse independent samples of observations (OF or OA femoral heads). Both statistical tests are recommended for small samples. These tests analyse the median difference (Figures 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) in paired data (OA versus OF or SP versus IP).

The first set of experiments was centred to analyse variations in mRNA levels between poles via real-time PCR. The results, in healthy cartilage, showed that the load reduced the mRNA levels of MMP-3 (Figure 1a), whereas no differences were found in MMP-1 gene expression (Figure 1b). No significant differences between pressure areas were found in aggrecan (Figure 1c) or type II collagen gene expression levels (Figure 1d). However, COL2A1 showed increased mRNA levels in the weight-bearing areas (mean ± standard error [SE]: SP = 2378.55 ± 1562.23; IP = 83.3 ± 31.36). When areas from OA cartilage were analysed, no differences between poles were found for MMP-1 or MMP-3 (data not shown).

The next set of experiments was carried out to analyse the effect of loading on the levels of MMP-1 and MMP-3 protein synthesis. Because the ELISA kit used to detect MMP screens the total MMP content (that is, free MMP, proMMP, and MMP/TIMP [tissue inhibitor metalloproteinase] complexes), we could not discriminate between active and inactive forms of MMP. MMP-1 quantification revealed that the load reduced

Figure 1



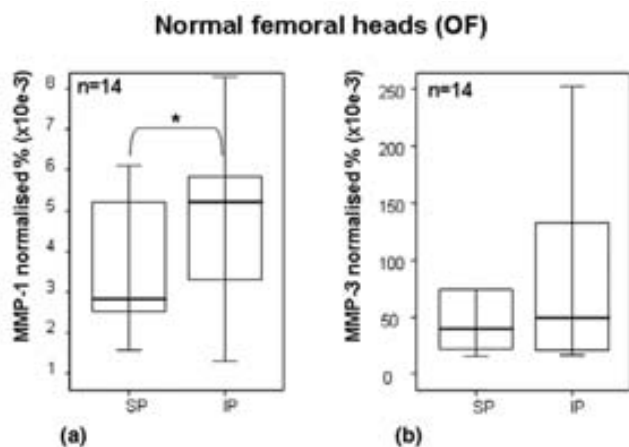
Gene expression of MMPs, aggrecan, and type II collagen. Quantification of gene expression of (a) MMP-3, (b) MMP-1, (c) aggrecan, and (d) type II collagen in chondrocytes from normal human femoral heads using real-time polymerase chain reaction. 18S rRNA was used as endogenous control, and the results are relative to a certain sample pertaining to the experiment. Separated maximum (SP) and minimum (IP) mechanical load areas were obtained from each femoral head. The horizontal bar shows the median, the box is the interquartile range, and the vertical lines show the atypical values. The Wilcoxon signed rank test was used to compare areas within the same joint. *Significant differences between poles, in MMP-3 values, were found, $p < 0.05$. No significant differences were found in MMP-1, aggrecan, and type II collagen gene expression. IP, inferior pole; MMP, matrix metalloproteinase; n, number of femoral heads used in the experiment; SP, superior pole.

the protein level ($p < 0.05$) (Figure 2a). In the case of MMP-3, no significant differences were found, although a subtle increase in MMP-3 protein levels was observed at the inferior (non-weight-bearing) pole (Figure 2b). The MMP-3 protein results were in concert with the results observed for mRNA assessment (Figure 1a). When areas from OA cartilage were analysed, no differences between poles were found for MMP-1 or MMP-3 (Figures 3a and 3b, respectively). In all cases, the quantity of MMP-1 in the matrix was inferior to that of MMP-3 (Figures 2 and 3).

To evaluate the balance between the major matrix proteins in normal and in pathologic cartilage, the ratio of aggrecan to type II collagen was determined by ELISA. This ratio allows

normalisation of data and elimination of variability due to cartilage quality, cartilage wet weight, and experimental variation. Significant differences ($p < 0.001$) were found when OA and OF cartilages were compared (Figure 4). These differences were found for both poles. Compared with normal cartilage, OA cartilage showed 10- to 20-fold less aggrecan with respect to type II collagen. This variation reflected an imbalance of the proteins in human OA cartilage. No significant differences between weight-bearing areas were found for OF or OA cartilage (Figure 4). However, a trend was found for OF hips ($p = 0.057$), using the signal test: IP was observed at a lower ratio than SP (approximately equal to three folds), and the proportion was maintained independently of cartilage condition.

Figure 2



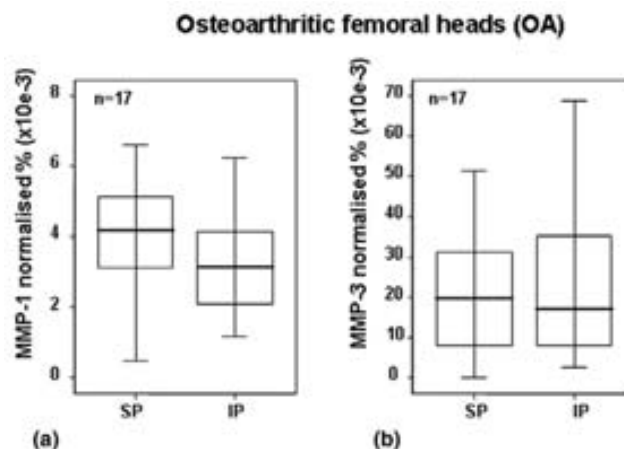
Quantification of MMP-1 and MMP-3 by ELISA in OF cartilage. Quantification of (a) MMP-1 and (b) MMP-3 in articular cartilage from normal human femoral heads using ELISA. Values were normalised to total soluble protein, which was obtained after proteoglycan extraction and was quantified by Bradford method. Separated maximum (SP) and minimum (IP) mechanical load areas were obtained from each femoral head. The horizontal bar indicates the median, the box is the interquartile range, and the vertical lines indicate the atypical values. Median values were expressed as percentages. The Wilcoxon signed rank test was used to compare areas within the same joint. *Significant differences in MMP-1 values between areas were found ($p < 0.05$). No significant differences were found in MMP-3 values. ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IP, inferior pole; MMP, matrix metalloproteinase; n, number of femoral heads used in the experiment; OF, osteoporotic fracture; SP, superior pole.

Effect of load on chondrocytes

Normal cells had diploid DNA, whereas apoptotic cells contained low-molecular weight DNA. FAC results obtained from six samples of OA chondrocytes showed a mean percentage of apoptotic cells \pm SE of $30.92\% \pm 4.12\%$ in maximum-weight-bearing regions and $51.4\% \pm 5.23\%$ in minimum-weight-bearing regions. FAC results from three samples of OF chondrocytes showed a mean percentage of apoptotic cells \pm SE of $11.7\% \pm 3.5\%$ in SP and $10.1\% \pm 3.9\%$ in IP (Figure 5). No differences were found between areas under either set of cartilage conditions. However, significant differences were found between OA and OF cartilage ($p < 0.05$).

Because mitochondria play an important role in programmed cell death, we analysed $\Delta\psi_m$ values for the loading and non-loading zones of both chondrocyte populations. The same ratio of red/green fluorescence was observed for both groups (1.2 ± 0.3 versus 1.3 ± 0.8) of OA chondrocytes. Moreover, no difference in the percentage of chondrocyte depolarisation was found (load: 13.85 ± 6.92 versus no load: 16.92 ± 7.47). In OF chondrocytes, the ratios of red/green fluorescence were 3.3 ± 1 (load) and 3.1 ± 0.9 (no load), and the percentages of depolarisation were 5.7 ± 1.9 and 6.3 ± 2.1 , respectively (Figure 6). No significant differences between the areas were found. However, significant differences ($p < 0.05$) were found

Figure 3



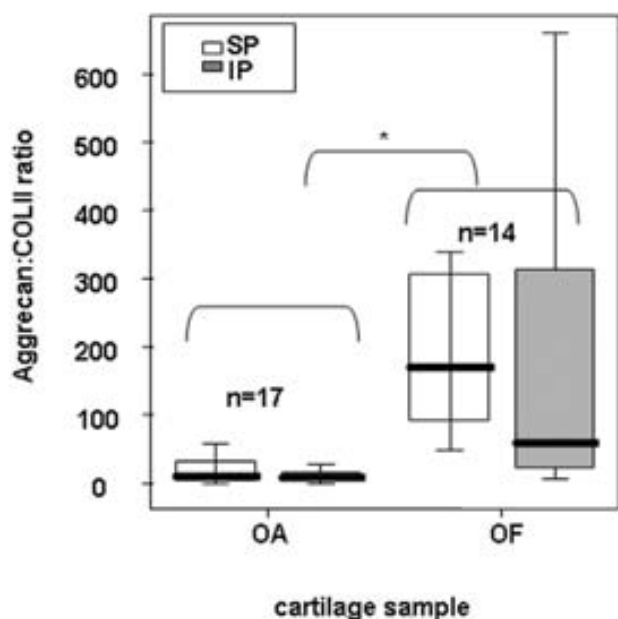
Quantification of MMP-1 (a) and MMP-3 (b) by ELISA in OA cartilage. Quantification of MMP-1 and MMP-3 in articular cartilage from OA human femoral heads using ELISA. Values were normalised to total soluble protein, and medians were expressed as percentages. Separated maximum (SP) and minimum (IP) mechanical load areas were obtained from each femoral head. The horizontal bar indicates the median, the box is the interquartile range, and the vertical lines indicate the atypical values. The Wilcoxon signed rank test was used to compare areas within the same joint. No significant differences between areas were found. ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IP, inferior pole; MMP, matrix metalloproteinase; n, number of femoral heads used in the experiment; OA, osteoarthritis; SP, superior pole.

between OA and OF chondrocytes. Lastly, synthesis of bcl-2 protein was higher in OA chondrocytes than in normal cells. However, a similar synthesis of bcl-2 was found in loading and non-loading zones (Figure 7a,b).

Discussion

Under physiological loading conditions, the cartilage matrix suffers compressive, tensional, and shear stress. Appropriate joint loads maintain healthy cartilage with a specific protein composition according to loading demands [32,35]. In contrast, inappropriate loads alter the compositional properties of cartilage, leading to OA [22]. OA is the most common joint disease in humans and is characterised by a progressive loss of articular cartilage in joints. In OA, there is a disruption of the delicate balance between degradation and synthesis of the cartilage ECM which is maintained by chondrocytes. Although the loading effect on OA physiopathology is well known, the mechanisms by which loads affect matrix composition and cell death are unclear. This study was designed to clarify the *in vivo* behaviour of human articular cartilage from femoral heads in response to load. Given that human femoral heads are subjected to different loads *in vivo* at defined sites (the SP is the most highly loaded, whereas the IP is the least loaded [38]), we decided to obtain both areas from the same hip and subsequently to evaluate them for differences in gene expression, protein content, and apoptosis. The use of human samples, as opposed to animal samples, provides information that is more relevant to real human articular cartilage and its physiopathol-

Figure 4

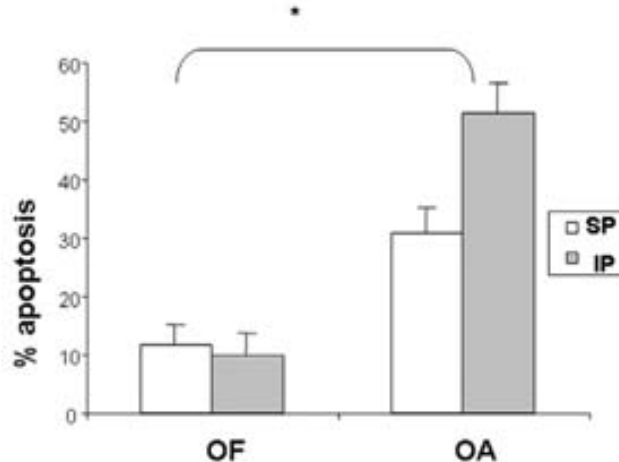


Analysis of aggrecan and type II collagen in OF and OA cartilage. Ratio of aggrecan to type II collagen in the cartilage matrix of OA and OF femoral heads and comparison between areas (SP and IP). Aggrecan and type II collagen were quantified using ELISA after cartilage proteoglycan extraction. Aggrecan was assessed from supernatant soluble fraction, and collagen was assessed from pellet fraction of the same tube. The horizontal bar indicates the median, the box is the interquartile range, and the vertical lines indicate the atypical values. *Significant differences between OA and OF heads were found ($p < 0.05$) using the Mann-Whitney U test. These differences were found for both poles. No significant differences between weight-bearing areas were found, but a trend was found between poles for OF hips ($p = 0.057$) using the Wilcoxon signed rank test. ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IP, inferior pole; n, number of femoral heads used in the experiment for each cartilage condition (osteoarthritis or osteoporotic fracture); OA, osteoarthritis; OF, osteoporotic fracture; SP, superior pole.

ogy. On the other hand, studies with human samples can also suffer from wide variability caused by uncontrolled environmental factors. In the present study, samples of both poles were collected from the same hip to minimise inter-individual variability during data comparison.

Several *in vitro* and *in vivo* studies have supported the view that load response is governed by proteases [30,41,42]. Sun *et al.* [42] examined the effects of loading on fibroblast-like synoviocyte cells, focusing on the expression and activity of MMP-1 and MMP-13. The results showed that the cyclic strain reduced the mRNA and protein levels of MMP-1 and MMP-13. Moreover, decreased MMP-2 levels were found in human OA chondrocytes *in vitro* under intermittent hydrostatic pressure [43]. Furthermore, proteinase inhibition has been observed *in vivo* in animal models when cyclic mechanical loads were used [30]. Our results using human cartilage *in vivo* demonstrated that load reduced the protein and mRNA expressions of MMP-1 and MMP-3, respectively (Figures 1 and 2). This

Figure 5

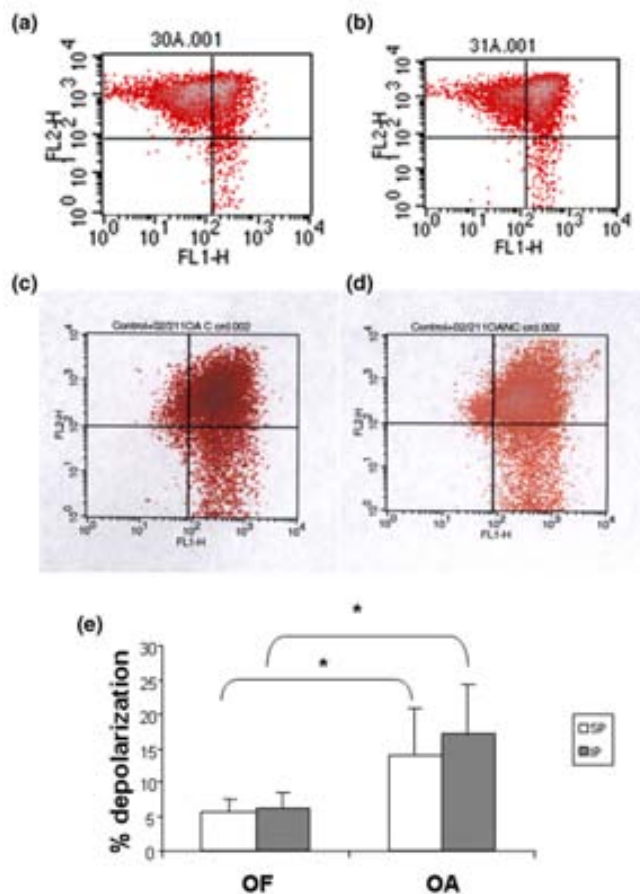


Quantification of apoptosis in OF and OA cartilage. Quantification of apoptosis. Percentage of apoptotic cells measured by flow cytometry of OA ($n = 6$) or OF ($n = 3$) femoral heads and comparison between areas (SP and IP). No differences were found between areas for either set of cartilage conditions. *Significant differences ($p < 0.05$) were found between OA and OF cartilage. IP, inferior pole; OA, osteoarthritis; OF, osteoporotic fracture; SP, superior pole.

finding is consistent with the aforementioned studies. Moreover, MMP-1 levels were much lower than those of MMP-3, confirming the results of the previous report [44]. This work shows the important role of MMPs in loading response *in vivo*. On the other hand, no differences were found between pressure areas in OA cartilage when MMPs were quantified (data not shown). This result suggested that OA cartilage might suffer from a loss of regulation of MMP synthesis, for which we have conceived three hypotheses. In the first scenario, OA cartilage has lower cellularity and consequently a lower response capacity. Another possibility is that OA chondrocytes may be less sensitive to loading response. Lastly, other inflammatory factors may act on chondrocytes mainly as stimuli hiding the load effect. This loss of regulation could be involved in the development of OA.

The normal function of articular cartilage relies on the structural integrity and biochemical composition of the ECM. Aggrecan and type II collagen, the two major structural matrix macromolecules, are critical components of ECM which determine the mechanical properties of the tissue. Given that both content and organisation of these components appear to be related to local functional requirements, the balance between aggrecan and type II collagen could be a critical parameter for matrix integrity. Therefore, articular cartilage areas with different loading demands require different structural protein concentrations. We propose that successful cartilage function depends on how joint loads influence proteinase expression, which could modify the balance between aggrecan and type II collagen.

Figure 6



Mitochondrial depolarisation in OF and OA chondrocytes. Percentage depolarisation of OA or OF femoral heads and comparison between areas (SP and IP). (a, b) OF cartilage. (a) and (b) show results of chondrocytes from SP and IP zones, respectively. (c, d) OA cartilage. (c) and (d) show results of chondrocytes from SP and IP zones, respectively. (e) Quantification of mitochondrial depolarization. No differences were found between areas for either set of cartilage conditions. *Significant differences were found between OA and OF cartilage. IP, inferior pole; OA, osteoarthritis; OF, osteoporotic fracture; SP, superior pole.

Different protein compositions were observed as a function of loading demand (Figure 4). The weigh-bearing zones had a higher ratio of aggrecan/type II collagen than did no-loading areas. These results indicated that articular cartilage can change the composition of its organic matrix in response to increased mechanical demands. Others studies agree with these results, showing that higher loads increase the concentration of PGs in articular cartilage [22,34,45]. Elevated amounts of PGs can be expected to amplify tissue elasticity through osmotic effects. Load could increase the concentration of PGs in articular cartilage as a result of increased synthesis and/or reduced degradation. Comparison of the hip poles for gene expression levels revealed lower expression levels of MMP-3 in the SP but no difference in aggrecan gene expression (Figures 1 and 2). If it were the case that gene

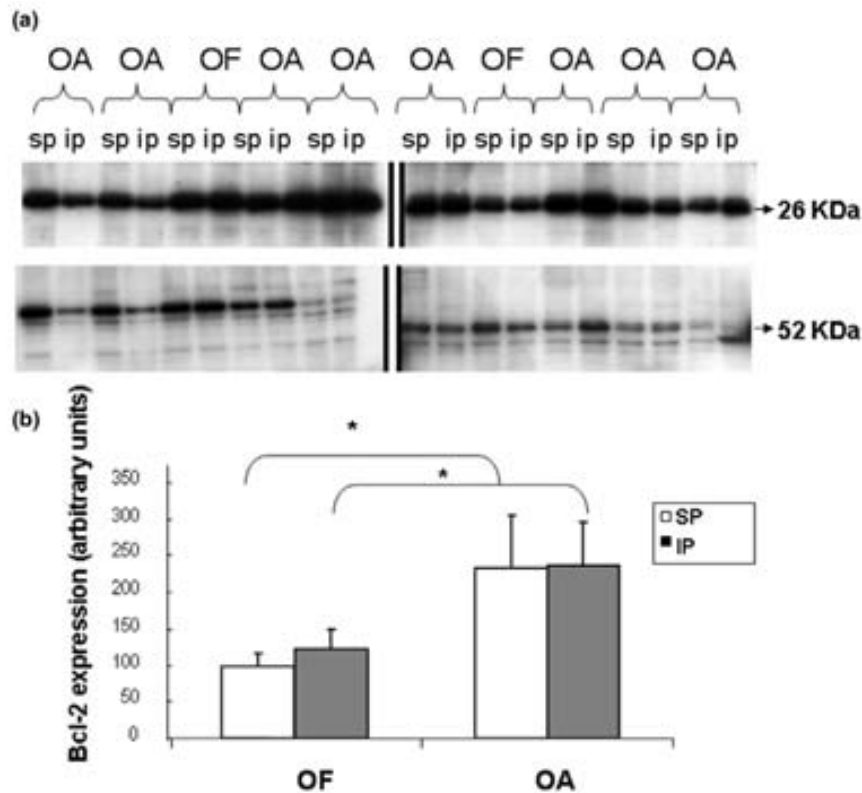
expression corresponded to real protein synthesis, our results would indicate that differences in aggrecan levels between poles could be a consequence of decreased degradation. However, we cannot discard other post-transcriptional processes in the regulation of protein content.

Load also affects the content of type II collagen. The gene expression results did not show significant differences between poles, but an evident trend was noticed when medians and means were compared (Figure 1d). We hypothesise that the high degree of variability among individuals made it difficult to find significant differences in collagen synthesis. Several *in vitro* studies have shown that mechanical compression enhances the expression of type II collagen [19,22]. However, our results demonstrated that the concentration of type II collagen is regulated by a combination of increased gene expression and reduced degradation by MMP-1 (Figures 1d and 2a). We interpret that the cartilage attempts to repair the effect of the pressure and shear over areas submitted to higher loads. Therefore, pressure could be viewed as a stimulus for ECM protection and maintenance.

OA cartilage often exhibits a decompensate synthesis of the components. OA begins through depletion of PGs and fibrillation of the superficial collagen network at the cartilage surface [45,46]. The breakdown of type II collagen follows the degradation of PGs and is severe at late stages of OA [12,13]. A decrease in the concentration of superficial PG, as well as separation and disorganisation of the superficial collagen fibrils, occurred before deterioration of the cartilage [45]. Our results demonstrated an altered ratio of PG to type II collagen with a drastic depletion of aggrecan in both hip poles. OA cartilage showed lower levels of aggrecan with respect to collagen because the variation in PG content was the first detectable abnormality in the pathogenesis. Accordingly, we detected PG depletion before loss of type II collagen. Alternatively, PG loss may occur prior to loss of collagen, which has been shown to be retained in the fibril after denaturation and cleavage and is therefore not released [12]. However, we cannot know whether the imbalance of PG and type II collagen is a consequence or cause of OA.

Cell death by injurious mechanical load has been observed in both *in vivo* and *in vitro* studies, although some of these studies have reported that apoptosis did not appear to be the cause [2,47]. However, injurious mechanical loading has also been observed to significantly increase the number of apoptotic cells [48,49]. A proportionately similar reduction in the cellularity of the SP and IP in normal femoral heads with age has likewise been described [50]. This reduction seems to be independent of local ambient factors such as biomechanical load. However, no study has been performed to assess the daily loading effect on chondrocyte viability in healthy and OA human cartilage *in vivo*. Therefore, our intention was to elucidate whether the different load-bearing areas had different

Figure 7



Analysis of bcl-2 in OA and OF chondrocytes. Western blot of bcl-2 in OA or normal (OF) chondrocytes and comparison between areas (SP and IP). **(a)** Aliquots of total cell lysates were subjected to SDS-PAGE; immunoblotting was performed using anti-bcl-2 antibody as described in Materials and methods. Molecular size markers are shown on the left (26 kDa = bcl2; 52 kDa = Tubulin). Data are representative of four separate experiments. **(b)** Percentage of basal protein expressed as arbitrary densitometric units. Levels of bcl-2 protein were significantly higher in OA cartilage than in normal cartilage. IP, inferior pole; OA, osteoarthritis; OF, osteoporotic fracture; SP, superior pole.

degrees of cellular apoptosis *in vivo*. The study was performed using three complementary approaches, including the nucleus and mitochondria processes: detection of low-molecular weight DNA, determination of mitochondrial membrane potential, and quantification of the synthesis of bcl-2, an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.

In human adult normal articular cartilage, cell loss increases with age [50,51] and is greater in OA human cartilage than in normal cartilage [51,52]. Several groups of investigators have shown a relationship between apoptosis and the development of OA cartilage [15,16,18,49,53], reporting that the percentage of apoptotic cells is greater in OA than in normal cartilage and that the percentages in OA cartilage vary with the method used, ranging from an average of 51% [15] to 1.4% [18]. The results obtained in our study corroborate those previously reported in freshly isolated chondrocytes. The percentage of apoptotic cells in OA and normal cartilage was approximately 44% and 10%, respectively. A hypothesis to explain the high percentage of chondrocyte apoptosis in both normal and OA cells is that the enzymatic digestion process induces or accel-

erates apoptosis in chondrocytes. It has been reported that collagenase is a pro-apoptotic factor [54,55]. Interestingly, we have not observed differences in the percentages of apoptotic cells between maximum- and minimum-weight-bearing regions in OA or in normal hips, suggesting that load does not influence chondrocyte apoptosis. Curiously, in OA cartilage, the percentage of apoptosis in SP was numerically (but not significantly) higher than in IP. Furthermore, mitochondrial depolarisation showed that OA cartilage has higher levels at both poles than normal cartilage, as was reported [56]. However, Bcl-2 levels were higher in OA cartilage than normal cartilage, confirming the result reported. Finally, we did not find differences in any parameter analysed between both poles in normal cartilage, suggesting that normal loads are not involved in cell-programmed death.

Conclusion

These data suggest that the synthesis of MMPs plays a key role in the response of human femoral head articular cartilage to mechanical loading. The results show that major load reduced the mRNA and protein levels of MMP-1 and MMP-3. However, a similar role for MMPs was not observed for OA

cartilage. Furthermore, the diverse ratios of aggrecan to type II collagen found in the matrix cartilage areas according to load-bearing capacity suggest that the balance between the major structural proteins seems to be crucial to the integrity and function of the tissue. This balance is lost in OA cartilage at both hip poles, and this loss may cause the tissue destabilisation that characterises the pathogenesis of the disease. Our results have not shown a direct relationship between the percentage of apoptotic chondrocytes and the areas of maximal and minimal load of the coxofemoral joint.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JM was involved in the conception and design of the study, helped to draft the manuscript, and gave final approval of the version to be published. PB was involved in drafting the manuscript and revised it critically for important intellectual content. NGG carried out the experimental procedures of the cartilage matrix part, performed the statistical analysis, and helped to draft the manuscript. JCM conducted the hip replacement, collected the samples, and checked clinical histories for the inclusion and exclusion criteria. MJLA carried out the Western blot experiments. AB carried out the studies centred in mitochondrial depolarisation and quantification of apoptosis by cytometry. FJB conceived of the study, participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the Serveis Científic-Tècnics, Universitat Pompeu-Fabra, for quantitative PCR and G. Y. Qushair for revising the English. This study was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS 01/0054-01 and FIS 01/0054-02) and Xunta de Galicia (PGIDIT02PXIC91604PN and PGIDIT03BTF91601PR). AB is the recipient of a grant from the "Fundación Española de Reumatología." MJLA was supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología, Programa Ramon y Cajal.

References

- Aigner T, Hemmel M, Neureiter D, Gebhard PM, Zeiler G, Kirchner T, McKenna L: **Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritic human articular knee cartilage.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**:1304-1312.
- Bendele AM, White SL: **Early histopathologic and ultrastructural alterations in femorotibial joints of partial medial meniscectomized guinea pigs.** *Vet Pathol* 1987, **24**:436-443.
- Horton WE Jr, Feng L, Adams C: **Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease.** *Matrix Biol* 1998, **17**:107-115.
- Welgus HG: **Stromelysin: structure and function.** *Agents Actions Suppl* 1991, **35**:61-67. Review
- Nagase H, Ogata Y, Suzuki K, Enghild JJ, Salvesen G: **Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases.** *Biochem Soc Trans* 1991, **19**:715-718. Review
- Lohmander LS, Roos H, Dahlberg L, Hoerner LA, Lark MW: **Temporal patterns of stromelysin-1, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in human knee joint fluid after injury to the cruciate ligament or meniscus.** *J Orthop Res* 1994, **12**:21-28.
- Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasty KA: **Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**:2065-2074.
- Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK, et al.: **ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro.** *Nature* 2005, **434**:648-652.
- Woessner JF Jr, Gunja-Smith Z: **Role of metalloproteinases in human osteoarthritis.** *J Rheumatol Suppl* 1991, **27**:99-101.
- Billinghurst RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, et al.: **Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage.** *J Clin Invest* 1997, **99**:1534-1545.
- Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, et al.: **Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis.** *Nature* 2005, **434**:644-648.
- Hollander AP, Heathfield TF, Webber C, Iwata Y, Bourne R, Rorabeck C, Poole AR: **Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay.** *J Clin Invest* 1994, **93**:1722-1732.
- Lin PM, Chen CT, Torzilli PA: **Increased stromelysin-1 (MMP-3), proteoglycan degradation (3B3- and 7D4) and collagen damage in cyclically load-injured articular cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12**:485-496.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *Br J Cancer* 1972, **26**:239-257.
- Blanco FJ, Guitián R, Vázquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F: **Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**:284-289.
- Kouri JB, Aguilera JM, Reyes J, Lozoya KA, Gonzalez S: **Apoptotic chondrocytes from osteoarthritic human articular cartilage and abnormal calcification of subchondral bone.** *J Rheumatol* 2000, **27**:1005-1019.
- Lotz M, Hashimoto S, Kühn K: **Mechanisms of chondrocyte apoptosis.** *Osteoarthritis Cartilage* 1999, **7**:389-391.
- Kim HA, Lee YJ, Seong SC, Choe KW, Song YW: **Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis.** *J Rheumatol* 2000, **27**:455-462.
- Angele P, Schumann D, Angele M, Kinner B, Englert C, Hente R, Fuchtmeyer B, Nerlich M, Neumann C, Kujat R: **Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds.** *Biorheology* 2004, **41**:335-346.
- Burton-Wurster N, Vernier-Singer M, Farquhar T, Lust G: **Effect of compressive loading and unloading on the synthesis of total protein, proteoglycan, and fibronectin by canine cartilage explants.** *J Orthop Res* 1993, **11**:717-729.
- Sauerland K, Raiss RX, Steinmeyer J: **Proteoglycan metabolism and viability of articular cartilage explants as modulated by the frequency of intermittent loading.** *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11**:343-350.
- Smith RL, Carter DR, Schurman DJ: **Pressure and shear differentially alter human articular chondrocyte metabolism: a review.** *Clin Orthop Relat Res* 2004:S89-S95.
- Torzilli PA, Grigiene R, Huang C, Friedman SM, Doty SB, Boskey AL, Lust G: **Characterization of cartilage metabolic response to static and dynamic stress using a mechanical explant test system.** *J Biomech* 1997, **30**:1-9.
- Wei L, Hjerpe A, Brismar BH, Svensson O: **Effect of load on articular cartilage matrix and the development of guinea-pig osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2001, **9**:447-453.
- Bush PG, Hodkinson PD, Hamilton GL, Hall AC: **Viability and volume of in situ bovine articular chondrocytes-changes following a single impact and effects of medium osmolarity.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**:54-65.
- Islam N, Haqqi TM, Jepsen KJ, Kraay M, Welter JF, Goldberg VM, Malemud CJ: **Hydrostatic pressure induces apoptosis in human chondrocytes from osteoarthritic cartilage through up-regulation of tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase, p53, c-myc, and bax-alpha, and suppression of bcl-2.** *J Cell Biochem* 2002, **87**:266-278.
- Lane Smith R, Trindade MC, Ikenoue T, Mohtai M, Das P, Carter DR, Goodman SB, Schurman DJ: **Effects of shear stress on**

- articular chondrocyte metabolism. *Biorheology* 2000, **37**:95-107. Review
28. Sauerland K, Plaas AH, Raiss RX, Steinmeyer J: **The sulfation pattern of chondroitin sulfate from articular cartilage explants in response to mechanical loading.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1638**:241-248.
 29. Westacott CI, Urban JP, Goldring MB, Elson CJ: **The effects of pressure on chondrocyte tumour necrosis factor receptor expression.** *Biorheology* 2002, **39**:125-132.
 30. Behrens F, Kraft EL, Oegema TR Jr: **Biochemical changes in articular cartilage after joint immobilization by casting or external fixation.** *J Orthop Res* 1989, **7**:335-343. Erratum in: *J Orthop Res* 1990, **8**:627
 31. Borrelli J Jr, Tinsley K, Ricci WM, Burns M, Karl IE, Hotchkiss R: **Induction of chondrocytes apoptosis following impact load.** *J Orthop Trauma* 2003, **17**:635-641.
 32. Brama PA, Tekoppele JM, Bank RA, Barneveld A, van Weeren PR: **Functional adaptation of equine articular cartilage: the formation of regional biochemical characteristics up to age one year.** *Equine Vet J* 2000, **32**:217-221.
 33. King KB, Opel CF, Rempel DM: **Cyclical articular joint loading leads to cartilage thinning and osteopontin production in a novel in vivo rabbit model of repetitive finger flexion.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**:971-978.
 34. Wei L, Svensson O, Hjerpe A: **Proteoglycan turnover during development of spontaneous osteoarthritis in guinea pigs.** *Osteoarthritis Cartilage* 1998, **6**:410-416. Erratum in: *Osteoarthritis Cartilage* 1999, **7**:154.
 35. Murray RC, Birch HL, Lakhani K, Goodship AE: **Biochemical composition of equine carpal articular cartilage is influenced by short-term exercise in a site-specific manner.** *Osteoarthritis Cartilage* 2001, **9**:625-632.
 36. Bjelle AO: **Content and composition of glycosaminoglycans in human knee joint cartilage. Variation with site and age in adults.** *Conn Tissue Res* 1975, **3**:141-147.
 37. Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, Brown C, Cooke TD, Daniel W, Feldman D, et al.: **The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip.** *Arthritis Rheum* 1991, **34**:505-514.
 38. Li B, Aspden RM: **Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis.** *J Bone Miner Res* 1997, **12**:641-651.
 39. Kang SC, Li R, Wang C, Pan T, Liu T, Rubenstein R, Barnard G, Wong BS, Sy MS: **Guanidine hydrochloride extraction and detection of prion proteins in mouse and hamster prion diseases by ELISA.** *J Pathol* 2003, **199**:534-541.
 40. Bradford M: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
 41. Feng Y, Yang JH, Huang H, Kennedy SP, Turi TG, Thompson JF, Libby P, Lee RT: **Transcriptional profile of mechanically induced genes in human vascular smooth muscle cells.** *Circ Res* 1999, **85**:1118-1123.
 42. Sun HB, Yokota H: **Reduction of cytokine-induced expression and activity of MMP-1 and MMP-13 by mechanical strain in MH7A rheumatoid synovial cells.** *Matrix Biol* 2002, **21**:263-270.
 43. Trindade MC, Shida J, Ikenoue T, Lee MS, Lin EY, Yaszay B, Yerby S, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL: **Intermittent hydrostatic pressure inhibits matrix metalloproteinase and pro-inflammatory mediator release from human osteoarthritic chondrocytes in vitro.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12**:729-735.
 44. Wang L, Almqvist KF, Veys EM, Verbruggen G: **Control of extracellular matrix homeostasis of normal cartilage by a TGFbeta autocrine pathway. Validation of flow cytometry as a tool to study chondrocytes metabolism in vitro.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**:188-198.
 45. Arokoski JP, Jurvelin JS, Vaatainen U, Helminen HJ: **Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading.** *Scand J Med Sci Sports* 2000, **10**:186-198. Review
 46. Carney SL, Muir H: **The structure and function of cartilage proteoglycans.** *Physiol Rev* 1988, **68**:858-910. Review
 47. Lucchinetti E, Adams CS, Horton WE Jr, Torzilli PA: **Cartilage viability after repetitive loading: a preliminary report.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**:71-81.
 48. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW Jr, Lotz MK: **Impact of mechanical trauma on matrix and cells.** *Clin Orthop* 2001, **391**:S90-S99.
 49. Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M: **Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**:1266-1274.
 50. Vignon E, Arlot M, Patricot LM, Vignon G: **The cell density of human femoral head cartilage.** *Clin Orthop* 1976, **121**:303-308.
 51. Mitrovic D, Quintero M, Stankovic A, Ryckerwaert A: **Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces.** *Lab Invest* 1983, **49**:309-316.
 52. Mankin HJ, Dorfman H, Lippicello L, Zarins A: **Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology and metabolic data.** *J Bone Joint Surg Am* 1971, **53**:523-537.
 53. Héraud F, Héraud A, Harmand MF: **Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage.** *Ann Rheum Dis* 2000, **59**:959-965.
 54. Kim HA, Suh DI, Song YW: **Relationship between chondrocyte apoptosis and matrix depletion in human articular cartilage.** *J Rheumatol* 2001, **28**:2038-2045.
 55. Lo MY, Kim HT: **Chondrocyte apoptosis induced by collagen degradation: inhibition by caspase inhibitors and IGF-1.** *J Orthop Res* 2004, **22**:140-144.
 56. Maneiro E, Martín MA, De Andrés MC, López-Armada MJ, Fernandez-Sueiro JL, Del Hoyo P, Galdo F, Arenas J, Blanco FJ: **Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**:700-708.

2. Estudi del perfil proteolític d'MMP-13 en la degradació de diferents SLRPs del cartílag normal i artròsic

En aquesta secció es presenten els resultats d'un estudi que es va dur a terme a la unitat de recerca en Artrosi de l'Hospital Notre-Dame de Montreal durant una estada del doctorand en el període 2003-2005 en col·laboració amb el grup de Recerca Cel·lular en Inflamació i Cartílag de l'IMIM (Parc de Salut Mar, Barcelona), Espanya, i el Departament de Cirurgia de la Universitat McGill i la Unitat de Recerca Genètica del Shriners' Hospital for Children de Montreal, Quebec, Canadà.

L'estudi es va centrar en el perfil proteolític d'MMP-13 en la degradació de diferents SLRPs (decorina, biglicà, fibromodulina i lumicà) en cartílag normal o artròsic en diferents fases de severitat de la malaltia.

Els resultats d'aquest estudi van donar lloc a la següent publicació:

Monfort, J., Tardif, G., Reboul, P., Mineau, F., Roughley, P., Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., 2006. Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloprotease-13: identification of a new biglycan cleavage site. Arthritis Res Ther 8, R26.

Research article

Open Access

Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloprotease-13: identification of a new biglycan cleavage siteJordi Monfort¹, Ginette Tardif¹, Pascal Reboul¹, François Mineau¹, Peter Roughley², Jean-Pierre Pelletier¹ and Johanne Martel-Pelletier¹¹Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal Hospital Centre, Notre-Dame Hospital, 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada²Genetics Unit, Shriners' Hospital for Children, 1529 Cedar Avenue, Montreal, Quebec H3G 1A6, CanadaCorresponding author: Johanne Martel-Pelletier, jm@martel-pelletier.ca

Received: 4 Aug 2005 Revisions requested: 14 Sep 2005 Revisions received: 25 Nov 2005 Accepted: 28 Nov 2005 Published: 3 Jan 2006

Arthritis Research & Therapy 2006, **8**:R26 (doi:10.1186/ar1873)This article is online at: <http://arthritis-research.com/content/8/1/R26>© 2006 Monfort *et al.*; licensee BioMed Central Ltd.This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.**Abstract**

A major and early feature of cartilage degeneration is proteoglycan breakdown. Matrix metalloprotease (MMP)-13 plays an important role in cartilage degradation in osteoarthritis (OA). This MMP, in addition to initiating collagen fibre cleavage, acts on several proteoglycans. One of the proteoglycan families, termed small leucine-rich proteoglycans (SLRPs), was found to be involved in collagen fibril formation/interaction, with some members playing a role in the OA process. We investigated the ability of MMP-13 to cleave members of two classes of SLRPs: biglycan and decorin; and fibromodulin and lumican. SLRPs were isolated from human normal and OA cartilage using guanidinium chloride (4 mol/l) extraction. Digestion products were examined using Western blotting. The identities of the MMP-13 degradation products of biglycan and decorin (using specific substrates) were determined following electrophoresis and microsequencing. We found that the SLRPs studied were cleaved to differing extents by human MMP-13. Although only

minimal cleavage of decorin and lumican was observed, cleavage of fibromodulin and biglycan was extensive, suggesting that both molecules are preferential substrates. In contrast to biglycan, decorin and lumican, which yielded a degradation pattern similar for both normal and OA cartilage, fibromodulin had a higher level of degradation with increased cartilage damage. Microsequencing revealed a novel major cleavage site (... G₁₇₇/V₁₇₈) for biglycan and a potential cleavage site for decorin upon exposure to MMP-13. We showed, for the first time, that MMP-13 can degrade members from two classes of the SLRP family, and identified the site at which biglycan is cleaved by MMP-13. MMP-13 induced SLRP degradation may represent an early critical event, which may in turn affect the collagen network by exposing the MMP-13 cleavage site in this macromolecule. Awareness of SLRP degradation products, especially those of biglycan and fibromodulin, may assist in early detection of OA cartilage degradation.

Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most common rheumatologic disease, with high incidence and morbidity. Even though the early pathophysiological process remains to be elucidated, one of the first alterations in OA cartilage is a decrease in proteoglycan content [1]. Proteoglycans form a large group that can be classified into five families according to the structural properties of their core protein [2]. One group, termed the small leucine-rich proteoglycans (SLRPs), possesses a central domain of characteristic repeats that participate in protein-protein interactions [3]. The SLRPs can be divided into four classes based on gene organization and amino acid sequence homol-

ogies [1]: class I includes decorin, biglycan and asporin; class II includes fibromodulin, lumican, keratocan, PRELP (proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein) and osteoadherin; class III includes epiphygan, mimecan and opticin; and class IV includes chondroadherin and the recently identified nyctalopin [4].

Although an understanding of the functions of SLRPs is only now emerging, most of the members bind specifically to other extracellular matrix constituents and contribute to the structural framework of connective tissues [3]. Moreover, some were shown to interact with various collagen types, including

APMA = aminophenylmercuric acetate; MMP = matrix metalloprotease; OA = osteoarthritis; PRELP = proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein; rh = human recombinant; SLRP = small leucine-rich proteoglycan; TGF = transforming growth factor.

collagen type II, and to influence collagen fibril formation and interaction. These include decorin [5], fibromodulin [6], asporin [7], lumican [8], PRELP [9] and chondroadherin [10]. Moreover, fibromodulin, asporin, biglycan, decorin and lumican were also suggested to play a role in the OA cartilage process [11-13].

Decorin was the first in this series of molecules to be structurally defined. It contains one glycosaminoglycan chain, often dermatan sulfate, which can adopt complex secondary structures and form specific interactions with matrix molecules [3]. The decorin level in cartilage is by far the most abundant of the SLRPs, and in humans its level increases with increasing age [14]. Its proposed major functions are the regulation of collagen fibrillogenesis and maintenance of tissue integrity by its binding with fibronectin and thrombospondin [15-17]. The closely related family member biglycan, despite its 57% of homology with decorin [18], does not interact with collagen under all conditions. Biglycan interactions appear to be primarily with type VI collagen. Biglycan has been identified at the surface of cartilage and in the pericellular region. In OA cartilage, a higher concentration was reported in the deeper layers of the tissue [19].

Fibromodulin contains up to four keratan sulphate chains [5] and was originally described as a collagen-binding protein. It is able to influence collagen fibril formation and maintain a sustained interaction with the formed fibrils [20]. Lumican, which is present at a high level in the cornea [21], has a widespread distribution in connective tissues [5,22,23], including cartilage [24]. Lumican and fibromodulin have been shown to bind to the same site on the collagen fibril [20,25]. Lumican modulates collagen fibrillogenesis and enhances collagen fibril stability [26].

Synthesis of collagen in normal and pathological cartilage is slow. However, in OA the integrity of the collagen network is impaired. This could result from defective linking of the collagen fibrils by molecules such as the SLRPs, thus interfering with the network stability, preventing its repair and accelerating its degradation. Cleavage of the SLRPs may then precede major destruction of the collagen and contribute to this process [20]. Data in the literature show that members of the matrix metalloprotease (MMP) family are able to cleave some SLRPs. MT1-MMP can cleave human recombinant lumican [27]; MMP-2, MMP-3 and MMP-7 cleave human recombinant decorin [15]; and MMP-13 cleaves bovine fibromodulin when this molecule is bound to collagen [20]. Purified bovine fibromodulin cannot be cleaved by human MMP-13 [20]. It was also recently shown that truncated disintegrin-like and metalloprotease domain with thrombospondin type I motifs-4 (ADAMTS-4) can cleave the MMP-13 susceptible bond of fibromodulin [28]. However, MMP-2, MMP-8 and MMP-9 do not cleave fibromodulin [20].

Although various MMPs are present in human OA cartilage, MMP-13 was demonstrated to play a major role. This enzyme, in addition to cleaving native collagen and having a higher activity on type II collagen than MMP-1, also acts to degrade various extracellular macromolecules including proteoglycans [29]. However, limited studies have been done on its effect on the SLRPs. We therefore investigated the ability of human recombinant MMP-13 to cleave members of two classes of the SLRPs (class I decorin and biglycan, and class II fibromodulin and lumican), derived from normal and OA human cartilage differing in the severity of the disease process. The results show that MMP-13 can degrade all four SLRPs, with fibromodulin and biglycan being preferential substrates.

Materials and methods

Specimen selection

Normal human cartilage (femoral condyles and tibial plateaus) was obtained from individuals within 12 hours of death at time of autopsy ($n = 3$; mean age [\pm standard deviation] 52 ± 14 years). These individuals had no history of joint disease and died from causes unrelated to arthritic diseases, including cardiorespiratory arrest, cerebral haemorrhage and pulmonary embolism. The tissue was examined macroscopically and histologically to ensure that only normal tissue was used.

OA human cartilage (femoral condyles and tibial plateaus) was obtained from patients undergoing total knee arthroplasty ($n = 9$; mean age [\pm standard deviation] 76 ± 5 years). All patients were evaluated by a certified rheumatologist who used the American College of Rheumatology criteria for OA of the knee [30]. These specimens represented early, moderate, or severe OA, as defined by microscopic criteria [31-33]. The Clinical Research Ethics Committee of the University of Montreal Hospital Center approved the study protocol and the use of human tissues.

Proteoglycan extraction

Proteoglycans were extracted with 4 mol/l guanidinium chloride [34,35]. Briefly, cartilage was finely diced to pieces and extracted with 4 mol/l guanidinium chloride (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA) in 0.1 mol/l sodium acetate (pH 6.0) containing protease inhibitors (leupeptin [10 μ g/ml], pepstatin [10 μ g/ml], aprotinin [10 μ g/ml], 1,10-phenanthroline [10 μ g/ml] and phenylmethanesulphonyl fluoride [100 μ g/ml]; EMD Biosciences Inc., La Jolla, CA, USA) at 4°C with continuous stirring for 48 hours. The extract was then separated from the cartilage residue by filtration through glass wool, and then dialyzed for 48 hours against 50 mmol/l Tris buffer (pH 7.5). One might argue that because the inhibitors were removed during the dialysis the endogenous MMPs could have been activated. However, because 1,10-phenanthroline is a zinc chelator, the catalytic zinc would also be removed by the dialysis, and so the MMPs would remain inactive.

Analysis of SLRP cleavage by MMP-13

MMP-13 proteolytic activity was analyzed on human normal ($n = 3$) and OA cartilage having different levels of fibrillation corresponding to the different stage of the disease process. These were named slightly ($n = 3$), moderately ($n = 3$) and severely ($n = 3$) fibrillated cartilage. Proteoglycan extracts were incubated for 0–16 hours with human recombinant (rh)MMP-13 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) activated with 0.5 mmol/l aminophenylmercuric acetate (APMA; Kodak Inc., Toronto, ON, Canada) in 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5) containing 10 mmol/l CaCl_2 and 0.05% Brij 35 (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) at an MMP-13/proteoglycan ratio of 1:50 (100 ng/5 μg). Glycosaminoglycan content was determined using the 1,2-dimethylmethylene blue (DMMB) method [36]. The reaction was stopped by the addition of EDTA (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) at a final concentration of 15 mmol/l. The samples were treated with 25 mU chondroitinase ABC (#C-2905; Sigma-Aldrich Canada Ltd.)/100 μl proteoglycan extract overnight at 37°C. In addition, a control was performed with the moderately fibrillated cartilage in which no MMP-13 was added and samples were incubated for 16 hours. Data were identical to those with the nonincubated specimens (data not shown).

In order to investigate MMP-13 specificity, RS 110–2481 (a synthetic specific MMP-13 carboxylate inhibitor generously provided by C Myers [Roche Bioscience, Palo Alto, CA, USA]) [37], was used. The K_i (nmol/l) for MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8 and MMP-13 were 1:100, 32, 19, 18 and 0.08, respectively. Briefly, samples from moderately fibrillated cartilage extract were treated with rhMMP-13 and RS 110–2481 at 1 and 50 nmol/l for the indicated time, and samples processed for Western blotting.

Western blotting

Proteoglycan solutions were mixed with a sample buffer (62.5 mmol/l Tris-HCl [pH 6.8], 2% w/v sodium dodecyl sulphate, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, and 0.05% bromophenol blue) and electrophoresed on 4–20% Ready-Gels (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada). They were then transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories Ltd.) and processed for Western immunoblotting. Blots were blocked in 2% low fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich Canada Ltd.). As described previously [11], rabbit polyclonal antibodies raised against synthetic peptides corresponding to the carboxyl-terminus of the SLRP core proteins were used as primary antibodies for the detection of biglycan (1/5,000 dilution), fibromodulin (1/10,000 dilution), lumican (1/5,000 dilution) and decorin (1/5,000 dilution). The second antibody was a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (1/10,000 dilution; Pierce, Rockford, IL, USA). Detection was performed by chemiluminescence using the Super Signal® ULTRA chemiluminescent substrate (Pierce), in accordance with the manufacturer's specifications.

Sequencing of biglycan and decorin degradation products

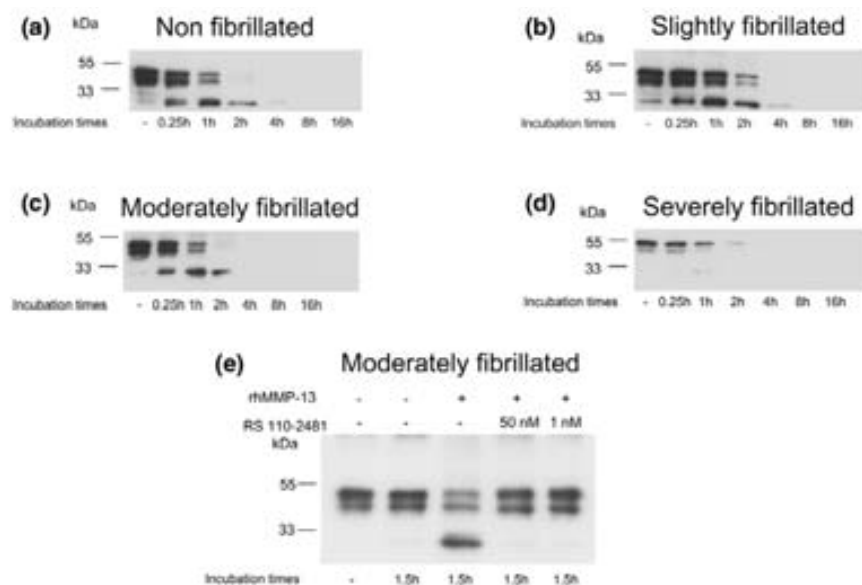
Bovine recombinant biglycan (15 μg) and decorin (15 μg ; Sigma-Aldrich Canada Ltd.) were incubated for 1 hour at 37°C with APMA-activated rhMMP-13 in 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), containing 10 nmol/l CaCl_2 and 0.05% Brij 35. The reaction was stopped by the addition of EDTA at a final concentration of 15 mmol/l. Glycosaminoglycan chains were removed by incubation with 0.1 unit chondroitinase ABC (#C-3667; Sigma-Aldrich Canada Ltd.) for 8 hours at room temperature, followed by boiling for 5 minutes with the electrophoresis sample buffer. To remove Asn-linked oligosaccharides, N-glycanase (0.3 unit; Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) and sample buffer containing 1.2% Nonidet P-40 (Roche Diagnostics) were added to the solution, which was then incubated again for 12 hours at room temperature. Degradation products were separated in 4–20% polyacrylamide gels (Bio-Rad Laboratories Ltd.). After electrophoresis, the gels were soaked in CAPS transfer buffer (10 nmol/l 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid, 10% methanol; pH 11.0) for 15 minutes at 0.25 A. After washing, the proteins were transferred onto PVDF membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), which were washed in de-ionized water, stained with 0.1% Coomassie Blue in 50% methanol for 5 minutes, and then de-stained in 50% methanol and 10% acetic acid for 5–7 minutes at room temperature. Finally, the membrane was rinsed in de-ionized water, air dried and stored at room temperature. Amino-terminal amino acid sequencing of the protein band was performed on a Procise Protein Sequencer model 492 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Results

The use of human cartilage extracts to analyze SLRP degradation allowed study of all four SLRPs in a single extract under identical conditions, and permitted SLRP degradation to be carried out in a physiologically relevant extract of matrix proteins.

MMP-13 degrades biglycan and decorin

Biglycan in human normal and OA cartilage migrated as a doublet at 48 and 45 kDa, representing intact and amino-terminally processed biglycan. MMP-13 degradation of biglycan was detected at 0.25 hours of incubation, and was almost complete at 2 hours (Figure 1). A fragment of about 28 kDa was generated. The biglycan profile from normal (nonfibrillated) to moderately fibrillated (Figure 1a–c) cartilage was similar whether the specimens were incubated in the presence or absence of MMP-13. Of note, in the specimens from nonfibrillated to moderately fibrillated cartilage not treated with MMP-13, a biglycan degradation product of a similar size to that generated by MMP-13 was already present, although in low amounts. Under MMP-13 treatment, there was an increase of the degradation product until complete digestion of the substrate. Interestingly, but not unexpectedly, in the severely fibrillated cartilage the biglycan was in low abundance (Figure 1d),

Figure 1

Representative Western blot of time course of MMP-13-induced degradation of biglycan. Human articular cartilage extracts were incubated with APMA-activated MMP-13 for the indicated times (0–16 hours). Panels are for extracts from (a) normal (nonfibrillated) cartilage and from (b) slightly, (c) moderately and (d) severely fibrillated OA cartilage. The bottom panel (e) relates to the extract from moderately fibrillated OA cartilage incubated for 1.5 hours with APMA-activated MMP-13 in the absence or presence of 50 or 1 nmol/l RS 110–2481 (a preferential MMP-13 inhibitor). APMA, aminophenylmercuric acetate; MMP, matrix metalloproteinase; OA, osteoarthritis; rh, human recombinant.

which was possibly due to prior degradation and loss from the tissue. However, MMP-13 further cleaved the residual substrate.

To determine whether MMP-13 was the sole enzyme responsible for the cleavage, and not other enzymes present in the cartilage extracts, we further treated the samples from the moderately fibrillated cartilage with two concentrations (1 and 50 nmol/l) of a preferential inhibitor of MMP-13, namely RS 110–2481 [37]. Biglycan degradation was completely prevented at both concentrations tested (Figure 1e).

Decorin from normal and OA cartilage migrated as a single band of about 45 kDa. MMP-13 degradation of decorin was not detected until 4–8 hours of incubation, and proteolysis was complete by 16 hours (Figure 2). Two decorin fragments of about 30 and 28 kDa were detected. There was no major difference in the degradation pattern with the normal to moderately fibrillated cartilage (Figure 2a–c). In the severely fibrillated cartilage, no decorin fragment could be seen (Figure 2d). The ability of MMP-13 to degrade decorin was prevented in the presence of RS 110–2481 when the moderately fibrillated cartilage was incubated for 16 hours, but only at the higher concentration tested (50 nmol/l; Figure 2e). Of note, as decorin fragmentation was seen at early incubation time, this experiment was also performed at 1.5 hours and the data were identical (for instance, degradation was completely prevented at 50 nmol/l; data not shown).

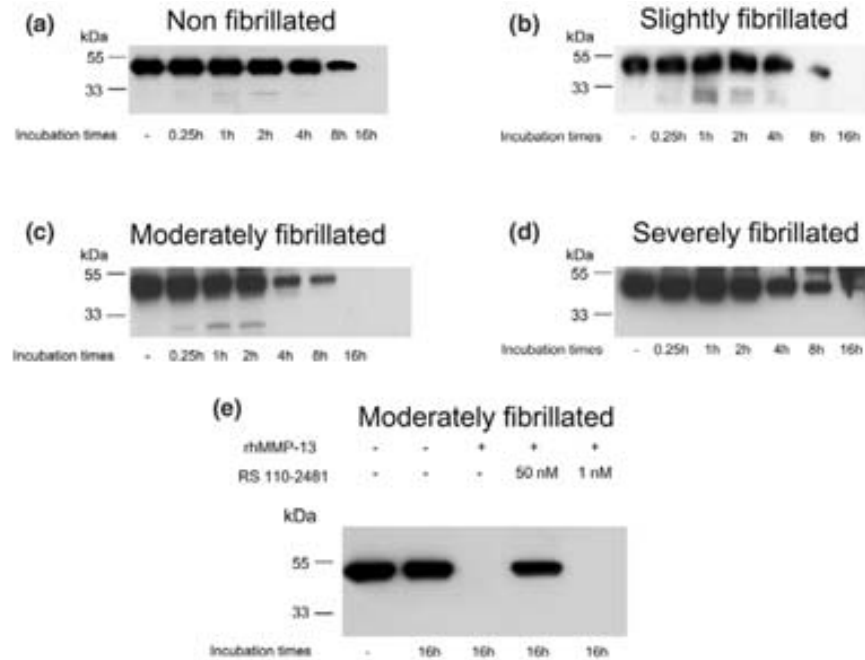
MMP-13 cleavage sites of biglycan and decorin

Amino acid sequencing analysis was performed with recombinant biglycan and decorin treated with MMP-13. In contrast to the Western blotting, which identifies carboxyl-terminal fragments, sequence analysis can identify the amino-terminus of all fragments.

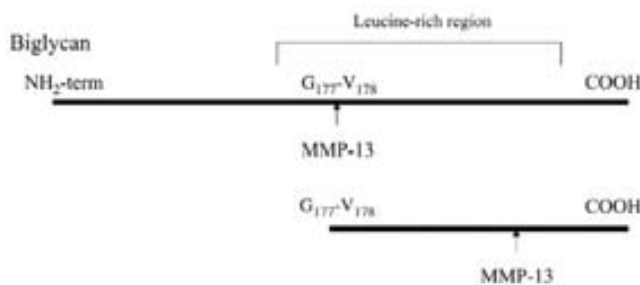
Sequence analysis of the biglycan fragments generated by MMP-13 treatment revealed a novel major fragment of 28 kDa. This fragment is generated by cleavage between positions 177 and 178 of the mature biglycan core protein, thus between glycine (G) and valine (V; Figure 3). A second biglycan fragment of 22 kDa was also identified by blotting and therefore possessed the carboxyl-terminal sequence. Presumably, this fragment is derived by cleavage within the 28 kDa fragment (Figure 3).

Sequence analysis of the two decorin cleavage fragments of 28 and 26 kDa showed that they possessed the same amino-terminus. The larger fragment is compatible with cleavage between positions 240 and 241 of the peptidic chain corresponding to a previously reported [15] cleavage site between the serine (S) and leucine (L). The exact cleavage site of the smaller fragment could not be identified.

The SLRP fragment sizes visualized on the gel used for sequencing were smaller than those observed on the gel used for Western blotting, possibly due to the treatment with N-gly-

Figure 2

Representative Western blot of time course of MMP-13-induced degradation of decorin. Human articular cartilage extracts were incubated with APMA-activated MMP-13 for the indicated times (0–16 hours). Panels are for extracts from (a) normal (nonfibrillated) cartilage and from (b) slightly, (c) moderately and (d) severely fibrillated OA cartilage. The bottom panel (e) relates to the extract from moderately fibrillated OA cartilage incubated for 16 hours with APMA-activated MMP-13 in the absence or presence of 50 or 1 nmol/l RS 110–2481 (a preferential MMP-13 inhibitor). APMA, aminophenylmercuric acetate; MMP, matrix metalloprotease; OA, osteoarthritis; rh, human recombinant.

Figure 3

Biglycan cleavage sites generated by APMA-activated MMP-13. The arrow indicates the MMP-13 cleavage site, and the broken arrow the potential secondary MMP-13 cleavage site. APMA, aminophenylmercuric acetate; MMP, matrix metalloprotease; G, glycine; V, valine.

canase in the former procedure. Of note, molecular weight determination by Western blotting is an approximation.

Degradation of fibromodulin and lumican

Fibromodulin from normal and OA cartilage migrated as a single component of about 60 kDa. MMP-13 induces fibromodulin degradation in a time-dependent manner, being detectable after 1–2 hours of incubation and complete by 16 hours (Fig-

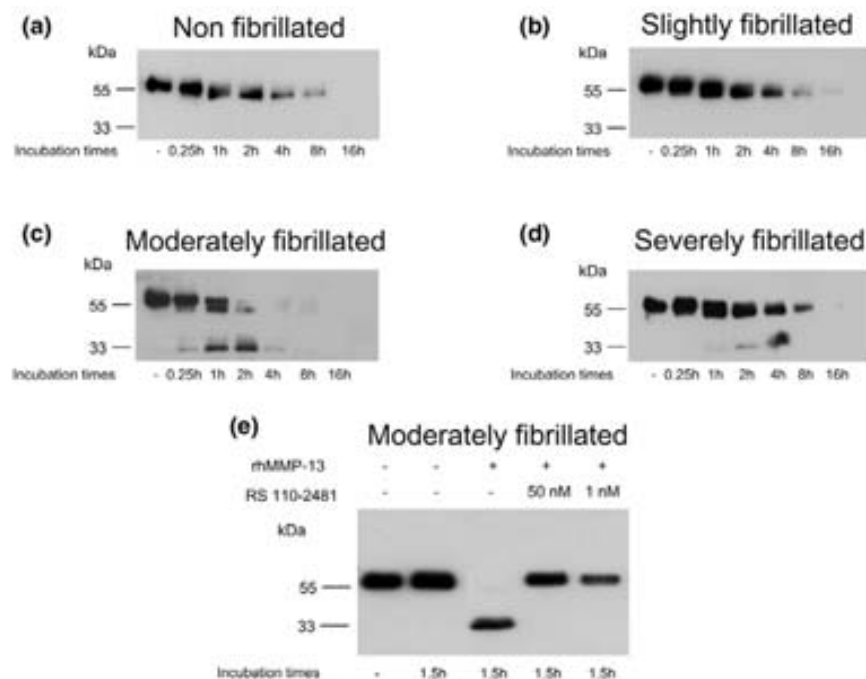
ure 4). In the moderately and severely fibrillated cartilage, a degradation product of about 33 kDa was generated early under MMP-13 treatment (Figure 4c,d). The fragment initially increased in abundance with incubation time, and thereafter declined as the fibromodulin was further degraded. The specific MMP-13 inhibitor prevented fibromodulin degradation (Figure 4e).

Lumican also migrated as a single component of 60 kDa. MMP-13-induced degradation was detected only after 8–16 hours of incubation (Figure 5). As for the other SLRPs, the specificity of MMP-13 was verified on extracts from moderately fibrillated OA cartilage, where lumican degradation was prevented by treatment with the MMP-13 specific inhibitor with a greater effect at 50 nmol/l (Figure 5e).

Discussion

A major and early feature of cartilage degeneration is proteoglycan breakdown. MMP-13 has been shown to play an important role in OA cartilage degeneration by its effect not only on the collagen network but also on proteoglycans [2]. In the present study we investigated the ability of human MMP-13 to act on members of the SLRP proteoglycan family derived from human cartilage ranging from normal to advanced OA.

Figure 4



Time course of MMP-13 induced degradation of fibromodulin. Human articular cartilage extracts were incubated with APMA-activated MMP-13 for the indicated times (0–16 hours). Panels are for extracts from (a) normal (nonfibrillated) cartilage and from (b) slightly, (c) moderately and (d) severely fibrillated OA cartilage. The bottom panel (e) relates to the extract from moderately fibrillated OA cartilage incubated for 1.5 hours with APMA-activated MMP-13 in the absence or presence of 50 or 1 nmol/l RS 110–2481 (a preferential MMP-13 inhibitor). APMA, aminophenylmercuric acetate; MMP, matrix metalloprotease; OA, osteoarthritis; rh, human recombinant.

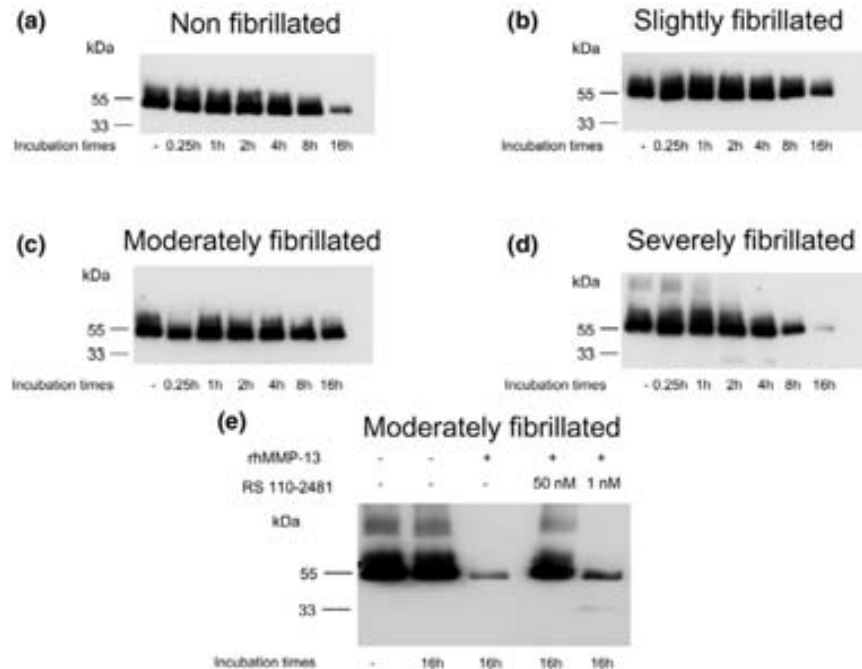
One emerging observation is that biglycan and fibromodulin are preferential substrates for MMP-13, whereas degradation of decorin and lumican is much less effective. This could imply that biglycan and fibromodulin are sensitive to both the gelatinolytic and collagenolytic activities of MMP-13, whereas decorin and lumican are more responsive to the gelatinolytic cleavage. Support for this hypothesis was provided by Imai and colleagues [15], who showed that decorin could be cleaved by MMP-2, MMP-3 and MMP-7, whereas cleavage with MMP-1 was negligible. The greater effect of MMP-13 than of MMP-1 on decorin could be due to the fact that the former enzyme has 44 times more gelatinolytic activity than does MMP-1 [38]. Moreover, and in agreement with this hypothesis, only 1 nmol/l of the inhibitor RS 110–2481 is sufficient to prevent collagenolytic activity, but 50 nmol/l is required to prevent gelatinolytic activity [37], and the effect of MMP-13 on biglycan and fibromodulin is abolished at both inhibitor concentrations whereas the effect on decorin and lumican is abolished only at the higher concentration.

Biglycan is found in the pericellular matrix of many connective tissues, and appears to play a role in regulating morphogenesis and differentiation [39]. Although biglycan is present in cartilage and is upregulated in the late stages of OA [13], its exact role in OA remains to be determined. The present data show that in some specimens a biglycan fragment of a similar size to

that generated by MMP-13 is present in the cartilage as a minor component. It is possible that this *in situ* degradation product might not be cleaved at exactly the same site. This requires further study with an antibody recognizing the amino-terminal sequence of the fragment; however, such an antibody is not yet available. It is also possible that the biglycan degradation product may not be stably retained within the cartilage matrix and hence may not accumulate in large amounts. The study showed that the degree of biglycan degradation was independent of the extent of cartilage damage, although the amount of biglycan present in the severely fibrillated cartilage was significantly less than in normal to moderately fibrillated specimens. This suggests that, in the severely fibrillated specimens, biglycan has already been extensively degraded, leading to the loss of the epitope recognized by the antibody. Although we cannot exclude the possibility that proteases other than MMP-13 exerted an effect on this SLRP, this is unlikely because all endogenous carboxy, serine and MMPs should have been irreversibly inhibited by the inhibitor cocktail used in the extraction procedure. Although some cysteine proteases may survive the extraction procedure, it is unlikely that they remain active at pH 7.5, which was used for the incubation.

Our data also showed that MMP-13 induces two main biglycan fragments. The larger fragment possessed a new

Figure 5



Time course of MMP-13 induced -degradation of lumican. Human articular cartilage extracts were incubated with APMA-activated MMP-13 for the indicated times (0–16 hours). Panels are for extracts from (a) normal (nonfibrillated) cartilage and from (b) slightly, (c) moderately and (d) severely fibrillated OA cartilage. The bottom panel (e) relates to the extract from moderately fibrillated OA cartilage incubated for 16 hours with APMA-activated MMP-13 in the absence or presence of 50 or 1 nmol/l RS 110–2481 (a preferential MMP-13 inhibitor). APMA, aminophenylmercuric acetate; MMP, matrix metalloprotease; OA, osteoarthritis; rh, human recombinant.

cleavage site (... G₁₇₇-V₁₇₈) in the leucine-rich region. The second smaller fragment possessed the same carboxyl-terminal sequence, indicating the presence of a second cleavage site. As the antibody used for immunodetection recognizes the carboxyl-terminal region of biglycan, cleavage at this second site must be after the G₁₇₇-V₁₇₈ cleavage site found in the larger fragment.

As mentioned above, Imai and colleagues [15] demonstrated the ability of three MMPs – namely MMP-2, MMP-3 and MMP-7 – to degrade decorin, and reported multiple cleavage sites. It seems likely that these MMPs cleaved within the leucine-rich region at different sites, because all fragments, albeit of different sizes, possessed the same amino-terminal sequence corresponding to that of the intact decorin core protein [15]. The present study revealed that MMP-13 degrades decorin into two fragments that also possess the same amino-terminal sequence as the intact decorin core protein. The products identified by amino acid sequencing from recombinant decorin were of 28 and 26 kDa. These may represent the amino-terminal fragments corresponding to the cartilage extract decorin fragments identified with a carboxyl-terminal antibody, because it appears that decorin cleavage occurs toward the centre of the molecule. One would expect the amino-terminal and carboxyl-terminal fragments to be of similar size. Because

the degradation of decorin by MMP-13 appears to be due to its gelatinase activity rather than its collagenase activity, it is likely that one of the MMP-13 cleavages could be at the S₂₄₀-L₂₄₁ site, which is the cleavage used by gelatinase A (MMP-2) [15], and the other fragment would then be due to a cleavage amino-terminal of this site. This S₂₄₀-L₂₄₁ cleavage site is very plausible for MMP-13, because it is between aliphatic and hydrophobic amino acids, which are preferred by MMPs [40].

Interestingly, one of the characteristics of decorin is its interaction with active transforming growth factor (TGF)- β , thereby providing a tissue reservoir of this factor [41]. Our data showing MMP-13 cleavage in the leucine-rich repeats suggests the possibility that TGF- β may be released from the decorin after digestion with this MMP. We recently reported that, in OA cartilage, the TGF- β level is upregulated and responsible for the *in situ* increase in MMP-13 in this disease tissue [42,43]. The effect of MMP-13 on decorin, although not a preferential substrate, could be threefold. It may permit collagen degradation by its loss from the surface of the collagen fibrils; since data suggest that the leucine-rich repeats play a critical role in the interaction of SLRPs with collagens [44], it may result in loss of tissue integrity through the functional failure of decorin and biglycan interactions; and it may promote tissue degradation via TGF- β release, leading to increased MMP-13 production.

Lumican was reported to be present in human cartilage [24], but no direct evidence of its involvement in human OA has yet been reported. However, Young and colleagues [11] recently showed that lumican is upregulated in an ovine meniscectomy model of OA. This upregulated expression in degenerative cartilage was associated with increased lumican core protein deficient in keratan sulphate chains [11]. The present study showed that lumican degradation by MMP-13 occurs after an incubation period of 16 hours. This appeared independent of the level of fibrillation of the cartilage from which it was extracted, indicating that lumican degradation is independent of interactions with the various components in the different cartilage extracts.

Fibromodulin cleavage by MMP-13 has previously been demonstrated [20]. In human fibromodulin, cleavage occurs at the Y₆₃-T₆₄ site in the amino-terminal region of the molecule. In the present study MMP-13 degradation of fibromodulin generated a fragment of 30 kDa, which presumably corresponds to the fragment described by Heathfield and colleagues [20]. Of note, this fragment is generated in moderately and severely fibrillated cartilage, but not in normal or slightly fibrillated cartilage, reflecting an increased sensitivity of fibromodulin to degradation when the cartilage is more degenerated. This could be related to the presence of other components in the cartilage extracts that interact with the fibromodulin. Varying abundance of such components between the differently affected cartilages could then influence MMP-13 cleavage. The work by Heathfield and colleagues [20] suggests that cleavage of fibromodulin is dependent on its ability to bind type II collagen. There are two possibilities that could explain this situation. First, the ability of isolated SLRPs to interact with one another could result in the cleavage site being hidden. The recent description of decorin adopting a dimeric conformation in both the solution and crystal state may relate to this hypothesis, if other SLRPs behave in a similar manner [45]. It is possible that this dimeric conformation is removed when the SLRP binds to collagen and the MMP-13 cleavage site is then exposed. A second hypothesis could be that isolated SLRPs can act as zinc-binding proteins [46]. If this is a property of only free SLRPs, then in the absence of collagen or other binding partner the molecules could remove the zinc site necessary for MMP-13 function.

Although MMP-13 was shown to degrade type II collagen fibrils efficiently [47], it is possible that *in vivo* SLRP interaction may help to protect the fibrils by impeding access to the collagenase cleavage site. Data from this study are of importance in human OA pathophysiology, because MMP-13-induced SLRP degradation may represent an initial event in collagen fibril degradation, by exposing the collagen fibrils to proteolytic attack and permitting subsequent cartilage degeneration. *In vivo* identification of the SLRP degradation products, especially those of biglycan and fibromodulin, may assist in early detection of degeneration in OA cartilage.

Conclusion

In this study we demonstrated the ability of human recombinant MMP-13 to cleave members of two classes of SLRPs (decorin, biglycan, fibromodulin and lumican) derived from normal and OA human cartilage differing in severity of the disease process. Although minimal cleavage of decorin and lumican was observed, cleavage of fibromodulin and biglycan was extensive, suggesting that both molecules are preferential substrates. We demonstrated that fibromodulin has a higher level of degradation with increased cartilage damage. We also characterized a novel major cleavage site for biglycan. We hypothesized that MMP-13-induced SLRP degradation may represent an early critical event in the process of cartilage degradation. Awareness of the SLRP degradation products may assist in early detection of OA cartilage degradation.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JM, GT, PR, PR, JPP and JMP contributed to the study design. JM, FM JMP acquired the data. JM, GT, PR, PR, JPP and JMP analyzed and interpreted the data. JM, PR and JMP prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank Christelle Boileau, PhD, Alexander Watson, BSc, Changshan Geng, MD, MSc, David Hum, MSc, and François Jolicoeur, MSc, for their outstanding technical support; Pierre Pépin, MSc, from Sheldon Biotechnology for his assistance in protein sequencing; and C Myers from Roche Bioscience, Palo Alto, CA, USA for providing the MMP-13 inhibitor. The authors also thank Santa Fiori and Virginia Wallis for their assistance in manuscript preparation.

References

1. Heinegard D, Bayliss M, Lorenzo P: **Pathogenesis of structural changes in the osteoarthritic joint.** In *Osteoarthritis* Edited by: Brandt KD, Doherty M, Lohmander SL. New York: Oxford University Press Inc; 2003:73-92.
2. Kjellen L, Lindahl U: **Proteoglycans: structures and interactions.** *Annu Rev Biochem* 1991, **60**:443-475.
3. Poole AR: **Cartilage in Health and Disease.** In *Arthritis and Allied Conditions* Edited by: Koopman WJ, Moreland LW. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2005:223-269.
4. Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Sparkes RL, Koop B, Birch DG, Bergen AA, Prinsen CF, Polomeno RC, Gal A, *et al.*: **Mutations in NYX, encoding the leucine-rich proteoglycan nyc-talopin, cause X-linked complete congenital stationary night blindness.** *Nat Genet* 2000, **26**:319-323.
5. Knudson CB, Knudson W: **Cartilage proteoglycans.** *Semin Cell Dev Biol* 2001, **12**:69-78.
6. Hedlund H, Mengarelli-Widholm S, Heinegard D, Reinholt FP, Svensson O: **Fibromodulin distribution and association with collagen.** *Matrix Biol* 1994, **14**:227-232.
7. Lorenzo P, Aspberg A, Onnerfjord P, Bayliss MT, Neame PJ, Heinegard D: **Identification and characterization of asporin. A novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan.** *J Biol Chem* 2001, **276**:12201-12211.
8. Sztrolovics R, White RJ, Poole AR, Mort JS, Roughley PJ: **Resistance of small leucine-rich repeat proteoglycans to proteolytic degradation during interleukin-1-stimulated cartilage catabolism.** *Biochem J* 1999, **339**:571-577.

9. Bengtsson E, Morgelin M, Sasaki T, Timpl R, Heinegard D, Asperberg A: **The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor.** *J Biol Chem* 2002, **277**:15061-15068.
10. Mansson B, Wenglen C, Morgelin M, Saxne T, Heinegard D: **Association of chondroadherin with collagen type II.** *J Biol Chem* 2001, **276**:32883-32888.
11. Young AA, Smith MM, Smith SM, Cake MA, Ghosh P, Read RA, Melrose J, Sonnabend DH, Roughley PJ, Little CB: **Regional assessment of articular cartilage gene expression and small proteoglycan metabolism in an animal model of osteoarthritis.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**:R852-R861.
12. Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A, Mabuchi A, Kotani A, Kawakami A, Yamamoto S, et al.: **An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis.** *Nat Genet* 2005, **37**:138-144.
13. Bock HC, Michaeli P, Bode C, Schultz W, Kresse H, Herken R, Miosge N: **The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2001, **9**:654-663.
14. Melching LI, Roughley PJ: **The synthesis of dermatan sulphate proteoglycans by fetal and adult human articular cartilage.** *Biochem J* 1989, **261**:501-508.
15. Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y: **Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release.** *Biochem J* 1997, **322**:809-814.
16. Winnemoller M, Schon P, Vischer P, Kresse H: **Interactions between thrombospondin and the small proteoglycan decorin: interference with cell attachment.** *Eur J Cell Biol* 1992, **59**:47-55.
17. Winnemoller M, Schmidt G, Kresse H: **Influence of decorin on fibroblast adhesion to fibronectin.** *Eur J Cell Biol* 1991, **54**:10-17.
18. Iozzo RV: **Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function.** *Annu Rev Biochem* 1998, **67**:609-652.
19. Poole AR, Rosenberg LC, Reiner A, Ionescu M, Bogoch E, Roughley PJ: **Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage.** *J Orthop Res* 1996, **14**:681-689.
20. Heathfield TF, Onnerfjord P, Dahlberg L, Heinegard D: **Cleavage of fibromodulin in cartilage explants involves removal of the N-terminal tyrosine sulfate-rich region by proteolysis at a site that is sensitive to matrix metalloproteinase-13.** *J Biol Chem* 2004, **279**:6286-6295.
21. Chakravarti S, Stallings RL, SundarRaj N, Cornuet PK, Hassell JR: **Primary structure of human lumican (keratan sulfate proteoglycan) and localization of the gene (LUM) to chromosome 12q21.3-q22.** *Genomics* 1995, **27**:481-488.
22. Iozzo RV, Murdoch AD: **Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function.** *FASEB J* 1996, **10**:598-614.
23. Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ: **Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix.** *Matrix Biol* 1998, **17**:1-19.
24. Grover J, Chen XN, Korenberg JR, Roughley PJ: **The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage.** *J Biol Chem* 1995, **270**:21942-21949.
25. Svensson L, Narlid I, Oldberg A: **Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils.** *FEBS Lett* 2000, **470**:178-182.
26. Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H: **Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican.** *J Cell Biol* 1998, **141**:1277-1286.
27. Li Y, Aoki T, Mori Y, Ahmad M, Miyamori H, Takino T, Sato H: **Cleavage of lumican by membrane-type matrix metalloproteinase-1 abrogates this proteoglycan-mediated suppression of tumor cell colony formation in soft agar.** *Cancer Res* 2004, **64**:7058-7064.
28. Kashiwagi M, Enghild JJ, Gendron C, Hughes C, Caterson B, Itoh Y, Nagase H: **Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing.** *J Biol Chem* 2004, **279**:10109-10119.
29. Fosang AJ, Last K, Knauper V, Murphy G, Neame PJ: **Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13).** *FEBS Lett* 1996, **380**:17-20.
30. Altman RD, Asch E, Bloch DA, Bole G, Borenstein D, Brandt KD, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et al.: **Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee.** *Arthritis Rheum* 1986, **29**:1039-1049.
31. Mankin HJ, Dorfman H, Lippicello L, Zarins A: **Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data.** *J Bone Joint Surg Am* 1971, **53**:523-537.
32. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Howell DS, Ghandur-Mnaymneh L, Enis JE, Woessner JF Jr: **Collagenase and collagenolytic activity in human osteoarthritic cartilage.** *Arthritis Rheum* 1983, **26**:63-68.
33. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Cloutier JM, Howell DS, Ghandur-Mnaymneh L, Woessner JF Jr: **Neutral proteases capable of proteoglycan digesting activity in osteoarthritic and normal human articular cartilage.** *Arthritis Rheum* 1984, **27**:305-312.
34. Roughley PJ, White RJ, Poole AR: **Identification of a hyaluronic acid-binding protein that interferes with the preparation of high-buoyant-density proteoglycan aggregates from adult human articular cartilage.** *Biochem J* 1985, **231**:129-138.
35. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Woessner JF Jr: **Proteoglycan-degrading acid metalloproteinase activity in human osteoarthritic cartilage, and the effect of intraarticular steroid injections.** *Arthritis Rheum* 1987, **30**:541-548.
36. Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ: **A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures.** *Connect Tissue Res* 1982, **9**:247-248.
37. Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, et al.: **Enhanced cleavage of Type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage.** *J Clin Invest* 1997, **99**:1534-1545.
38. Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G: **Biochemical characterization of human collagenase-3.** *J Biol Chem* 1996, **271**:1544-1550.
39. Scott JE: **Proteoglycan: collagen interactions in connective tissues. Ultrastructural, biochemical, functional and evolutionary aspects.** *Int J Biol Macromol* 1991, **13**:157-161.
40. Nagase H: **Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.** *Biol Chem* 1997, **378**:151-160.
41. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E: **Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin.** *Nature* 1990, **346**:281-284.
42. Tardif G, Pelletier JP, Dupuis M, Geng C, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: **Collagenase 3 production by human osteoarthritic chondrocytes in response to growth factors and cytokines is a function of the physiological state of the cells.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:1147-1158.
43. Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: **Collagenase-3 (matrix metalloproteinase 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage *in situ*: *In vitro* mimicking effect by transforming growth factor beta.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**:1653-1661.
44. Svensson L, Heinegard D, Oldberg A: **Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5.** *J Biol Chem* 1995, **270**:20712-20716.
45. Scott PG, McEwan PA, Dodd CM, Bergmann EM, Bishop PN, Bella J: **Crystal structure of the dimeric protein core of decorin, the archetypal small leucine-rich repeat proteoglycan.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:15633-15638.
46. Kojoh K, Fukuda E, Matsuzawa H, Wakagi T: **Zinc-coordination of aspartic acid-76 in Sulfolobus ferredoxin is not required for thermal stability of the molecule.** *J Inorg Biochem* 2002, **89**:69-73.
47. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: **The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synovocytes: A role in osteoarthritis.** *J Clin Invest* 1996, **97**:2011-2019.

3. Identificació i caracterització del SLRP opticina en teixits articulars humans

En aquesta secció es presenten els resultats d'un estudi en col·laboració amb diferents centres:

Grup de Recerca cel·lular en inflamació i cartílag de l'IMIM (Parc de Salut Mar de Barcelona), Espanya.

La Unitat de Recerca en Artrosi de l'Hospital Notre-Dame de Montreal, Quebec, Canadà.

El Departament de Cirurgia de la Universitat McGill i la Unitat de Recerca Genètica del Shriners' Hospital for Children de Montreal, Quebec, Canadà.

El Wellcome Trust Center for Cell-Matrix Research de l'Universitat de Manchester, Regne Unit.

Aquest estudi es va centrar en demostrar l'expressió del SLRP opticina en diferents teixits articulars humans normals i artròsics, i en el seu patró de digestió per part d'MMP-13.

Els resultats d'aquest estudi van donar lloc a la següent publicació:

Monfort, J., Tardif, G., Roughley, P., Reboul, P., Boileau, C., Bishop, P.N., Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., 2008. **Identification of opticin, a member of the small leucine-rich repeat proteoglycan family, in human articular tissues: a novel target for MMP-13 in osteoarthritis.** Osteoarthritis Cartilage 16, 749-755.

Identification of opticin, a member of the small leucine-rich repeat proteoglycan family, in human articular tissues: a novel target for MMP-13 in osteoarthritis

J. Monfort M.D., Associate Professor of Medicine†, G. Tardif Ph.D., Assistant Professor of Medicine‡, P. Roughley M.D., Professor§, P. Reboul Ph.D., Assistant Professor of Medicine‡, C. Boileau Ph.D., Assistant Professor of Pharmacology‡, P. N. Bishop Ph.D., F.R.C.Ophth., Professor of Ophthalmology and Matrix Biology||, J.-P. Pelletier M.D., Professor of Medicine‡ and J. Martel-Pelletier Ph.D., Professor of Medicine‡*

† Department of Rheumatology, Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital del Mar, Passeig del Mar, Barcelona 08003, Spain

‡ Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal Hospital Centre, Notre-Dame Hospital, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

§ Department of Surgery, McGill University, Genetics Unit, Shriners' Hospital for Children, Montreal, Quebec, Canada

|| Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences and Academic Unit of Ophthalmology, The Medical School, University of Manchester, Manchester, United Kingdom

Summary

Objective: One of the proteoglycan families is the small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) that are characterized by their association with collagen fibrils and/or some glycosaminoglycans. Opticin is a glycoprotein and class III member of the SLRP family, which was initially identified in the vitreous humour of the eye. In this study, we first investigated whether opticin is expressed and produced in normal and OA human articular tissues/cells. Further, we investigated the ability of the key metalloprotease involved in cartilage pathology, MMP-13, to cleave human cartilage opticin.

Methods: Opticin gene expression was investigated in normal and OA human chondrocytes, synovial fibroblasts, and subchondral bone osteoblasts by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Opticin protein production was determined in normal and OA synovial membrane and cartilage by immunohistochemistry. Opticin was isolated from human cartilage using guanidinium chloride extraction, and human MMP-13-induced opticin degradation analyzed by Western blotting. Finally, the opticin MMP-13 cleavage site was determined.

Results: Opticin was expressed in human chondrocytes, synovial fibroblasts and subchondral osteoblasts, and the protein identified in synovial membrane and cartilage. At the protein level, OA cartilage showed a slightly higher level of opticin positive stained chondrocytes than normal cartilage; this did not reach statistical significance. However, in contrast with OA, normal cartilage demonstrated a high level of matrix staining in the superficial zone of the tissue, suggesting that in the OA cartilage matrix, opticin is degraded. Data also showed that cartilage opticin could be cleaved by MMP-13 after only 2 h of incubation, indicating a preferential substrate compared to other SLRPs for this enzyme. Microsequencing revealed a major cleavage site at the G₁₀₄/L₁₀₅LAAP and a minor at P₁₀₉/A₁₁₀NHPG upon MMP-13 exposure.

Conclusion: We demonstrated, for the first time, that opticin is expressed and produced in human articular tissues. Our data also showed that opticin in OA cartilage is degraded in a process that could be mediated by MMP-13. As opticin may contribute towards the structural stability of cartilage, its cleavage by MMP-13 may predispose cartilage to degeneration, particularly at the surface.

© 2007 Osteoarthritis Research Society International. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: Opticin, SLRP, Osteoarthritis, MMP-13.

Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most prevalent form of rheumatologic disease, affecting more than 20 million people in the United States¹. Worldwide estimates are that about 10%

of men and 18% of women and about 60–65% aged over 60 years have symptomatic osteoarthritis, and 80% of those have limitations in movement. OA is characterized mainly by the degradation of articular cartilage with an imbalance between anabolic and catabolic pathways in which an increase in the proteolysis of aggrecan (proteoglycan) and collagen is prominent².

Proteoglycans form a large group that includes the small leucine-rich proteoglycans (SLRPs). The SLRP family, which is now thought to consist of 12 members³, is characterized by a protein core containing tandem leucine-rich repeats (LRRs) flanked by conserved cysteine residues⁴.

*Address correspondence and reprint requests to: Prof Johanne Martel-Pelletier, Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal Hospital Centre, Notre-Dame Hospital, 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec, Canada H2L 4M1. Tel: 1-514-890-8000/26658; Fax: 1-514-412-7582; E-mail: jm@martel-pelletier.ca

Received 18 May 2007; revision accepted 17 November 2007.

SLRPs also possess a variable amino-terminal extension to the LRR-containing region. Eleven of the 12 members of this family are divided into three classes based on their genomic organization, the number of LRR, and the consensus sequence of a cysteine cluster at the N-terminal end of the LRR domain^{3–5}: class I includes decorin, biglycan and asporin; class II includes fibromodulin, lumican, keratocan, PRELP and osteoadherin; and class III includes epiphygan, mimecan and opticin. Their importance in extracellular matrix organization⁵ was highlighted by the phenotype of some SLRP knock-out mice including decorin-null⁶, lumican-null⁷ and fibromodulin-null⁸, which showed abnormal collagen fibrils with uneven diameter and irregular structure, suggesting that their presence is essential for normal fibril (and hence tissue) morphology.

Opticin (also known as ocuglycan; MIM*605127), a member of the third SLRP class, is an extracellular matrix glycoprotein that was first identified by Reardon *et al.*⁹ and found associated with the collagen fibrils of the vitreous humour of the eye. Opticin mRNA has been detected in the non-pigmented ciliary epithelium of the eye^{10–12} and a variety of non-ocular tissues including cartilage, brain, ligament, liver, testis, muscle and skin^{9,13,14}. Opticin is a dimeric glycoprotein with each monomer being composed of eight LRRs¹⁵. While SLRPs are generally proteoglycans, opticin is an exception in that instead of possessing glycosaminoglycan side chain(s), it is a glycoprotein with an amino-terminal region containing a cluster of serine and threonine residues that are heavily substituted with sialylated O-linked oligosaccharides^{9,15}.

Several SLRPs, including opticin, bind noncovalently to collagen fibrils and opticin may play a role in maintaining fibril spacing¹⁶. Recent studies have shown that opticin binds to glycosaminoglycans, including heparan sulfate and chondroitin sulfate¹⁷ which are essential in cartilage structure and maintenance¹⁸, and that other putative functions include the inhibition of angiogenesis and growth hormone binding^{19,20}.

Extracellular matrix turnover is an integral part of development, morphogenesis and tissue remodeling. While various types of proteases participate in matrix turnover, the matrix metalloproteases (MMPs) are the major matrix-degrading proteases in OA cartilage, and MMP-13 (collagenase-3) was found to be highly involved in this diseased tissue²¹. In addition to degrading type I–III collagens, MMP-13 has a telopeptidase activity and the ability to degrade a number of other components of the extracellular matrix including fibronectin, fibrillin, types IV, IX, X and XIV collagens, gelatin, galectin-3, and aggrecan [see review,²²]. Recently, MMP-13 has demonstrated its ability to cleave some of the SLRPs, including biglycan, decorin, fibromodulin and lumican^{23–26}.

In the present study, we first investigated the production of opticin in human articular tissues/cells and then evaluated the effect of MMP-13 on opticin in human OA cartilage. Data showed, for the first time, that opticin is expressed and produced by human chondrocytes, synovial fibroblasts and subchondral bone osteoblasts. Moreover, MMP-13 is able to cleave opticin, which may result in its functional failure, thereby resulting in loss of matrix structure and function.

Materials and methods

SPECIMEN SELECTION

Normal human knee cartilage and synovial membranes were obtained within 12 h of death from individuals (mean age \pm SD, 66 \pm 5 years) who had no history of joint disease or metabolic bone disease and died of causes unrelated to arthritic diseases. The tissues were examined macroscopically and microscopically to ensure that only normal tissue was used. Individuals showing cartilage deterioration were not included in the normal group.

Human OA specimens were obtained from patients undergoing total knee arthroplasty (mean age \pm SD, 71 \pm 9). All patients were evaluated as having OA according to recognized American College of Rheumatology Clinical Criteria²⁷. At the time of surgery the patients had symptomatic disease requiring medical treatment in the form of acetaminophen, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), or selective cyclooxygenase-2 inhibitors. None had received intra-articular steroid injections within 3 months prior to surgery, and none had received medication that would interfere with bone metabolism. The Institutional Research Ethics Committee of the University of Montreal Hospital Centre approved the use of the human articular tissues.

PROTEOGLYCAN EXTRACTION

Proteoglycans were extracted with guanidinium chloride, as previously described^{26,28}. Briefly, cartilage was finely diced and extracted with 4 mol/L guanidinium chloride (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA) in 0.1 mol/L sodium acetate (pH 6.0) containing protease inhibitors (leupeptin [10 μ g/mL], pepstatin [10 μ g/mL], aprotinin [10 μ g/mL], 1,10-phenanthroline [10 μ g/mL] and phenylmethanesulphonyl fluoride [100 μ g/mL]) (EMD Biosciences Inc., La Jolla, CA, USA) at 4°C with continuous stirring for 48 h. The extract was then separated from the cartilage residue by filtration through glass wool, and then dialysed for 48 h against 50 mmol/L Tris buffer (pH 7.5).

OPTICIN mRNA DETECTION

Chondrocytes and synovial fibroblasts were released from full-thickness strips of articular cartilage and synovial membrane, respectively, by sequential enzymatic digestion at 37°C, as previously described²⁹. The cells were seeded at high density (10⁵ cells/cm²) in tissue culture flasks and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-BRL, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Gibco-BRL) and an antibiotic mixture (100 units/mL penicillin base and 100 μ g/mL streptomycin base; Gibco-BRL) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air. Cells were maintained in culture for 5–7 days. Primary cell cultures were used. Subchondral bone osteoblast release was as previously described³⁰. In brief, the overlying cartilage was removed and the trabecular bone tissue dissected from the subchondral bone plate. All manipulations were performed under a magnifying microscope to ensure the complete removal of cartilage and trabecular bone. Bone samples were cut into small pieces prior to sequential digestion in the presence of collagenase type I in BGJb medium without serum at 37°C in a humidified atmosphere. After a 4-h incubation period the bone pieces were cultured in BGJb medium containing 20% FCS and the antibiotic mixture at 37°C. This medium was replaced every 2 days until cells were observed in the petri dishes. At this point, the culture medium was replaced with fresh medium containing 10% FCS until confluence. Osteoblasts passaged once were used.

Total cellular RNA from cells was extracted with the TRIzol™ reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications and treated with the DNA-free™ DNase Treatment and Removal kit (Ambion, Austin, TX, USA) to ensure the complete removal of chromosomal DNA. The RT reactions were primed with random hexamers as described previously³¹, with 2 μ g of total RNA in a 20 μ l final reaction volume. The polymerase chain reaction (PCR) was carried out for 40 cycles of 94°C for 1 min and an annealing/extension step at 60°C for 1 min and 30 s. Primers were derived from the published sequence of the opticin gene (access #NM014359). The primers 5'-TTGACCTCCACAAACCTC-3' (forward) and 5'-GGTACAGAAGACG TCTCTC-3' (reverse) amplified a single 327 bp fragment. The identity of the amplified fragment was tested by (1) restriction with Pst1, which specifically cleaves the fragment, and (2) by DNA sequencing.

OPTICIN CLEAVAGES BY MMP-13

MMP-13 proteolytic activity was analyzed on proteoglycan extracts from normal and OA human cartilage having different levels of fibrillation corresponding to different stages of the disease process. These were named slightly, moderately and severely fibrillated cartilage. These extracts were incubated for 0–16 h with human recombinant (rh)MMP-13 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) activated with 0.5 mmol/L aminophenylmercuric acetate (APMA; Kodak Inc., Toronto, ON, Canada) in 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) containing 10 mmol/L CaCl₂ and 0.05% Brij 35 (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) at an MMP-13/proteoglycan ratio of 1:50 (100 ng/5 μ g). Glycosaminoglycan content was determined by the DMMB method³². The reaction was stopped by the addition of EDTA (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) at a final concentration of 15 mM.

WESTERN BLOTTING

MMP-13 treated and non-treated proteoglycan extracts were mixed with a sample buffer (62.5 mmol/L Tris-HCl [pH 6.8], 2% w/v sodium dodecyl sulphate, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol and 0.05% bromophenol blue)

and electrophoresed on 4–20% Ready-Gels (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada). The proteoglycan extracts were then transferred electrophoretically onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories Ltd.) and processed for Western immunoblotting. Blots were blocked in 5% low fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (Sigma–Aldrich Canada Ltd.). The primary antibody was a polyclonal rabbit that recognizes the N-terminus of the human opticon core protein as described previously¹¹. For Western blotting a 1/10,000 dilution was used. The secondary antibody was a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (1/10,000 dilution; Pierce, Rockford, IL, USA). For comparison purposes, another antibody was also used: a polyclonal goat anti-human opticon (#AF3148; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) at a 1/2000 dilution. The secondary antibody was a mouse anti-goat immunoglobulin (1/10,000 dilution; Pierce). Detection was performed by chemiluminescence using the Super Signal[®] West Dura Extended Duration substrate (Pierce), in accordance with the manufacturer's specifications.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Cartilage and synovial membrane specimens were processed for immunohistochemistry as previously described³³. The specimens were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (5 μ m) of paraffin-embedded specimens were deparaffinized in toluene and rehydrated in a graded series of ethanol. The cartilage specimens were then pre-incubated with chondroitinase ABC (0.25 units/mL in PBS [pH 8.0]) for 60 min at 37°C, and both cartilage and synovial membrane with Triton X-100 (0.3%) for 30 min at room temperature. Slides were then washed in PBS followed by 0.3% hydrogen peroxide/methanol for 30 min. They were further incubated for 60 min with 2% normal serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and overlaid with the rabbit anti-human opticon antibody (1/1000 dilution) for 18 h at 4°C in a humidified chamber. The second antibody was a goat anti-rabbit immunoglobulin (Vector Laboratories).

Each slide was washed three times in PBS (pH 7.4) and stained using the avidin–biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories). The color was developed with 3,3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories) containing hydrogen peroxide. The slides were counter-stained with eosin. Controls were done to determine the specificity of staining: (1) substitution of the primary antibodies with non-specific rabbit IgG (Chemicon International, Temecula, CA, USA) used at the same concentration as the primary antibody; (2) immunoadsorbed with 25-fold excess of the recombinant opticon; and (3) omission of primary antibody. Controls showed only background staining.

The total number of chondrocytes and the total number of positively stained chondrocytes were counted as previously described³³. As no chondrocytes staining positive were found in the deep zone (lower intermediate and deep layers), the final results were expressed as the percentage of positive chondrocytes of the superficial zone (superficial and upper intermediate layers). Briefly, for each cartilage specimen, the total number of chondrocytes and the total number of positive chondrocytes were counted separately, at 40 \times magnification, from three fields of the superficial zone. Each slide was subjected to a double-blind evaluation with a variation of <5%.

PROTEIN SEQUENCING OF MMP-13 OPTICIN CLEAVAGE PRODUCT

Bovine recombinant opticon¹⁵ was incubated with APMA-activated rhMMP-13 in 50 mmol/L Tris–HCl (pH 7.5), containing 10 nmol/L CaCl₂ and 0.05% Brij 35, for 8 h at 37°C. The reaction was stopped by the addition of EDTA at a final concentration of 15 mM. Degradation products were separated in 4–20% polyacrylamide gels (Bio-Rad Laboratories Ltd.). After electrophoresis, the gels were soaked in CAPS transfer buffer (10 nmol/L 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid, 10% methanol [pH 11.0]) for 15 min at 0.25 A. After washing, the protein was transferred onto PVDF membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), which were washed in deionized water, stained with 0.1% Coomassie Blue in 50% methanol for 5 min, and then destained in 50% methanol and 10% acetic acid for 5–7 min at room temperature. Finally, the membrane was rinsed in deionized water, air dried and stored at room temperature. Amino-terminal amino acid sequencing of the protein band was performed on a Procise Protein Sequencer model 492 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Results

OPTICIN EXPRESSION BY HUMAN OA ARTICULAR CELLS

As represented in Fig. 1, opticon is expressed in human OA chondrocytes ($n=3$), synovial fibroblasts ($n=3$) and subchondral bone osteoblasts ($n=3$). In order to confirm the specificity of the band, they were treated with the

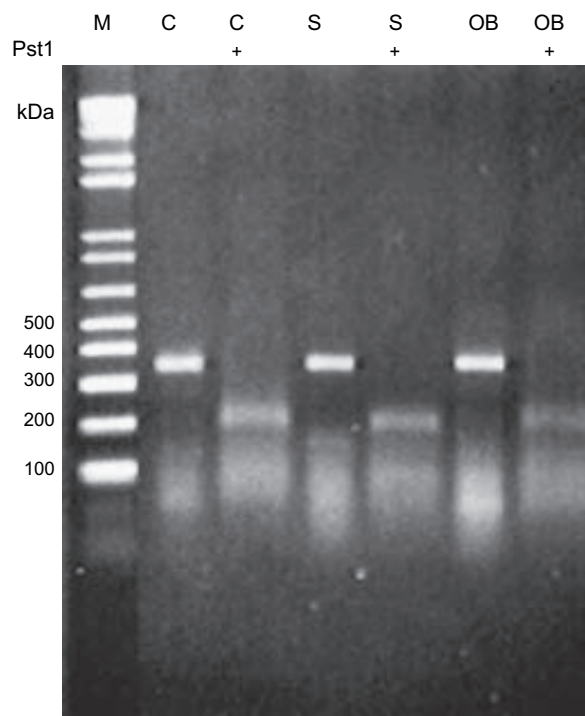


Fig. 1. Representative PCR blot of the expression of opticon in human OA articular chondrocytes (C), synovial fibroblasts (S) and osteoblasts from subchondral bone (OB). The restriction enzyme Pst1 was used to confirm the specificity of the PCR primer. kDa indicates the PCR markers' molecular weight, and M, marker.

enzyme Pst1, and data indicate that the enzyme specifically cleaves the fragment (Fig. 1). Further DNA sequencing confirmed that the amplified fragment of the reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) corresponded to human opticon.

Further data showed that opticon is produced in both normal ($n=2$) and OA ($n=4$) human synovial membranes and cartilages (normal, $n=6$; OA, $n=6$) [Fig. 2(A and B)]. In both normal and OA synovial membranes, opticon is produced in the synovial lining cells and in the endothelial cells of the vessel wall, as well as in cell infiltration in OA [Fig. 2(A)]. Of note, although opticon is found in the same cells when OA and normal tissues are compared, there are, in the OA synovial membrane, more layers of the lining cells as well as cell infiltration, thus more cells producing opticon.

In cartilage [Fig. 2(B)], chondrocytes producing opticon are found mostly in the superficial layers of the tissue for both cartilage types. Analysis of opticon positive chondrocytes at this level showed that although a higher level of positive chondrocytes was found in OA samples, this did not reach statistical significance [Fig. 2(C)]. Interestingly, matrix opticon specific staining was present in normal cartilage, but had almost disappeared in OA cartilage [Fig. 2(B)]. The disappearance of the matrix staining occurred in all OA specimens regardless of the severity of the disease (data not shown).

MMP-13-INDUCED OPTICIN DEGRADATION

Western blotting revealed that the cartilage extracted human opticon differed in the apparent molecular weight from the bovine recombinant opticon. As illustrated in

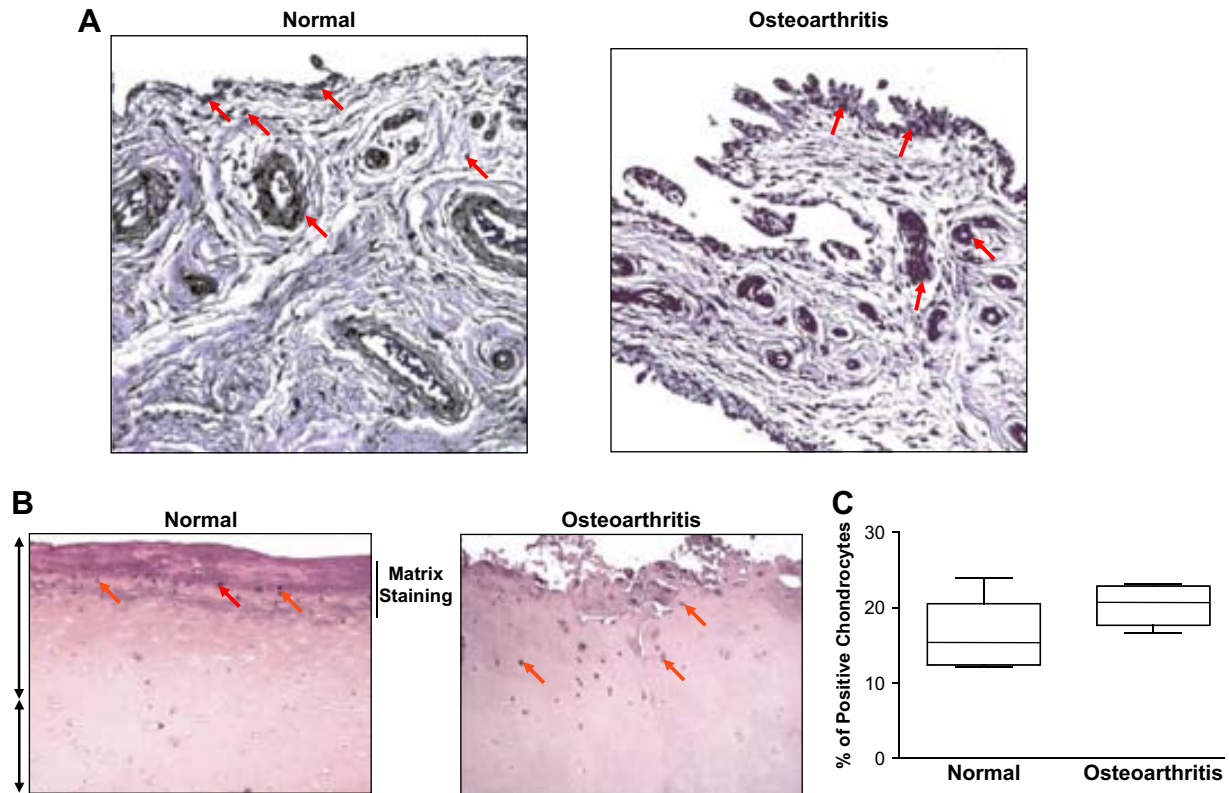


Fig. 2. Representative opticin immunohistochemical sections of normal and OA human (A) synovial membranes, and (B) cartilage (original magnification 250 \times). The red arrows indicate the opticin specific positive staining. In the synovial membrane (A), opticin is found in the cells from the lining layer and the endothelial cells, as well as in osteoarthritis in the cell infiltration. In cartilage (B), opticin is found in the superficial zone. Superficial (superficial and upper intermediate layers) and deep (lower intermediate and deep layers) zones of cartilage are indicated with black arrows. For both synovial membrane and cartilage no specific staining was detected with the controls including the immunoadsorbed with recombinant opticin (data not shown). Of note, in (B) there is extracellular matrix opticin specific staining in normal cartilage in the superficial zone, which had almost disappeared in OA cartilage. (C) Analysis of the chondrocyte opticin specific staining at the superficial zone. Data are expressed as median and range and are presented as box plots, where the boxes represent the first and third quartiles, the line within the box represents the median, and the lines outside the box represent the spread of values. Statistical analysis was done using Student's *t* test comparing normal and OA cartilages; no statistical difference was found.

[Fig. 3(A)], data showed that bovine opticin migrated at an apparent molecular weight of 40–45 kDa whereas the human opticin migrates as a doublet of 55–60 kDa. To verify that the immunoreactivity was not due to the rabbit anti-human antibody, another antibody, a goat anti-human, was used and results were similar [Fig. 3(A)]. In any case, none of the antibodies used recognized a 40–45 kDa fragment.

Specimens incubated with MMP-13 showed that opticin degradation was time-dependent and clearly visible after 2 h of incubation, and almost complete at 8 h [Fig. 3(B)]. No true differences in the opticin degradation were observed between the specimens from normal and OA cartilages according to the degree of cartilage fibrillation severity.

MMP-13 CLEAVAGE SITE OF OPTICIN

Amino-terminal amino acid sequencing was performed on the major opticin fragment of approximately 24 kDa produced by MMP-13 digestion (Fig. 4). Two sequences were identified which corresponded to a major cleavage between positions G₁₀₄ and L₁₀₅LAAP, and a minor one between positions P₁₀₉ and A₁₁₀NHPPG of the mature opticin core protein. Therefore the 24-kDa fragment was composed of the

LRR domains with flanking cysteines, but the amino-terminal domain containing the sialylated O-linked oligosaccharides has been removed by MMP-13 digestion.

Discussion

The present study showed for the first time that opticin is expressed in human knee tissues including articular cartilage, synovial membrane and subchondral bone and the protein has been identified in cartilage and synovial membrane. Interestingly, MMP-13 cleavage of opticin in cartilage occurred early and was extensive, suggesting that this molecule is a preferential substrate among the SLRPs for this enzyme. We also characterized the major cleavage site for opticin and this was located between amino acids G₁₀₄ and L₁₀₅. We hypothesize that MMP-13-induced opticin degradation may represent an early critical event in the process of cartilage degradation.

Opticin exists as a noncovalently linked dimer in solution but runs as a monomer on SDS-PAGE. Recombinant bovine opticin ran as a diffuse component at approximately 45 kDa. The opticin in the human cartilage extract migrated somewhat more slowly (approximately 55–60 kDa by SDS-PAGE). It is assumed that the differences in electrophoretic

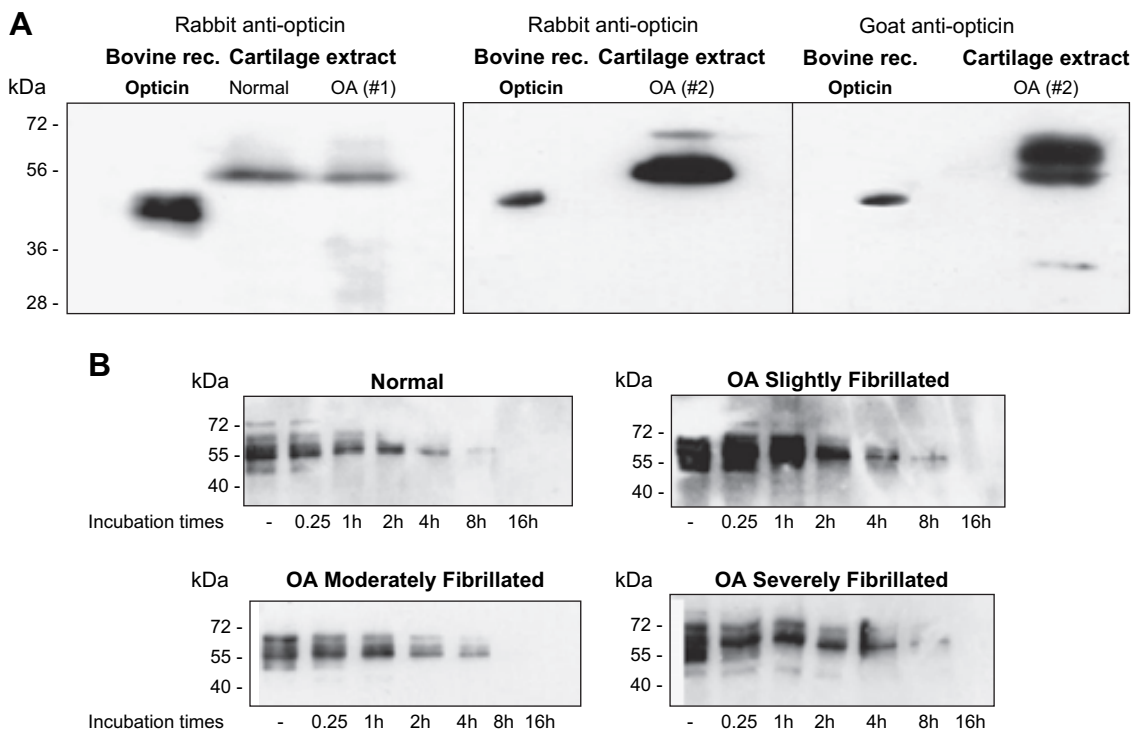


Fig. 3. Representative Western blots of (A) recombinant bovine opticin and human opticin extracts from cartilage, using two different antibodies, illustrating that the human opticin is at a higher apparent molecular weight than the recombinant form. (B) Time course of MMP-13-induced degradation of opticin. Human cartilage extracts were incubated with APMA-activated MMP-13 for the indicated time (0–16 h). Panels show Western blots of extracts probed with the rabbit anti-opticin from normal cartilage or from slightly, moderately and severely fibrillated OA cartilage.

migration are due to differences in the extent of O-glycosylation. Opticin is the only SRLP known to contain a large cluster of sialylated O-linked oligosaccharides, thereby providing an alternative form of anionic carbohydrate to the more usual glycosaminoglycan chains^{5,9}. The functional

significance of the sialylated O-linked oligosaccharides on opticin remains unknown.

OA is a multifactorial disorder involving cartilage, synovial membrane and subchondral bone³⁴, and in each of these tissues MMP-13 has been found in increased amounts

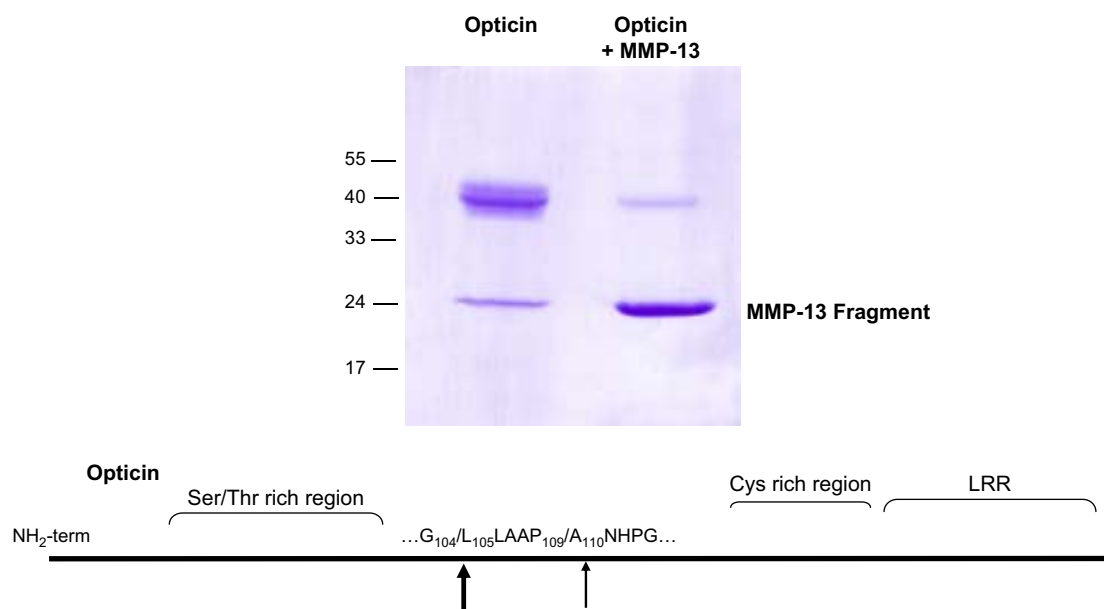


Fig. 4. Schematic representation of recombinant opticin cleavage site generated by APMA-activated MMP-13. The bottom panel indicates the MMP-13-cleavage site in the leucine-rich region.

and appears responsible, at least in part, for the tissue degradation. Although MMP-13 acts on various matrix macromolecules, this is the first time that its effect was investigated on a member of the class III SLRPs. Here, we assessed the degradative effect of MMP-13 on opticin on normal human cartilage and on three different stages of OA cartilage. Data showed that MMP-13 cleaves opticin, and that the degree of degradation was independent of the cartilage damage severity. MMP-13 has different catalytic activities including collagenolytic and gelatinolytic, in addition to showing strong aggrecanase properties^{35,36}. Therefore, depending on the substrate, it can degrade SLRPs with its collagenase or gelatinase activity, or with both, resulting in a faster degradation of the substrate²⁶. Our data suggest that opticin is sensitive to both of the MMP-13 catalytic activities, since, in comparison with the degradation speed for biglycan and fibromodulin²⁶, the degradation of the glycoprotein occurs early and is clearly visible after only 2 h of incubation.

The 24-kDa band obtained in the opticin digestion with MMP-13 included two fragments: a major one that has been cleaved between positions G₁₀₄ and L₁₀₅LAAP, and the minor one between positions P₁₀₉ and A₁₁₀NHPG. Efforts have been devoted to establish the consensus cleavage motif of each MMP. However, a specific pattern could not be ascertained as the MMP cleavage sites for the different substrates share little sequence homology and lack an obvious consensus cleavage motif. Here, the fact that MMP-13 cleaves opticin at two different but close sites without any homology may indicate that the recognition and cleavage sites are distinct. One possibility is that MMP-13 first binds to a region and then cleaves opticin some amino acids away from this recognition site. A second hypothesis is that, if collagenolytic and gelatinolytic MMP-13 activities are working together, each of them could recognize different cleavage sites on opticin. Another point of interest is that a fragment of a similar size is also noted in the control (untreated recombinant opticin), indicating the occurrence of such a cleavage in the cell from which the opticin was purified, hence this MMP-13 activity could have occurred *in vivo*. This could very well be the case, as the recombinant opticin was purified from human embryonic kidney cells¹³, and MMP-13 is active during embryonic development^{37,38}. It is then possible that the MMP-13 opticin fragment was also purified along with the mature opticin, although we cannot exclude the possibility that other proteases exerted this effect. However, the fact that it could be seen in an increased intensity of the band after the treatment with the protease suggests that MMP-13 is related to this digestion.

Of note, is that the 24-kDa fragment could not be detected with the antibodies used in this study. This could be explained by the fact that the antibodies recognized the N-terminus of the core protein, and that the fragment is at the C-terminus region of the opticin.

As MMP-13 has been suggested to be present in cartilage during its remodelling^{39,40}, hence at an early stage of the disease, it is tempting to hypothesize that opticin cleavage may represent an early critical event. Opticin may have a direct involvement in maintaining the spacing of collagen fibrils and therefore degradation of opticin could cause direct structural damage. Alternatively, the degradation of opticin may affect the collagen network by uncovering the collagenase cleavage site on this molecule or it could expose proteoglycans to cleavage since it has been shown to bind chondroitin sulphate and heparin sulphate¹⁷. The degradation of collagen and/or proteoglycans would lead to cartilage degeneration. This hypothesis is supported by

our data showing the ability of MMP-13 to cleave opticin in a similar manner in normal and OA cartilages. Moreover, the finding that opticin in normal cartilage, in contrast to OA, had a high level of matrix staining in the superficial zone indicates that *in situ* in OA cartilage, opticin in the matrix is degraded and that the degradation product may not be retained within the cartilage matrix, hence it does not accumulate. The degradation of opticin by MMP-13 *in situ* in OA cartilage is further supported by the fact that this enzyme is produced at a very low level in normal cartilage^{29,41,42}, and that in OA, this protease is detected in all cartilage layers^{39,40}. In addition, the lack of difference in chondrocytes producing opticin between normal and OA cartilage indicates that the production of this SLRP is not modulated in this tissue by the events occurring during the disease process, emphasizing the importance of the degradation of this molecule during the pathological progression. This could also apply to the synovial membrane, where there was no difference in the cell types producing opticin in normal and OA.

In this study, we examined the effect of MMP-13 on opticin, as this MMP is highly involved in OA pathogenesis. However, this does not rule out that this SLRP could be degraded by other proteases also involved in this disease process. In this context, it has recently been shown⁴³ that a member of the SLRP family, the biglycan, can be cleaved by the aggrecanases, but not decorin which belongs to the same SLRP class. More should be known about the consensus sequence recognition of each protease in order to predict which proteases could interact with each of the SLRP members.

In summary, opticin is present in human articular tissues and MMP-13 has the ability to cleave it. The fact that MMP-13 could cleave numerous cartilage matrix components, including type II collagen and members of the SLRPs, that bind to this collagen, could explain why this collagenase plays a major role in osteoarthritis.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We would like to thank François Mineau and François-Cyril Jolicoeur, as well as Nathalia Garcia-Giralt, and Laura Tio Barrera for their technical expertise and Pierre Pépin, M.Sc., from Sheldon Biotechnology for his assistance in protein sequencing. The authors also thank Virginia Wallis for her assistance in the manuscript preparation.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.joca.2007.11.007.

References

- Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, *et al.* Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 1998;41:778–99.
- Heinegard D, Bayliss M, Lorenzo P. Pathogenesis of structural changes in the osteoarthritic joint. In: Brandt KD, Doherty M, Lohmander SL,

- Eds. Osteoarthritis. 2nd edn. New York: Oxford University Press Inc. 2003:73–92.
- Huxley-Jones J, Robertson DL, Boot-Handford RP. On the origins of the extracellular matrix in vertebrates. *Matrix Biol* 2007;26:2–11.
 - McEwan PA, Scott PG, Bishop PN, Bella J. Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. *J Struct Biol* 2006;155:294–305.
 - Iozzo RV. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem* 1999;274:18843–6.
 - Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 1997;136:729–43.
 - Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol* 1998;141:1277–86.
 - Svensson L, Aszodi A, Reinholdt FP, Fassler R, Heinegard D, Oldberg A. Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J Biol Chem* 1999;274:9636–47.
 - Reardon AJ, Le Goff M, Briggs MD, McLeod D, Sheehan JK, Thornton DJ, *et al.* Identification in vitreous and molecular cloning of opticin, a novel member of the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 2000;275:2123–9.
 - Bishop PN, Takanosu M, Le Goff M, Mayne R. The role of the posterior ciliary body in the biosynthesis of vitreous humour. *Eye* 2002;16:454–60.
 - Ramesh S, Bonshek RE, Bishop PN. Immunolocalisation of opticin in the human eye. *Br J Ophthalmol* 2004;88:697–702.
 - Takanosu M, Boyd TC, Le Goff M, Henry SP, Zhang Y, Bishop PN, *et al.* Structure, chromosomal location, and tissue-specific expression of the mouse opticin gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2202–10.
 - Frolova EI, Fokina VM, Beebe DC. The expression pattern of opticin during chicken embryogenesis. *Gene Expr Patterns* 2004;4:335–8.
 - Pellegrini B, Acland GM, Ray J. Cloning and characterization of opticin cDNA: evaluation as a candidate for canine oculo-skeletal dysplasia. *Gene* 2002;282:121–31.
 - Le Goff MM, Hindson VJ, Jowitt TA, Scott PG, Bishop PN. Characterization of opticin and evidence of stable dimerization in solution. *J Biol Chem* 2003;278:45280–7.
 - Bishop PN. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Prog Retin Eye Res* 2000;19:323–44.
 - Hindson VJ, Gallagher JT, Halfter W, Bishop PN. Opticin binds to heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4417–23.
 - Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12:69–78.
 - Magali M, Le Goff MM, Bishop PN. Focus on molecules: Opticin. *Exp Eye Res* 2007;85:303–4.
 - Sanders EJ, Walter MA, Parker E, Aramburo C, Harvey S. Opticin binds retinal growth hormone in the embryonic vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5404–9.
 - Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier JP. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. In: Woolf AD, Ed. *Baillière's Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. East Sussex, United Kingdom: Baillière Tindall; 2001:805–29.
 - Tardif G, Reboul P, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Ten years in the life of an enzyme: the story of the human MMP-13 (collagenase-3). *Mod Rheumatol* 2004;14:197–204.
 - Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J* 1997;322:809–14.
 - Heathfield TF, Onnerfjord P, Dahlberg L, Heinegard D. Cleavage of fibromodulin in cartilage explants involves removal of the N-terminal tyrosine sulfate-rich region by proteolysis at a site that is sensitive to matrix metalloproteinase-13. *J Biol Chem* 2004;279:6286–95.
 - Li Y, Aoki T, Mori Y, Ahmad M, Miyamori H, Takino T, *et al.* Cleavage of lumican by membrane-type matrix metalloproteinase-1 abrogates this proteoglycan-mediated suppression of tumor cell colony formation in soft agar. *Cancer Res* 2004;64:7058–64.
 - Monfort J, Tardif G, Reboul P, Mineau F, Roughley P, Pelletier JP, *et al.* Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloproteinase-13: identification of a new biglycan cleavage site. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R26.
 - Altman RD, Asch E, Bloch DA, Bole G, Borenstein D, Brandt KD, *et al.* Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1986;29:1039–49.
 - Roughley PJ, White RJ, Poole AR. Identification of a hyaluronic acid-binding protein that interferes with the preparation of high-buoyant-density proteoglycan aggregates from adult human articular cartilage. *Biochem J* 1985;231:129–38.
 - Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes: a role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1996;97:2011–9.
 - Massicotte F, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Lajeunesse D. Modulation of insulin-like growth factor 1 levels in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone* 2006;38:333–41.
 - Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Jovanovic D, Tardif G, Di Battista JA, Lascau-Coman V, *et al.* Effects of tenidap on canine experimental osteoarthritis II: study of the expression of collagenase-1 and IL1 β by *in situ* hybridization. *J Rheumatol* 1998;25:951–8.
 - Fardale RW, Sayers CA, Barrett AJ. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res* 1982;9:247–8.
 - Tardif G, Hum D, Pelletier JP, Boileau C, Ranger P, Martel-Pelletier J. Differential gene expression and regulation of the bone morphogenetic protein antagonists follistatin and gremlin in normal and osteoarthritic human chondrocytes and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2004;50:2521–30.
 - Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopman WJ, Moreland LW, Eds. *Arthritis & Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. 15th edn. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins; 2005:2199–226.
 - Fosang AJ, Last K, Knauper V, Murphy G, Neame PJ. Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS Lett* 1996;380:17–20.
 - Deng SJ, Bickett DM, Mitchell JL, Lambert MH, Blackburn RK, Carter HL 3rd, *et al.* Substrate specificity of human collagenase 3 assessed using a phage-displayed peptide library. *J Biol Chem* 2000;275:31422–7.
 - Johansson N, Saarialho-Kere U, Airola K, Herva R, Nissinen L, Westermark J, *et al.* Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn* 1997;208:387–97.
 - Stahle-Backdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jimenez MG, Vega JA, *et al.* Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1997;76:717–28.
 - Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Lascau-Coman V, Moldovan F, Jovanovic D, Raynaud JP, *et al.* Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J Rheumatol* 1998;25:1585–94.
 - Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage *in situ*: *in vitro* mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum* 1997;40:1653–61.
 - Bau B, Gebhard PM, Haag J, Knorr T, Bartnik E, Aigner T. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes *in vivo* and *in vitro*. *Arthritis Rheum* 2002;46:2648–57.
 - Aigner T, Zien A, Hanisch D, Zimmer R. Gene expression in chondrocytes assessed with use of microarrays. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(Suppl 2):117–23.
 - Melching LI, Fisher WD, Lee ER, Mort JS, Roughley PJ. The cleavage of biglycan by aggrecanases. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:1147–54.

DISCUSIÓ

dos enzims claus en la degradació del cartílag, i també de la composició d'agrecà i col·lagen tipus II en àrees d'una mateixa articulació sotmeses a diferents forces de pressió (Monfort et al., 2006a). El paper de les MMPs en aquestes situacions havia estat fins llavors poc estudiat. En aquest treball es van utilitzar mostres de cartílag de cap de fèmur humà tant sanes (provinents de pacients amb fractures osteoporòtiques) com artròsiques, cosa que acostava els resultats a un entorn més real que no pas els models animals o els estudis *in vitro*.

Els estímuls mecànics als que totes les cèl·lules de l'organisme estan contínuament exposades converteixen les forces físiques en senyals bioquímics i modifiquen les respostes cel·lulars. En una articulació sana, el condrocit es troba estimulat per una càrrega mecànica fisiològica, que és essencial tant per regular la seva activitat metabòlica com per mantenir la funció normal del teixit, promovent respostes cel·lulars que afecten el metabolisme, la secreció de factors de creixement i citocines i alterant l'expressió gènica (Blain, 2007). Pel *turnover* normal del teixit és important l'acció de les MMPs, i diferents estudis, tant *in vivo* com *in vitro* (Bader et al., 2011), han demostrat que la càrrega mecànica regula tant la seva expressió com l'activació. No obstant, quan es dona una alteració de la biomecànica articular degut a una pressió excessiva, repetida o a un impacte traumàtic, l'alteració en el metabolisme que té lloc al cartílag afecta a la composició d'aquest, amb la seva consegüent degradació i aparició de l'OA.

Els estudis *in vivo* basats en models animals han mostrat la relació directa entre la funció biomecànica anormal, la degeneració articular i l'expressió de les MMPs. S'ha descrit, per exemple, que una càrrega excessiva induïx OA i es correlaciona amb un augment d'activitat d'MMP-3 (Pap et al., 1998); que la lesió mecànica del cartílag induïx signes radiològics d'OA (Roos et al., 1995); i que l'administració d'TIMPs poden prevenir la degradació del cartílag en un model d'inducció quirúrgica d'OA post-traumàtica (Janusz et al., 2002). Per una altra banda, els models *in vitro* han permès la dissecció dels mecanismes implicats en la mecanoregulació de les MMPs. La càrrega anormal augmenta la producció de citocines inflamatòries (IL-1 i TNF- α), que induïxen la síntesi d'MMPs

(MMP-1, -3 i -13) i agrecanases (ADAMTS-4 i -5) (Blain, 2007). Això porta al seu torn a la digestió dels col·làgens i PGs i finalment al dany estructural i a la destrucció del cartílag. El condrocit normal, però, inicia una resposta anabòlica en un intent de mantenir l'homeòstasi i de prevenir la degradació del cartílag. Aquesta resposta consisteix en l'augment en l'expressió d'agrecà i la reducció en els nivells d'MMP-1, -3 i -13 induïdes per IL-1 i TNF- α (Agarwal et al., 2001; Deschner et al., 2006; Sun and Yokota, 2002; Torzilli et al., 2011; Torzilli et al., 2010; Xu et al., 2000; Yokota et al., 2003). En canvi, el cartílag artròsic, respon diferent al cartílag normal quan és sotmès a una càrrega mecànica, ja que s'ha descrit que aquesta resposta anabòlica està absent (Bader et al., 2011; Millward-Sadler et al., 2000; Salter et al., 2002).

Els resultats del nostre treball estan en la mateixa línia que altres estudis, ja que també vàrem observar, en aquest cas en mostres humanes, que la reducció en la síntesi d'MMP-1 i MMP-3 només és apreciable en el cartílag normal, però no en l'artròsic (Monfort et al., 2006a). A més, la reducció d'MMP-1 en cartílag sà és significativament major en les zones sotmeses a major càrrega fisiològica, fet que corrobora que el cartílag respon adaptant-se, a nivell estructural i bioquímic, a les necessitats fisiològiques de l'articulació. Finalment, observàrem que la proporció d'agrecà/col·lagen II tendeix a ser més elevat en les zones sotmeses a més pressió a les mostres sanes. Aquests resultats demostren que la càrrega és un estímul fisiològic pel cartílag, que intenta protegir i mantenir la matriu a través de l'acció combinada entre un augment en la síntesi de col·lagen II i una reducció en la seva degradació degut a la disminució de proteases.

En el cas dels components del cartílag, s'ha descrit que els nivells d'agrecà i col·lagen II estan augmentats en condrocits normals sotmesos a estimulació mecànica, però disminuïts en condrocits OA (Angele et al., 2004; Bader et al., 2011; Salter et al., 2002; Smith et al., 2004). Al nostre treball, la ràtio d'agrecà/col·lagen II estava significativament disminuïda en cartílag OA degut a una depleció d'agrecà, cosa que estaria en línia amb l'evolució natural de la malaltia, en la que la degradació de PGs precedeix a la degradació de les fibres de col·lagen (Arokoski et al., 2000). Aquesta variació té al seu torn repercussions a nivell

biomecànic, ja que l'agrecà és necessari per a que el cartílag resisteixi les càrregues compressives. La seva disminució portaria a una sobrecompressió del cartílag sotmès a estrès mecànic que redundaria en la resposta dels condrocits augmentant la secreció de proteases i contribuint per tant a la degeneració tissular.

Les diferències trobades en els condrocits articulars entre les zones sotmeses a més o menys càrrega fisiològica no són explicades per un contingut cel·lular diferent, ja que es va observar nivells similars d'apoptosi. Per aquesta raó es proposen 3 hipòtesis que expliquen aquesta desregulació: 1) el cartílag té un contingut cel·lular menor i per tant perd la seva capacitat de reacció; 2) els condrocits artròsics són menys sensibles a la càrrega, o 3) els factors inflamatoris poden actuar sobre els condrocits com estímuls que emmascaren l'efecte de la càrrega.

Aquesta última és la hipòtesi més probable, ja que s'ha demostrat recentment que existeix un efecte sinèrgic entre la càrrega mecànica i la inflamació, de manera que les forces de pressió normals porten a una disminució de l'alliberament d'IL-1, que porta al seu torn a una disminució de la síntesi d'MMPs, ADAMTs i ON (Torzilli et al., 2011; Torzilli et al., 2010) i consegüentment a la reducció de la degradació de la MEC. Això demostra que la càrrega mecànica actuaria modulant els nivells d'MMPs també a nivell post-transcripcional: l'expressió de citocines pro-inflamatòries (IL-1, IL-6, IL-17 o TNF- α) augmentaria l'activitat de les MMPs i a la inversa, la inducció mecànica de citocines anti-inflamatòries (IL-4, IL-10, IL-11 o IL-13) bloquejarien l'acció de les anteriors i suprimirien l'activació de les MMPs conferint un efecte condroprotector (Bader et al., 2011).

Els resultats del nostre estudi no només són importants pel coneixement del paper de la biomecànica en l'inici i progressió de l'OA des del punt de vista fisiopatològic (Wilson et al., 2008), sinó que també obren la porta a l'estudi de teràpies que potencialment podrien disminuir la inflamació o moderar la degeneració del cartílag. Donat que els individus artròsics no responen tan àmpliament als efectes beneficiosos de la pressió fisiològica, amb una menor inducció de les citocines antiinflamatòries, podria ser necessària l'aportació externa d'aquests components. De fet, la teràpia gènica amb la citocina antiinflamatòria IL-4

millora la inflamació dels condrocits (Relic et al., 2001), la seva injecció intra-articular millora notablement l'estat degeneratiu del cartílag (Yorimitsu et al., 2008) i la transferència gènica en les cèl·lules sinovials d'IL-10, que també està sobreexpressada en els condrocits artròsics, té un efecte moderadament protector en el cartílag (Zhang et al., 2004).

En resum, tot indica que la càrrega mecànica normal protegeix la MEC a través de mecanismes anti-inflamatoris capaços d'induir una reducció en la degradació per part de les MMPs i un augment de la síntesi dels components de la matriu. Aquesta resposta es veu disminuïda al cartílag artròsic.

Aquesta manca de resposta als efectes beneficiosos de la càrrega fisiològica, juntament amb l'acció de determinades proteases són dos dels principals actors en l'anomenat catabolisme del cartílag que condueix finalment a l'aparició de la patologia artròsica. Hi ha diferents tipus de proteïnases implicades en la degradació de la MEC, però es considera que el que té un paper més rellevant en la destrucció articular i l'aparició d'OA és el grup de les MMPs (Troeberg and Nagase, 2012). En aquest contexte és especialment rellevant un enzim, la MMP-13, no només perquè és la col·lagenasa amb major afinitat i velocitat de degradació de la triple hèlix de col·lagen II, sino també perquè té la capacitat de degradar un gran nombre d'altres components matricials. Per altra cantó, donat el paper dels SLRPs en bloquejar l'accés de les col·lagenases a les fibres de col·lagen (Geng et al., 2006), els altres estudis inclosos en aquest treball es van centrar en l'anàlisi de l'acció d'aquesta col·lagenasa en front a representants de les diferents famílies de SLRPs al llarg de l'evolució de la patologia, des del cartílag normal, fins al severament degradat, passant per estadis inicials i moderats.(Monfort et al., 2006b).

Els resultats mostren que l'MMP-13 degrada tots els SLRPs estudiats (decorina, biglicà, fibromodulina, lumicà i opticina), però que la fibromodulina, el biglicà i l'opticina semblen ser uns substrats preferents, mentre que la degradació de la decorina i el lumicà és molt menys eficient. Els nostres resultats recolzen la idea de que la degradació dels SLRPs per mitjà de la MMP-13 podria ser un procés primerenc en la degradació del cartílag, exposant les fibres

de col·lagen als enzims degradadors, i que les interaccions del SLRPs amb les fibres de col·lagen podrien protegir-les de la digestió de les col·lagenases (Geng et al., 2006).

El paper dels SLRPs en la regulació tant de l'osteogènesi com del remodelatge ossi i la seva participació en la progressió de malalties òssies degeneratives està actualment ben establerta (Nikitovic et al., 2012). Se sap que els SLRPs tenen papers específics durant totes les fases de la formació de l'os, inclosos els períodes de proliferació cel·lular, deposició de la matriu orgànica, remodelatge i deposició mineral (Parisuthiman et al., 2005; Waddington et al., 2003). També s'ha demostrat que estan lligats a processos esquelètics degeneratius i de fet els ratolins deficientes per un o més SLRPs són un bon model *in vivo* de malalties com l'osteoporosi, l'osteomalàcia o l'OA (Kalamajski and Oldberg, 2010). La importància dels SLRPs en l'homeòstasi del cartílag ve corroborada per un estudi recent que ha descrit les variacions en els nivells de col·lagen, PGs i SLRPs en mostres humanes de discs intervertebrals d'individus amb diferents edats (Singh et al., 2009). L'estudi mostra que el contingut total de col·lagen i PGs disminueix consistentment amb l'edat, però les concentracions d'SLRPs varien segons el tipus: mentre els nivells de decorina disminueixen, els nivells de biglicà i fibromodulina augmenten. Finalment, els models KO per diferents SLRPs demostren que la seva depleció altera l'arquitectura de les fibres de col·lagen en diferents teixits (Roughley, 2006): l'absència de decorina resulta en pell laxa i fràgil, l'absència de biglicà comporta un fenotip semblant a l'osteoporosi, l'absència de lumicà produeix una proporció anormalment elevada de fibres de col·lagen gruixudes i l'absència de fibromodulina resulta en una organització anòmala de les fibres de col·lagen. És especialment interessant el fet que els models deficientes per un o més dels SLRPs que vàrem estudiar (biglicà, decorina, fibromodulina, lumicà i opticina) demostrin una acció cooperativa, seqüencial i orquestrada dels SLRPs, que conjuntament modelarien l'arquitectura i les propietats mecàniques de la matriu de col·lagen (Ameye and Young, 2002).

Per altre banda és important el paper dels SLRPs en els processos inflamatoris, i en concret les propietats multifuncionals pro-inflamatòries de la decorina i el biglicà. Les sevas formas

solubles, un cop alliberadas, han estat intensament estudiades en els darrers temps (Moreth et al., 2012). El biglicà, a banda de la seva acció protectora de les fibril·les de col·lagen, en situacions de dany o estrés tissular, s'allibera de la MEC, de manera que la forma soluble indueix la resposta inflamatòria per mitjà de la seva interacció amb els receptors Toll-like (TLR-2/4) dels macròfags. (Babelova et al., 2009; Merline et al., 2011; Schaefer et al., 2005). Aquests, estimulats per les citocines pro-inflamatòries són també capaços de sintetitzar biglicà (Schaefer et al., 2005), de manera que aquesta síntesi *de novo* podria amplificar el mecanisme de senyalització als llocs danyats. Semblaria doncs que el biglicà inicia un cicle que és capaç d'impulsar la reacció de resposta inflamatòria de manera autocrina i paracrina (Moreth et al., 2012). El biglicà, però, també és capaç d'actuar sobre el sistema immune adaptatiu, ja que estimula el desenvolupament, creixement i diferenciació del llinatge dels monòcits (Kikuchi et al., 2000), s'uneix fortament al factor del complement C1q (Sjoberg et al., 2009) i actua com a lligand de CD-44 reclutant cèl·lules natural killer (Kitaya and Yasuo, 2009). A través de totes aquestes accions, el biglicà té un paper important en la perpetuació de la inflamació i del dany articular. Així, la senyalització del biglicà suposaria un enllaç entre la immunitat innata i adaptativa i confirma que els components solubles de la MEC estan directament implicats en l'etiologia de les malalties inflamatòries impulsades per les cèl·lules B i T (Moreth et al., 2012).

Els resultats del nostre segon treball varen mostrar que el biglicà és un substrat preferent d'MMP-13, que és capaç de degradar-lo de forma extensa i ràpida tant en teixit sà com OA. Tot i que la degradació era independent del dany, les quantitats de biglicà que vam observar en el cartílag que està més severament fibril·lat eren significativament inferiors respecte al normal o moderadament danyat (Monfort et al., 2006b).

L'explicació a la disminució dels nivells de biglicà podria ser que el teixit més danyat sofriria una major degradació que portaria a la pèrdua dels epítops que permeten els seu reconeixement a nivell experimental. Una altra explicació seria que una major degradació suposaria una menor concentració d'SLRPs units als components de la matriu que, en canvi, haurien estat extensament alliberats com a formes solubles. No obstant això, no està

clar quins són els mecanismes que regulen l'equilibri entre els SLRPs units o "lliures", ni fins a quin punt el seu alliberament és dependent de la degradació de la matriu. De fet, tant les formes unides a la MEC com les solubles interactuen amb diversos factors de creixement importants pel correcte metabolisme del cartílag (Nikitovic et al., 2012), i s'ha postulat que la quantitat i localització variable d'SLRPs en els diferents compartiments és un procés dinàmic que podria facilitar certes vies de senyalització que regulen processos tant biològics com patològics (Merline et al., 2009).

Per la seva banda, la decorina és un inhibidor natural de TGF- β , s'uneix en condicions fisiològiques al receptor del factor de creixement de la insulina (IGF-1) i exerceix un efecte anti-apoptòtic afavorint el creixement normal (Schonherr et al., 2005). A més, la seva forma soluble també s'ha identificat recentment com a nou lligand endogen de TLR-2/4 en els macròfags, capaç d'induir la síntesi de citocines anti-inflamatòries (Merline et al., 2011). En presència de polisacàrids, però (com en el cas d'una sèpsia), vira el perfil cap a un fenotip pro-inflamatori, inhibint la resolució de la inflamació i causant hiper-inflamació (Merline et al., 2011).

En el nostre treball s'observa que la decorina no és un substrat preferent d'MMP-13, ja que la seva digestió era menys eficient i més lenta en relació als altres SLRPs com la fibromodulina i el biglicà (Monfort et al., 2006b). Això confirma resultats previs que havien demostrat que el contingut de decorina en OA no pateix variacions significatives respecte al cartílag normal (Poole et al., 1996). Malgrat això, és probable que la seva proteòlisi tingui conseqüències rellevants en el procés artròsic, ja que vam identificar que el punt de tall d'MMP-13 es troba en la regió de repeticions riques en leucina, conegut per tenir un paper essencial en la seva interacció amb els col·làgens (Svensson et al., 1995). A més de les conseqüències en l'estructura i accés d'enzims a la matriu, la seva digestió podria alliberar les molècules de TGF- β a les que es troba unida en condicions normals i incrementar la producció d'MMP-13, contribuint així a la degradació tissular i perpetuant el procés inflamatori concomitant.

La fibromodulina és capaç d'unir-se a la superfície del col·lagen, actuant també com un factor regulador de la formació de les fibres de col·lagen tipus I i II (Hedbom and Heinegard, 1989; Scott and Haigh, 1985a, b). La seva importància en el desenvolupament de l'OA ha quedat recentment demostrada per estudis que conclouen que està sobreexpressada en aquesta malaltia i per un estudi recent que descriu que els condrocits responen al dany mecànic i a les citocines incrementant la síntesi de proteïnes específiques, en concret de col·lagen II, COMP, fibronectina i fibromodulina (Sofat, 2009; Stevens et al., 2009). Aquesta sobrerregulació també podria contribuir al dany articular estimulants vies inflamatòries, ja que s'ha demostrat que la fibromodulina es pot unir a C1q i induir una activació directa de la cascada del complement (Sjoberg et al., 2005).

En línia amb aquests resultats, el nostre treball descriu que junt amb el biglicà, la fibromodulina és un substrat preferencial de l'MMP-13 que podria representar un fenomen primerenc que reflecteixi la degradació de les fibril·les de col·lagen, ja que la seva proteòlisi és més ràpida i extensa que en el cas de la decorina o el lumicà. Així, semblaria que la fibromodulina és una diana de degradació en l'OA i que possiblement els seus productes proteolítics, com en el cas d'altres SLRPs, fomentaria el cicle de dany del teixit articular a través de l'activació de la via del complement.

El lumicà modula la síntesi de fibres de col·lagen i millora la seva estabilitat i, com la fibromodulina, està sobreexpressat en OA (Sofat, 2009). També hi ha evidències de la implicació del lumicà en els processos inflamatoris (Frey et al., 2013), ja que s'uneix a la superfamília dels TNF induint la secreció de citocines pro-inflamatòries i s'ha demostrat molt recentment que la seva disminució indueix una marcada reducció de la infiltració de neutròfils, resultant en l'empitjorament de la resolució de la malaltia inflamatòria (Hayashi et al., 2010; Lohr et al., 2012).

En el nostre treball, i de manera similar al cas de la decorina, MMP-13 no donava lloc a una fragmentació ràpida i extensa (Monfort et al., 2006b), i el nivell de degradació era independent del nivell de fibril·lació del teixit. Això coincideix amb els resultats d'altres estudis que han observat la degradació d'SLRPs en discs intervertebrals patològics i que, com en el nostre

cas, vàrem observar que el clivatge enzimàtic del lumicà és dèbil (Brown et al., 2012; Melrose et al., 2007). També d'acord amb els nostres resultats, un altre estudi va detectar que, malgrat que els nivells de degradació de lumicà estan elevats en cartílag OA, també s'observen en cartílag normal, indicant que aquesta fragmentació pot estar associada al *turnover* normal del teixit i no seria un biomarcador útil (Melrose et al., 2008).

L'opticina és un SLRP que s'ha estudiat bàsicament en context de la seva contribució a l'adhesió vitroretinal. Com en el cas d'altres SLRPs, l'opticina s'uneix a les fibril·les de col·lagen i a alguns PGs (Bishop, 2000; Le Goff et al., 2003), i s'ha proposat que la seva funció és regular l'assemblatge de les fibres de col·lagen i el manteniment de l'espai interfibril·lar (Hindson et al., 2005). Des de la publicació del nostre primer treball sobre l'opticina (Monfort et al., 2008) han aparegut noves evidències sobre la seva funció que complementen i abunden en la seva possible implicació en l'etiopatogènesi de l'OA. En concret, s'ha publicat que l'opticina és capaç d'inhibir l'angiogènesi patològica en un model murí de retinopatia induïda per oxigen (Le Goff et al., 2012a), exercint el seu efecte a través de la inhibició de la interacció entre les integrines $\alpha1\beta1/\alpha2\beta1$ i el col·lagen, redundant en una molècula de col·lagen poc adhesiva que impediria la unió ferma a la MEC (Le Goff et al., 2012b).

La darrera part d'aquest treball es va centrar en la identificació i caracterització de l'SLRP opticina com a nou component matricial del cartílag que està present tant a mostres normals com artròsiques (Monfort et al., 2008). En aquest treball es va demostrar per primera vegada la seva expressió en tots els teixits de l'articulació, i en particular la producció al cartílag humà normal i artròsic, i es va verificar la seva implicació en el procés artròsic provant la habilitat que té la MMP-13 per degradar-la, que ja s'ha discutit prèviament. A més, vàrem veure que tot i que la seva expressió es troba incrementada als condrocits OA respecte als normals, la seva localització normal a la zona superficial del cartílag pràcticament desapareix en el cartílag artròsic, cosa que confirma que el condrocit respon incrementant l'expressió d'aquest SLRP, però un cop secretat es produeix la seva degradació com un fet dinàmic lligat a l'inici del procés artròsic. Després d'aquests resultats,

el nostre grup ha continuat la investigació del patró de degradació de l'opticina per part d'altres proteases implicades en OA, i els resultats mostren que tant MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, ADAMTS-4, com ADAMTS-5 són capaces d'induir la seva degradació tant en cartílag normal com artròsic (Tio et al., 2013). Això confirma la hipòtesi que, sota condicions normals i patològiques, el *turnover* de la MEC en el teixit connectiu implica probablement l'acció conjunta i orquestrada de diferents agents proteolítics. El paper de l'opticina en l'OA podria estar íntimament lligat a l'angiogènesi, un procés que també s'observa en la sinovial i els condrocits articulars, ja que la degradació de la matriu permet que els nous vasos sanguinis penetrin en el cartílag i augmenti la infiltració de cèl·lules inflamatòries (Bonnet and Walsh, 2005; Haywood et al., 2003). La degradació de l'opticina podria contribuir a permetre l'angiogènesi patològica interferint en l'adhesió correcta entre les integrines i les molècules de col·lagen, i això al seu torn facilitaria el dany induït per la inflamació. És interessant destacar que recentment s'ha proposat que incidir en l'angiogènesi podria ser útil per reduir el dolor i el dany estructural en l'OA (Ashraf et al., 2011).

En resum, totes aquestes evidències recents apunten que, a banda del seu efecte protector sobre les fibres de col·lagen, quan es produeix l'alliberament proteolític dels SLRPs, aquests actuarien com a molècules associades al dany tissular, orquestrant i impulsant una resposta inflamatòria per part de l'hoste. De tot l'exposat anteriorment és clar que a més de l'expressió i activitat de les MMPs i les agreganases, els factors que regulen l'activitat d'aquestes, com ara els factors de transcripció, els estímuls pro-inflamatoris i els estímuls mecànics protectors/perjudicials, tenen probablement un paper important en la modulació de quins SLRPs són accessibles i preferentment degradats en l'OA humana.

Per altre banda, la identificació de fragments específics d'SLRPs que es puguin correlacionar amb la malaltia no només són útils per entendre l'etiopatogènesi de l'OA, sinó que també podrien ser biomarcadors útils que es podrien fer servir com a marcadors d'inici i per monitoritzar la progressió de la malaltia. Això és especialment important si tenim en compte que els marcadors bioquímics en sang i en orina que s'han estudiat fins al moment

no són necessàriament específics de les alteracions que es donen en l'articulació, sinó que donen informació del *turnover* del sistema esquelètic. Per exemple, les malalties degeneratives dels genolls, malucs, mans, i discs lumbarls contribueixen de forma independent i additiva als nivells urinaris de CTX-II (Meulenbelt et al., 2006), i els nivells de molts dels marcadors també varien amb el sexe, l'edat, la menopausa, l'ètnia o el pes (Jordan et al., 2003; Kobayashi et al., 1997; Kraus et al., 2011), i també poden estar influïts per altres alteracions esquelètiques com l'osteoporosi o altres medicacions concomitants (Young-Min et al., 2001).

La determinació d'un o múltiples SLRPs, o els seus fragments, també podria ser útil en la monitorització de la resposta al tractament, ja que són biomarcadors representatius de les diferents vies implicades en l'etiopatogènia de la malaltia, com ara la síntesi de teixit, la destrucció i la inflamació, i els seus nivells podrien reflectir l'impacte de la medicació en el catabolisme i l'anabolisme del cartílag.

Els nostres resultats confirmen el potencial dels SLRPs com a marcadors específics de la malaltia, ja que es va observar que la digestió de la fibromodulina genera un fragment que és específic dels pacients amb una fibril·lació severa o moderada (Monfort et al., 2006b). Aquest patró específic de degradació es veu confirmat per altres treballs que han identificat la presència de catabòlits específics de biglicà i fibromodulina en el cas d'articulacions artròsiques que no es troben en cartílag normal (Melrose et al., 2008; Schaefer et al., 2005). Aquest patró de degradació diferencial podria ser útil si, per exemple, es generessin anticossos capaços de reconèixer els fragments resultants de la proteòlisi que poguessin ser fàcilment detectats en sang o orina un cop alliberats.

Finalment, i considerant que la depleció d'SLRPs exacerba les malalties degeneratives com l'osteoporosi i l'OA, i tenint en compte l'envelliment de la població, l'ús o regulació dels SLRPs s'hauria de considerar a més com una nova teràpia per tal d'incidir en aquestes patologies. En aquesta línia hi ha evidències prometedores, com és el cas d'un model de ratolí deficient en biglicà que és resistent a la pèrdua d'os trabecular induïda per la depleció d'estrògens per ovariectomia (Nielsen et al., 2003); la demostració que els ultrasons de

baixa intensitat estimulen l'expressió endògena de biglicà i col·lagen I, augmentant la curació de l'os i el tendó en conills que havien rebut empelts (Papatheodorou et al., 2009); o l'efecte inhibidor de la neovascularització corneal induïda per la teràpia gènica amb decorina dirigida a l'estroma de conills (Mohan et al., 2011).

En conjunt, els resultats obtinguts en els tres treballs que es presenten en aquesta tesi demostren que, tal i com s'havia hipotetitzat, els processos proteolítics als que estan sotmesos els PGs i, més concretament, els SLRPs de la MEC són diferents en el cas de la malaltia OA i la normalitat, i que aquestes diferències són en alguns casos indicatives del grau de dany que ha patit el cartílag i/o de la càrrega mecànica que suporta l'articulació.

Aquests resultats són un exemple més de la importància dels estudis translacionals, ja que la recerca bàsica i la clínica són dues disciplines que es complementen, aportant una visió diferent tant del pacient com de la patologia. L'estudi de l'OA requereix per tant un esforç multidisciplinar que permeti abordar els reptes que la malaltia presenta en la pràctica clínica, i que són bàsicament tres: la seva detecció precoç, la identificació de marcadors de pronòstic o progressió i el desenvolupament de tractaments adequats.

La detecció precoç és important perquè l'OA és una patologia que es desenvolupa al llarg de dècades, i per tant passa per diferents fases fins a arribar a l'etapa final de pèrdua total del teixit articular i conseqüentment de la funció de l'articulació. Les radiografies rutinàries, per exemple, no són sensibles a l'hora de detectar canvis moleculars que pronostiquin anomalies del cartílag o de l'os. En aquest sentit, s'han desenvolupat noves tecnologies, com ara les imatges per ressonància magnètica nuclear (RMN) (Burstein and Hunter, 2009; Hunter, 2009), que permeten realitzar mesures i anàlisis quantitius de les articulacions. El problema és que aquestes mesures són únicament vàlides comparades amb una imatge de RMN de temps basal, i que el cost d'aquestes revisions i les seves avaluacions és de moment molt elevat. Per tant, el desenvolupament d'altres eines que tinguin la capacitat d'establir una cronologia de la malaltia, com ara mitjançant la identificació de molècules que puguin fer-se servir com a indicadors d'inici, és una necessitat clínica real. Els resultats dels

nostres treballs indiquen que els productes de degradació dels SLRPs com ara el biglicà o l'opticina són molècules que podrien ser considerats biomarcadors d'inici precoç (Monfort et al., 2006b; Monfort et al., 2008), ja que els fragments són generats per una proteasa que s'expressa únicament en processos patològics, però no en el cartílag sà. Pel que fa a la progressió de la patologia, la identificació de biomarcadors per a cadascuna de les etapes del desenvolupament de la malaltia és crucial per tal d'establir la cronologia dels esdeveniments. De fet, recentment s'ha postulat que algunes intervencions terapèutiques poden tenir diferent efectivitat depenent de la fase de la malaltia (Bay-Jensen et al., 2010). En aquest sentit, els nostres resultats aporten llum sobre el possible paper dels SLRPs com a bons candidats, ja que vàrem identificar un fragment de degradació de la fibromodulina que no només no es pot generar *in vitro* amb la MMP-13 en cartílag control, sinó que tan sols és observable en etapes d'afectació moderada o severa (Monfort et al., 2006b).

En referència al tractament, els fàrmacs que hi ha actualment a l'abast actuen de manera pal·liativa sobre els símptomes mitjançant la reducció del dolor i el control de la inflamació, però no frenen o disminueixen els canvis estructurals associats al procés artròsic. Per tant s'ha de tenir present que és essencial identificar dianes terapèutiques que siguin efectives per bloquejar la progressió de la malaltia i preservar el cartílag. Alguns dels agents farmacològics que s'utilitzen de forma habitual en la clínica com ara els corticosteroides i els antiinflamatoris tenen efectes profunds en la síntesi i acumulació d'SLRPs (Nikitovic et al., 2012). No és sorprenent per tant que els SLRPs també siguin molècules interessants a desenvolupar pel tractament i prevenció de la malaltia ja que, com s'ha exposat al llarg d'aquesta tesi, regulen i interaccionen amb altres molècules de senyalització que tenen un efecte directe en el manteniment i remodelatge de la MEC.

En resum, penso que els estudis realitzats en aquest treball tenen repercussions directes en la clínica, ja que contribueixen activament a un millor coneixement del procés de degradació del cartílag, no només descrivint alguns mecanismes patològics, sinó també obrint noves vies a la identificació de biomarcadors que podrien establir una línia de temps en les diverses fases que es presenten al llarg del desenvolupament de la malaltia.

D'aquesta manera, es podria identificar l'estadi en què es troba el pacient, permetent una intervenció terapèutica dissenyada específicament per cada individu amb aquest productes.

CONCLUSIONS

1. La síntesi de metal·loproteases està regulada per la càrrega mecànica

- La síntesi de les metal·loproteases MMP-1 i MMP-3 disminueix com a resposta d'una càrrega mecànica fisiològica, però només en el cas del cartílag normal, de manera que existeix una resposta diferencial a aquest estímul entre els teixits de cartílag humà sà i artròsic.

2. Les càrregues mecàniques fisiològiques són crucials per mantenir el balanç entre les proteïnes estructurals de la MEC i per tant, la integritat i funció del cartílag

- En el cartílag sà i artròsic, els nivells d'expressió d'agrecà i col·lagen II no són significativament diferents segons la pressió. En qualsevol cas, en el cartílag normal les àrees amb més pressió presenten una tendència a valors de ràtios agrecà/col·lagen II superiors.
- La ràtio agrecà/col·lagen II és molt inferior en el cartílag OA respecte al sà independentment de la càrrega a la que està sotmès.

3. La viabilitat dels condrocits no es veu afectada pel nivell de pressió suportada per l'articulació

- No hi ha una relació directa entre el percentatge de condrocits apoptòtics i les àrees de màxima o mínima càrrega mecànica suportada.

4. La col·lagenasa MMP-13 degrada diferents membres de la família d'SLRPs

- MMP-13 és capaç de degradar tant el biglicà com la fibromodulina, el lumicà, la decorina i l'opticina.
- D'entre aquests SLRPs, els substrats preferencials d'MMP-13 són la fibromodulina, el biglicà i l'opticina, mentre que la digestió de decorina i lumicà és poc efectiva.
- La degradació del biglicà, la fibromodulina i l'optina és ràpida i extensa, suggerint que són esdeveniments importants en els estadis inicials de la degeneració fibril·lar.

5. El procés artròsic s'associa a una degradació extensa i específica de l'SLRP fibromodulina en el cartílag

CONCLUSIONS

- El nivell de degradació de biglicà, decorina, lumicà i opticina no difereix entre el cartílag normal i el OA, però el de la fibromodulina és superior en els cartílags danyats de forma severa o moderada.
- La digestió de la fibromodulina per MMP-13 genera un fragment específic en fases avançades de la malaltia (cartílag moderada o severament fibril·lat). Aquest fragment és potencialment un biomarcador pel diagnòstic i seguiment de la malaltia.

6. L'opticina s'expressa en els teixits articulars humans i de manera diferencial en teixit normal i artròsic

- L'opticina s'expressa en condrocits humans, fibroblasts sinovials i osteoblasts subcondrals.
- Els condrocits del cartílag OA tendeixen a tenir nivells lleugerament més elevats de proteïna que els del cartílag normal.
- Els nivells d'opticina en la zona superficial de la matriu del cartílag és superior en el cas del cartílag normal, suggerint que en OA l'opticina de la matriu es troba degradada.

7. L'anàlisi de la seqüència aminoacídica identifica els llocs de tall d'MMP-13 sobre el biglicà i l'opticina

- MMP-13 indueix dos fragments de biglicà; el de major pes molecular es genera per un punt de tall prèviament no descrit que es localitza entre un residu de glicina i un de valina de la proteïna central.
- La digestió per MMP-13 genera dos fragments d'opticina a través d'un punt de tall major i un de menor localitzats a l'extrem N-terminal de la proteïna central madura, i abans de la regió rica en leucines.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Abramson, S.B., and Attur, M. (2009). Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 11, 227.

Agarwal, S., Long, P., Gassner, R., Piesco, N.P., and Buckley, M.J. (2001). Cyclic tensile strain suppresses catabolic effects of interleukin-1beta in fibrochondrocytes from the temporomandibular joint. *Arthritis Rheum* 44, 608-617.

Akizuki, S., Mow, V.C., Muller, F., Pita, J.C., Howell, D.S., and Manicourt, D.H. (1986). Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus. *J Orthop Res* 4, 379-392.

Altman, R., Alarcon, G., Appelrouth, D., Bloch, D., Borenstein, D., Brandt, K., Brown, C., Cooke, T.D., Daniel, W., Feldman, D., *et al.* (1991). The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 34, 505-514.

Altman, R., Alarcon, G., Appelrouth, D., Bloch, D., Borenstein, D., Brandt, K., Brown, C., Cooke, T.D., Daniel, W., Gray, R., *et al.* (1990). The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum* 33, 1601-1610.

Ameye, L., and Young, M.F. (2002). Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel *in vivo* models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* 12, 107R-116R.

Angele, P., Schumann, D., Angele, M., Kinner, B., Englert, C., Hente, R., Fuchtmeier, B., Nerlich, M., Neumann, C., and Kujat, R. (2004). Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds. *Biorheology* 41, 335-346.

Apte, S.S. (2009). A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem* 284, 31493-31497.

Arokoski, J.P., Jurvelin, J.S., Vaatainen, U., and Helminen, H.J. (2000). Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 10, 186-198.

Ashraf, S., Mapp, P.I., and Walsh, D.A. (2011). Contributions of angiogenesis to inflammation, joint damage, and pain in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 63, 2700-2710.

Athesian, G.A., and Mow, V.C. (2005). Friction, lubrication, and wear of articular cartilage and diarthrodial joints. In *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-Biology*, V.C. Mow, and R. Huiskes, eds. (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins), pp. 447-494.

Attur, M., Krasnokutsky-Samuels, S., Samuels, J., and Abramson, S.B. (2013). Prognostic biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 25, 136-144.

BIBLIOGRAFIA

Babelova, A., Moreth, K., Tsalastra-Greul, W., Zeng-Brouwers, J., Eickelberg, O., Young, M.F., Bruckner, P., Pfeilschifter, J., Schaefer, R.M., Grone, H.J., *et al.* (2009). Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem* 284, 24035-24048.

Bader, D.L., Salter, D.M., and Chowdhury, T.T. (2011). Biomechanical influence of cartilage homeostasis in health and disease. *Arthritis* 2011, 979032.

Baragi, V.M., Becher, G., Bendele, A.M., Biesinger, R., Bluhm, H., Boer, J., Deng, H., Dodd, R., Essers, M., Feuerstein, T., *et al.* (2009). A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models. *Arthritis Rheum* 60, 2008-2018.

Bay-Jensen, A.C., Hoegh-Madsen, S., Dam, E., Henriksen, K., Sondergaard, B.C., Pastoureau, P., Qvist, P., and Karsdal, M.A. (2010). Which elements are involved in reversible and irreversible cartilage degradation in osteoarthritis? *Rheumatology international* 30, 435-442.

Bech-Hansen, N.T., Naylor, M.J., Maybaum, T.A., Sparkes, R.L., Koop, B., Birch, D.G., Bergen, A.A., Prinsen, C.F., Polomeno, R.C., Gal, A., *et al.* (2000). Mutations in NYX, encoding the leucine-rich proteoglycan nyctalopin, cause X-linked complete congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 26, 319-323.

Bengtsson, E., Morgelin, M., Sasaki, T., Timpl, R., Heinegard, D., and Aspberg, A. (2002). The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor. *J Biol Chem* 277, 15061-15068.

Bentz, H., Nathan, R.M., Rosen, D.M., Armstrong, R.M., Thompson, A.Y., Segarini, P.R., Mathews, M.C., Dasch, J.R., Piez, K.A., and Seyedin, S.M. (1989). Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J Biol Chem* 264, 20805-20810.

Billinghurst, R.C., Dahlberg, L., Ionescu, M., Reiner, A., Bourne, R., Rorabeck, C., Mitchell, P., Hambor, J., Diekmann, O., Tschesche, H., *et al.* (1997). Enhanced cleavage of Type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 99, 1534-1545.

Bishop, P.N. (2000). Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Progress in retinal and eye research* 19, 323-344.

Bitton, R. (2009). The economic burden of osteoarthritis. *Am J Manag Care* 15, S230-235.

Blain, E.J. (2007). Mechanical regulation of matrix metalloproteinases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12, 507-527.

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

BIBLIOGRAFIA

- Bock, H.C., Michaeli, P., Bode, C., Schultz, W., Kresse, H., Herken, R., and Miosge, N. (2001). The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 9, 654-663.
- Bondeson, J. (2011). Are we moving in the right direction with osteoarthritis drug discovery? Expert opinion on therapeutic targets 15, 1355-1368.
- Bonnet, C.S., and Walsh, D.A. (2005). Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 44, 7-16.
- Brandt, K.D., Radin, E.L., Dieppe, P.A., and van de Putte, L. (2006). Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis* 65, 1261-1264.
- Brown, S., Melrose, J., Caterson, B., Roughley, P., Eisenstein, S.M., and Roberts, S. (2012). A comparative evaluation of the small leucine-rich proteoglycans of pathological human intervertebral discs. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 21 Suppl 2, S154-159.
- Buckwalter, J.A., Hunziker, E., Rosenberg, L., and et al. (1991). In *Articular cartilage: Composition and structure*, S.L.Y. Woo, and J.A. Buckwalter, eds. (Illinois, (1987; Savannah, Georgia) American Academy of Orthopaedic Surgeons), pp. 405-425.
- Buckwalter, J.A., and Mankin, H.J. (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional course lectures* 47, 477-486.
- Buckwalter, J.A., and Martin, J.A. (2004). Sports and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 16, 634-639.
- Buckwalter, J.A., and Rosenberg, L.C. (1988). Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. *Electron Microsc Rev* 1, 87-112.
- Burstein, D., and Hunter, D.J. (2009). "Why aren't we there yet?" Re-examining standard paradigms in imaging of OA: summary of the 2nd annual workshop on imaging based measures of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 17, 571-578.
- Camper, L., Heinegard, D., and Lundgren-Akerlund, E. (1997). Integrin alpha2beta1 is a receptor for the cartilage matrix protein chondroadherin. *The Journal of cell biology* 138, 1159-1167.
- Conrozier, T., Balblanc, J.C., Richette, P., Mulleman, D., Maillet, B., Henrotin, Y., Rannou, F., Piroth, C., Hilliquin, P., Mathieu, P., et al. (2012). Early effect of hyaluronic acid intra-articular injections on serum and urine biomarkers in patients with knee osteoarthritis: An open-label observational prospective study. *J Orthop Res* 30, 679-685.
- Conrozier, T., Carlier, M.C., Mathieu, P., Colson, F., Debard, A.L., Richard, S., Favret, H., Bienvenu, J., and Vignon, E. (2000). Serum levels of YKL-40 and C reactive protein in

BIBLIOGRAFIA

patients with hip osteoarthritis and healthy subjects: a cross sectional study. *Ann Rheum Dis* 59, 828-831.

Corpuz, L.M., Funderburgh, J.L., Funderburgh, M.L., Bottomley, G.S., Prakash, S., and Conrad, G.W. (1996). Molecular cloning and tissue distribution of keratocan. Bovine corneal keratan sulfate proteoglycan 37A. *J Biol Chem* 271, 9759-9763.

Chakravarti, S. (2002). Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. *Glycoconj J* 19, 287-293.

Chakravarti, S., Magnuson, T., Lass, J.H., Jepsen, K.J., LaMantia, C., and Carroll, H. (1998). Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *The Journal of cell biology* 141, 1277-1286.

Charni, N., Juillet, F., and Garnero, P. (2005). Urinary type II collagen helical peptide (HELIX-II) as a new biochemical marker of cartilage degradation in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 52, 1081-1090.

Chen, X.D., Fisher, L.W., Robey, P.G., and Young, M.F. (2004). The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation. *FASEB J* 18, 948-958.

Chockalingam, P.S., Sun, W., Rivera-Bermudez, M.A., Zeng, W., Dufield, D.R., Larsson, S., Lohmander, L.S., Flannery, C.R., Glasson, S.S., Georgiadis, K.E., *et al.* (2011). Elevated aggrecanase activity in a rat model of joint injury is attenuated by an aggrecanase specific inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 315-323.

Christgau, S., and Cloos, P.A.C. (2004). Cartilage degradation products as markers for evaluation of patients with rheumatic disease. *Clin Appl Immunol Rev* 4, 277-294.

Danielson, K.G., Baribault, H., Holmes, D.F., Graham, H., Kadler, K.E., and Iozzo, R.V. (1997). Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *The Journal of cell biology* 136, 729-743.

Davies, P.S., Graham, S.M., MacFarlane, R.J., Leonidou, A., Mantalaris, A., and Tsiridis, E. (2013). Disease-modifying osteoarthritis drugs: in vitro and in vivo data on the development of DMOADs under investigation. *Expert opinion on investigational drugs* 22, 423-441.

Deberg, M., Dubuc, J.E., Labasse, A., Sanchez, C., Quettier, E., Bosseloir, A., Crielaard, J.M., and Henrotin, Y. (2008). One-year follow-up of Coll2-1, Coll2-1NO2 and myeloperoxidase serum levels in osteoarthritis patients after hip or knee replacement. *Ann Rheum Dis* 67, 168-174.

Deberg, M.A., Labasse, A.H., Collette, J., Seidel, L., Reginster, J.Y., and Henrotin, Y.E. (2005). One-year increase of Coll 2-1, a new marker of type II collagen degradation, in urine is highly predictive of radiological OA progression. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 1059-1065.

DeLee DeLee and Drez's Orthopaedic Sports Medicine, Vol 3rd ed.

BIBLIOGRAFIA

- Denoble, A.E., Huffman, K.M., Stabler, T.V., Kelly, S.J., Hershfield, M.S., McDaniel, G.E., Coleman, R.E., and Kraus, V.B. (2011). Uric acid is a danger signal of increasing risk for osteoarthritis through inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 2088-2093.
- Deschner, J., Rath-Deschner, B., and Agarwal, S. (2006). Regulation of matrix metalloproteinase expression by dynamic tensile strain in rat fibrochondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 264-272.
- Dieppe, P.A., and Lohmander, L.S. (2005). Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet* 365, 965-973.
- Douglas, T., Heinemann, S., Bierbaum, S., Scharnweber, D., and Worch, H. (2006). Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. *Biomacromolecules* 7, 2388-2393.
- Dourado, G.S., Adams, M.E., Matyas, J.R., and Huang, D. (1996). Expression of biglycan, decorin and fibromodulin in the hypertrophic phase of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 4, 187-196.
- El-Maadawy, S., Kaartinen, M.T., Schinke, T., Murshed, M., Karsenty, G., and McKee, M.D. (2003). Cartilage formation and calcification in arteries of mice lacking matrix Gla protein. *Connect Tissue Res* 44 *Suppl 1*, 272-278.
- Elders, M.J. (2000). The increasing impact of arthritis on public health. *J Rheumatol Suppl* 60, 6-8.
- Elliott, A.L., Kraus, V.B., Luta, G., Stabler, T., Renner, J.B., Woodard, J., Dragomir, A.D., Helmick, C.G., Hochberg, M.C., and Jordan, J.M. (2005). Serum hyaluronan levels and radiographic knee and hip osteoarthritis in African Americans and Caucasians in the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis and rheumatism* 52, 105-111.
- Erhart-Hledik, J.C., Favre, J., Asay, J.L., Smith, R.L., Giori, N.J., Mundermann, A., and Andriacchi, T.P. (2012). A relationship between mechanically-induced changes in serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and changes in cartilage thickness after 5 years. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 1309-1315.
- Eyre, D.R. (1991). The collagens of articular cartilage. *Semin Arthritis Rheum* 21, 2-11.
- Felson, D.T. (2003). Epidemiology of osteoarthritis. In *Osteoarthritis*, D. Brandt, Lohmander, ed. (New York, Oxford University Press Inc.), pp. 9-21.
- Felson, D.T., Naimark, A., Anderson, J., Kazis, L., Castelli, W., and Meenan, R.F. (1987). The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 30, 914-918.

BIBLIOGRAFIA

- Fernandez-Lopez, J.C., Laffon, A., Blanco, F.J., and Carmona, L. (2008). Prevalence, risk factors, and impact of knee pain suggesting osteoarthritis in Spain. *Clin Exp Rheumatol* 26, 324-332.
- Fidelix, T.S., Soares, B.G., and Trevisani, V.F. (2006). Diacerein for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD005117.
- Fosang, A.J., Last, K., Knauper, V., Murphy, G., and Neame, P.J. (1996a). Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS Lett* 380, 17-20.
- Fosang, A.J., Last, K., and Maciewicz, R.A. (1996b). Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. Evidence that matrix metalloproteinase and aggrecanase activities can be independent. *J Clin Invest* 98, 2292-2299.
- Fraenkel, L., Roubenoff, R., LaValley, M., McAlindon, T., Chaisson, C., Evans, S., Harris, T., Dinarello, C.A., and Felson, D.T. (1998). The association of peripheral monocyte derived interleukin 1beta (IL-1beta), IL-1 receptor antagonist, and tumor necrosis factor-alpha with osteoarthritis in the elderly. *J Rheumatol* 25, 1820-1826.
- Freije, J.M., Diez-Itza, I., Balbin, M., Sanchez, L.M., Blasco, R., Tolia, J., and Lopez-Otin, C. (1994). Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269, 16766-16773.
- Frey, H., Schroeder, N., Manon-Jensen, T., Iozzo, R.V., and Schaefer, L. (2013). Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. *The FEBS journal* 280, 2165-2179.
- Friedman, J.S., Ducharme, R., Raymond, V., and Walter, M.A. (2000). Isolation of a novel iris-specific and leucine-rich repeat protein (oculoglycan) using differential selection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 2059-2066.
- Friedman, J.S., Faucher, M., Hiscott, P., Biron, V.L., Malenfant, M., Turcotte, P., Raymond, V., and Walter, M.A. (2002). Protein localization in the human eye and genetic screen of opticin. *Hum Mol Genet* 11, 1333-1342.
- Funderburgh, J.L., Corpuz, L.M., Roth, M.R., Funderburgh, M.L., Tasheva, E.S., and Conrad, G.W. (1997). Mimecan, the 25-kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. *J Biol Chem* 272, 28089-28095.
- Gao, G., Westling, J., Thompson, V.P., Howell, T.D., Gottschall, P.E., and Sandy, J.D. (2002). Activation of the proteolytic activity of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by C-terminal truncation. *J Biol Chem* 277, 11034-11041.
- Garnero, P. (2007). Use of biochemical markers to study and follow patients with osteoarthritis. *Curr Primary Care Rep* 2, 10-17.
- Garnero, P., Peterfy, C., Zaim, S., and Schoenharting, M. (2005). Bone marrow abnormalities on magnetic resonance imaging are associated with type II collagen

BIBLIOGRAFIA

degradation in knee osteoarthritis: a three-month longitudinal study. *Arthritis Rheum* 52, 2822-2829.

Garnero, P., Piperno, M., Gineyts, E., Christgau, S., Delmas, P.D., and Vignon, E. (2001). Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis* 60, 619-626.

Gendron, C., Kashiwagi, M., Lim, N.H., Enghild, J.J., Thogersen, I.B., Hughes, C., Caterson, B., and Nagase, H. (2007). Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4. *J Biol Chem* 282, 18294-18306.

Geng, Y., McQuillan, D., and Roughley, P.J. (2006). SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases. *Matrix Biol* 25, 484-491.

Gill, M.R., Oldberg, A., and Reinholt, F.P. (2002). Fibromodulin-null murine knee joints display increased incidences of osteoarthritis and alterations in tissue biochemistry. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 751-757.

Gineyts, E., Garnero, P., and Delmas, P.D. (2001). Urinary excretion of glucosyl-galactosyl pyridinoline: a specific biochemical marker of synovium degradation. *Rheumatology (Oxford)* 40, 315-323.

Glasson, S.S., Askew, R., Sheppard, B., Carito, B., Blanchet, T., Ma, H.L., Flannery, C.R., Peluso, D., Kanki, K., Yang, Z., *et al.* (2005). Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 434, 644-648.

Goldring, M.B. (2000a). Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep* 2, 459-465.

Goldring, M.B. (2000b). The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 43, 1916-1926.

Golightly, Y.M., Marshall, S.W., Kraus, V.B., Renner, J.B., Villaveces, A., Casteel, C., and Jordan, J.M. (2011). Biomarkers of incident radiographic knee osteoarthritis: do they vary by chronic knee symptoms? *Arthritis Rheum* 63, 2276-2283.

Halberg, D.F., Proulx, G., Doege, K., Yamada, Y., and Drickamer, K. (1988). A segment of the cartilage proteoglycan core protein has lectin-like activity. *J Biol Chem* 263, 9486-9490.

Hayashi, Y., Call, M.K., Chikama, T., Liu, H., Carlson, E.C., Sun, Y., Pearlman, E., Funderburgh, J.L., Babcock, G., Liu, C.Y., *et al.* (2010). Lumican is required for neutrophil extravasation following corneal injury and wound healing. *Journal of cell science* 123, 2987-2995.

Haywood, L., McWilliams, D.F., Pearson, C.I., Gill, S.E., Ganesan, A., Wilson, D., and Walsh, D.A. (2003). Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48, 2173-2177.

BIBLIOGRAFIA

Heathfield, T.F., Onnerfjord, P., Dahlberg, L., and Heinegard, D. (2004). Cleavage of fibromodulin in cartilage explants involves removal of the N-terminal tyrosine sulfate-rich region by proteolysis at a site that is sensitive to matrix metalloproteinase-13. *J Biol Chem* 279, 6286-6295.

Hedbom, E., and Heinegard, D. (1989). Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J Biol Chem* 264, 6898-6905.

Hedbom, E., and Heinegard, D. (1993). Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem* 268, 27307-27312.

Hellio le Graverand, M.P., Clemmer, R.S., Redifer, P., Brunell, R.M., Hayes, C.W., Brandt, K.D., Abramson, S.B., Manning, P.T., Miller, C.G., and Vignon, E. (2013). A 2-year randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study of oral selective iNOS inhibitor, cindunistat (SD-6010), in patients with symptomatic osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis* 72, 187-195.

Henrotin, Y., Martel-Pelletier, J., Msika, P., Guillou, G.B., and Deberg, M. (2012). Usefulness of specific OA biomarkers, Coll2-1 and Coll2-1NO2, in the anterior cruciate ligament OA canine model. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 787-790.

Hindson, V.J., Gallagher, J.T., Halfter, W., and Bishop, P.N. (2005). Opticin binds to heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 4417-4423.

Hunter, D.J. (2009). Insights from imaging on the epidemiology and pathophysiology of osteoarthritis. *Radiologic clinics of North America* 47, 539-551.

Ikegawa, S. (2008). Expression, regulation and function of asporin, a susceptibility gene in common bone and joint diseases. *Curr Med Chem* 15, 724-728.

Im, G.I., and Choi, Y.J. (2013). Epigenetics in osteoarthritis and its implication for future therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 13, 713-721.

Iozzo, R.V. (1997). The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32, 141-174.

Iozzo, R.V. (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67, 609-652.

Janusz, M.J., Bendele, A.M., Brown, K.K., Taiwo, Y.O., Hsieh, L., and Heitmeyer, S.A. (2002). Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: Inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 785-791.

Jepsen, K.J., Wu, F., Peragallo, J.H., Paul, J., Roberts, L., Ezura, Y., Oldberg, A., Birk, D.E., and Chakravarti, S. (2002). A syndrome of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice. *J Biol Chem* 277, 35532-35540.

Johansson, N., Saarialho-Kere, U., Airola, K., Herva, R., Nissinen, L., Westermarck, J., Vuorio, E., Heino, J., and Kahari, V.M. (1997). Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic

BIBLIOGRAFIA

chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn* 208, 387-397.

Johnson, J., Shinomura, T., Eberspaecher, H., Pinero, G., Decrombrughe, B., and Hook, M. (1999). Expression and localization of PG-Lb/epiphygan during mouse development. *Dev Dyn* 216, 499-510.

Jordan, J.M., Luta, G., Stabler, T., Renner, J.B., Dragomir, A.D., Vilim, V., Hochberg, M.C., Helmick, C.G., and Kraus, V.B. (2003). Ethnic and sex differences in serum levels of cartilage oligomeric matrix protein: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum* 48, 675-681.

Jordan, K.M., Syddall, H.E., Garnero, P., Gineyts, E., Dennison, E.M., Sayer, A.A., Delmas, P.D., Cooper, C., and Arden, N.K. (2006). Urinary CTX-II and glucosyl-galactosyl-pyridinoline are associated with the presence and severity of radiographic knee osteoarthritis in men. *Ann Rheum Dis* 65, 871-877.

Kalamajski, S., and Oldberg, A. (2010). The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol* 29, 248-253.

Karsdal, M.A., Madsen, S.H., Christiansen, C., Henriksen, K., Fosang, A.J., and Sondergaard, B.C. (2008). Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity. *Arthritis Res Ther* 10, R63.

Kempson, G.E., Muir, H., Pollard, C., and Tuke, M. (1973). The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochim Biophys Acta* 297, 456-472.

Kempson, G.E., Tuke, M.A., Dingle, J.T., Barrett, A.J., and Horsfield, P.H. (1976). The effects of proteolytic enzymes on the mechanical properties of adult human articular cartilage. *Biochim Biophys Acta* 428, 741-760.

Kikuchi, A., Tomoyasu, H., Kido, I., Takahashi, K., Tanaka, A., Nonaka, I., Iwakami, N., and Kamo, I. (2000). Haemopoietic biglycan produced by brain cells stimulates growth of microglial cells. *Journal of neuroimmunology* 106, 78-86.

Kitaya, K., and Yasuo, T. (2009). Dermatan sulfate proteoglycan biglycan as a potential selectin L/CD44 ligand involved in selective recruitment of peripheral blood CD16(-) natural killer cells into human endometrium. *Journal of leukocyte biology* 85, 391-400.

Knauper, V., Bailey, L., Worley, J.R., Soloway, P., Patterson, M.L., and Murphy, G. (2002). Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13. *FEBS Lett* 532, 127-130.

Knauper, V., Smith, B., Lopez-Otin, C., and Murphy, G. (1997). Activation of progelatinase B (proMMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13). *Eur J Biochem* 248, 369-373.

Knauper, V., Will, H., Lopez-Otin, C., Smith, B., Atkinson, S.J., Stanton, H., Hembry, R.M., and Murphy, G. (1996). Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13)

BIBLIOGRAFIA

activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 271, 17124-17131.

Knudson, C.B., and Knudson, W. (2001). Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 12, 69-78.

Kobayashi, T., Yoshihara, Y., Samura, A., Yamada, H., Shinmei, M., Roos, H., and Lohmander, L.S. (1997). Synovial fluid concentrations of the C-propeptide of type II collagen correlate with body mass index in primary knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 56, 500-503.

Kraus, V.B., Burnett, B., Coindreau, J., Cottrell, S., Eyre, D., Gendreau, M., Gardiner, J., Garner, P., Hardin, J., Henrotin, Y., *et al.* (2011). Application of biomarkers in the development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*.

Kresse, H., Hausser, H., and Schonherr, E. (1993). Small proteoglycans. *Experientia* 49, 403-416.

Krzeski, P., Buckland-Wright, C., Balint, G., Cline, G.A., Stoner, K., Lyon, R., Beary, J., Aronstein, W.S., and Spector, T.D. (2007). Development of musculoskeletal toxicity without clear benefit after administration of PG-116800, a matrix metalloproteinase inhibitor, to patients with knee osteoarthritis: a randomized, 12-month, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Res Ther* 9, R109.

Kubo, M., Ando, K., Mimura, T., Matsusue, Y., and Mori, K. (2009). Chondroitin sulfate for the treatment of hip and knee osteoarthritis: current status and future trends. *Life Sci* 85, 477-483.

Kumm, J., Tamm, A., Lintrop, M., and Tamm, A. (2013). The value of cartilage biomarkers in progressive knee osteoarthritis: cross-sectional and 6-year follow-up study in middle-aged subjects. *Rheumatology international* 33, 903-911.

Lai, Y., Yu, X.P., Zhang, Y., Tian, Q., Song, H., Mucignat, M.T., Perris, R., Samuels, J., Krasnokutsky, S., Attur, M., *et al.* (2012). Enhanced COMP catabolism detected in serum of patients with arthritis and animal disease models through a novel capture ELISA. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 854-862.

Le Goff, M.M., Hindson, V.J., Jowitt, T.A., Scott, P.G., and Bishop, P.N. (2003). Characterization of opticin and evidence of stable dimerization in solution. *J Biol Chem* 278, 45280-45287.

Le Goff, M.M., Lu, H., Ugarte, M., Henry, S., Takanosu, M., Mayne, R., and Bishop, P.N. (2012a). The vitreous glycoprotein opticin inhibits preretinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 228-234.

Le Goff, M.M., Sutton, M.J., Slevin, M., Latif, A., Humphries, M.J., and Bishop, P.N. (2012b). Opticin exerts its anti-angiogenic activity by regulating extracellular matrix adhesiveness. *J Biol Chem* 287, 28027-28036.

BIBLIOGRAFIA

- Ling, S.M., Patel, D.D., Garnero, P., Zhan, M., Vaduganathan, M., Muller, D., Taub, D., Bathon, J.M., Hochberg, M., Abernethy, D.R., *et al.* (2009). Serum protein signatures detect early radiographic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 43-48.
- Little, C.B., Barai, A., Burkhardt, D., Smith, S.M., Fosang, A.J., Werb, Z., Shah, M., and Thompson, E.W. (2009). Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum* 60, 3723-3733.
- Little, C.B., Meeker, C.T., Golub, S.B., Lawlor, K.E., Farmer, P.J., Smith, S.M., and Fosang, A.J. (2007). Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair. *J Clin Invest* 117, 1627-1636.
- Lohmander, L.S., Atley, L.M., Pietka, T.A., and Eyre, D.R. (2003). The release of crosslinked peptides from type II collagen into human synovial fluid is increased soon after joint injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48, 3130-3139.
- Lohmander, L.S., Yoshihara, Y., Roos, H., Kobayashi, T., Yamada, H., and Shinmei, M. (1996). Procollagen II C-propeptide in joint fluid: changes in concentration with age, time after knee injury, and osteoarthritis. *J Rheumatol* 23, 1765-1769.
- Lohr, K., Sardana, H., Lee, S., Wu, F., Huso, D.L., Hamad, A.R., and Chakravarti, S. (2012). Extracellular matrix protein lumican regulates inflammation in a mouse model of colitis. *Inflammatory bowel diseases* 18, 143-151.
- Lories, R.J., and Luyten, F.P. (2011). The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology* 7, 43-49.
- Loza, E., Lopez-Gomez, J.M., Abasolo, L., Maese, J., Carmona, L., and Batlle-Gualda, E. (2009). Economic burden of knee and hip osteoarthritis in Spain. *Arthritis Rheum* 61, 158-165.
- Madisen, L., Neubauer, M., Plowman, G., Rosen, D., Segarini, P., Dasch, J., Thompson, A., Ziman, J., Bentz, H., and Purchio, A.F. (1990). Molecular cloning of a novel bone-forming compound: osteoinductive factor. *DNA Cell Biol* 9, 303-309.
- Mankin, H.J., and Brandt, K.D. (1992). In *Biochemistry and metabolism of articular cartilage in osteoarthritis*, R.W. Moskowitz, D.S. Howell, V.C. Goldberg, and H.J. Mankin, eds. (Philadelphia, W.B. Saunders Company), pp. 109-154.
- Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J.P., and Roughley, P.J. (2008). Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22, 351-384.
- Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., and Pelletier, J.P. (2007). In *Subchondral bone and osteoarthritis progression: a very significant role*, J.A. Buckwalter, M. Lotz, and J.F. Stoltz, eds. (Amsterdam, Netherlands, IOS Press), pp. 206-218.
- Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., and Fahmi, H. (2003). Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum* 33, 155-167.

BIBLIOGRAFIA

Martel-Pelletier, J., Welsch, D.J., and Pelletier, J.P. (2001). Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15, 805-829.

Matthews, R.T., Gary, S.C., Zerillo, C., Pratta, M., Solomon, K., Arner, E.C., and Hockfield, S. (2000). Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member. *J Biol Chem* 275, 22695-22703.

Melching, L.I., Fisher, W.D., Lee, E.R., Mort, J.S., and Roughley, P.J. (2006). The cleavage of biglycan by aggrecanases. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 1147-1154.

Melching, L.I., and Roughley, P.J. (1999). Modulation of keratan sulfate synthesis on lumican by the action of cytokines on human articular chondrocytes. *Matrix Biol* 18, 381-390.

Melrose, J., Fuller, E.S., Roughley, P.J., Smith, M.M., Kerr, B., Hughes, C.E., Caterson, B., and Little, C.B. (2008). Fragmentation of decorin, biglycan, lumican and keratocan is elevated in degenerate human meniscus, knee and hip articular cartilages compared with age-matched macroscopically normal and control tissues. *Arthritis Res Ther* 10, R79.

Melrose, J., Smith, S.M., Fuller, E.S., Young, A.A., Roughley, P.J., Dart, A., and Little, C.B. (2007). Biglycan and fibromodulin fragmentation correlates with temporal and spatial annular remodelling in experimentally injured ovine intervertebral discs. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 16, 2193-2205.

Merline, R., Moreth, K., Beckmann, J., Nastase, M.V., Zeng-Brouwers, J., Tralhao, J.G., Lemarchand, P., Pfeilschifter, J., Schaefer, R.M., Iozzo, R.V., *et al.* (2011). Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21. *Science signaling* 4, ra75.

Merline, R., Schaefer, R.M., and Schaefer, L. (2009). The matricellular functions of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs). *Journal of cell communication and signaling* 3, 323-335.

Meulenbelt, I., Kloppenburg, M., Kroon, H.M., Houwing-Duistermaat, J.J., Garnero, P., Hellio Le Graverand, M.P., Degroot, J., and Slagboom, P.E. (2006). Urinary CTX-II levels are associated with radiographic subtypes of osteoarthritis in hip, knee, hand, and facet joints in subject with familial osteoarthritis at multiple sites: the GARP study. *Ann Rheum Dis* 65, 360-365.

Millward-Sadler, S.J., Wright, M.O., Davies, L.W., Nuki, G., and Salter, D.M. (2000). Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 results in altered aggrecan and matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthritic, human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 43, 2091-2099.

Mitchell, P.G., Magna, H.A., Reeves, L.M., Lopresti-Morrow, L.L., Yocum, S.A., Rosner, P.J., Geoghegan, K.F., and Hambor, J.E. (1996). Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 97, 761-768.

BIBLIOGRAFIA

Mitrovic, D., Quintero, M., Stankovic, A., and Ryckewaert, A. (1983). Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces. *Lab Invest* *49*, 309-316.

Miwa, H.E., Gerken, T.A., Huynh, T.D., Duesler, L.R., Cotter, M., and Hering, T.M. (2009). Conserved sequence in the aggrecan interglobular domain modulates cleavage by ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Biochim Biophys Acta* *1790*, 161-172.

Mobasheri, A., and Henrotin, Y. (2010). Identification, validation and qualification of biomarkers for osteoarthritis in humans and companion animals: Mission for the next decade. *The Veterinary Journal* *185*, 95-97.

Mobasheri, A., and Henrotin, Y. (2011). Biomarkers of osteoarthritis: a review of recent research progress on soluble biochemical markers, published patents and areas for future development. *Recent Patents on Biomarkers* *1*, 25-43.

Mohan, R.R., Tovey, J.C., Sharma, A., Schultz, G.S., Cowden, J.W., and Tandon, A. (2011). Targeted decorin gene therapy delivered with adeno-associated virus effectively retards corneal neovascularization in vivo. *PLoS one* *6*, e26432.

Moldovan, F., Pelletier, J.P., Hambor, J., Cloutier, J.M., and Martel-Pelletier, J. (1997). Collagenase-3 (matrix metalloproteinase 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum* *40*, 1653-1661.

Monfort, J., Garcia-Giralt, N., Lopez-Armada, M.J., Monllau, J.C., Bonilla, A., Benito, P., and Blanco, F.J. (2006a). Decreased metalloproteinase production as a response to mechanical pressure in human cartilage: a mechanism for homeostatic regulation. *Arthritis Res Ther* *8*, R149.

Monfort, J., Tardif, G., Reboul, P., Mineau, F., Roughley, P., Pelletier, J.P., and Martel-Pelletier, J. (2006b). Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloproteinase-13: identification of a new biglycan cleavage site. *Arthritis Res Ther* *8*, R26.

Monfort, J., Tardif, G., Roughley, P., Reboul, P., Boileau, C., Bishop, P.N., Pelletier, J.P., and Martel-Pelletier, J. (2008). Identification of opticin, a member of the small leucine-rich repeat proteoglycan family, in human articular tissues: a novel target for MMP-13 in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* *16*, 749-755.

Moreth, K., Iozzo, R.V., and Schaefer, L. (2012). Small leucine-rich proteoglycans orchestrate receptor crosstalk during inflammation. *Cell Cycle* *11*, 2084-2091.

Mow, V.C., and Rosenwasser, M.P. (1987). Articular cartilage biomechanics. In *Injury and Repair of Musculoskeletal Soft Tissues*, I.A. Buckwalter, ed. (Park Ridge, IL, AAOS), pp. 427-463.

Mow, V.C., Setton, L.A., Ratcliffe, A., and et al. (1990). In *Structure-function relationships of articular cartilage and the effect of joint instability and trauma on cartilage function*, K.D. Brandt, ed. (Indiana, University Press), pp. 22-42.

BIBLIOGRAFIA

Nagase, H. (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378, 151-160.

Nagase, H., Enghild, J.J., Suzuki, K., and Salvesen, G. (1990). Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry* 29, 5783-5789.

Nagase, H., and Kashiwagi, M. (2003). Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 5, 94-103.

Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research* 69, 562-573.

Nagase, H., and Woessner, J.F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274, 21491-21494.

Nelson, F., Dahlberg, L., Lavery, S., Reiner, A., Pidoux, I., Ionescu, M., Fraser, G.L., Brooks, E., Tanzer, M., Rosenberg, L.C., *et al.* (1998). Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest* 102, 2115-2125.

Neuhold, L.A., Killar, L., Zhao, W., Sung, M.L., Warner, L., Kulik, J., Turner, J., Wu, W., Billingham, C., Meijers, T., *et al.* (2001). Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* 107, 35-44.

Nielsen, K.L., Allen, M.R., Bloomfield, S.A., Andersen, T.L., Chen, X.D., Poulsen, H.S., Young, M.F., and Heegaard, A.M. (2003). Biglycan deficiency interferes with ovariectomy-induced bone loss. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18, 2152-2158.

Nikitovic, D., Aggelidakis, J., Young, M.F., Iozzo, R.V., Karamanos, N.K., and Tzanakakis, G.N. (2012). The biology of small leucine-rich proteoglycans in bone pathophysiology. *J Biol Chem* 287, 33926-33933.

Notoya, K., Jovanovic, D.V., Reboul, P., Martel-Pelletier, J., Mineau, F., and Pelletier, J.P. (2000). The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* 165, 3402-3410.

O'Hara, B.P., Urban, J.P., and Maroudas, A. (1990). Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. *Annals of the rheumatic diseases* 49, 536-539.

Ohta, K., Lupo, G., Kuriyama, S., Keynes, R., Holt, C.E., Harris, W.A., Tanaka, H., and Ohnuma, S. (2004). Tsukushi functions as an organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin. *Dev Cell* 7, 347-358.

Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 221-233.

BIBLIOGRAFIA

- Pap, G., Eberhardt, R., Sturmer, I., Machner, A., Schwarzberg, H., Roessner, A., and Neumann, W. (1998). Development of osteoarthritis in the knee joints of Wistar rats after strenuous running exercise in a running wheel by intracranial self-stimulation. *Pathology, research and practice* 194, 41-47.
- Papatheodorou, L.K., Malizos, K.N., Poultides, L.A., Hantes, M.E., Grafanaki, K., Giannouli, S., Ioannou, M.G., Koukoulis, G.K., Protopappas, V.C., Fotiadis, D.I., *et al.* (2009). Effect of transosseous application of low-intensity ultrasound at the tendon graft-bone interface healing: gene expression and histological analysis in rabbits. *Ultrasound in medicine & biology* 35, 576-584.
- Parisuthiman, D., Mochida, Y., Duarte, W.R., and Yamauchi, M. (2005). Biglycan modulates osteoblast differentiation and matrix mineralization. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20, 1878-1886.
- Pavelka, K., Forejtova, S., Olejarova, M., Gatterova, J., Senolt, L., Spacek, P., Braun, M., Hulejova, M., Stovickova, J., and Pavelkova, A. (2004). Hyaluronic acid levels may have predictive value for the progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 12, 277-283.
- Pellegrini, B., Acland, G.M., and Ray, J. (2002). Cloning and characterization of opticin cDNA: evaluation as a candidate for canine oculo-skeletal dysplasia. *Gene* 282, 121-131.
- Pelletier, J.P., Fernandes, J.C., Jovanovic, D.V., Reboul, P., and Martel-Pelletier, J. (2001a). Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of COX-2 and iNOS. *J Rheumatol* 28, 2509-2519.
- Pelletier, J.P., Jovanovic, D.V., Lascau-Coman, V., Fernandes, J.C., Manning, P.T., Connor, J.R., Currie, M.G., and Martel-Pelletier, J. (2000). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum* 43, 1290-1299.
- Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., and Abramson, S.B. (2001b). Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 44, 1237-1247.
- Pesch, K., Zeitz, C., Fries, J.E., Munscher, S., Pusch, C.M., Kohler, K., Berger, W., and Wissinger, B. (2003). Isolation of the mouse nyctalopin gene *nyx* and expression studies in mouse and rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 2260-2266.
- Plaas, A.H., Neame, P.J., Nivens, C.M., and Reiss, L. (1990). Identification of the keratan sulfate attachment sites on bovine fibromodulin. *J Biol Chem* 265, 20634-20640.
- Poole, A.R., Ionescu, M., Swan, A., and Dieppe, P.A. (1994). Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. *J Clin Invest* 94, 25-33.

BIBLIOGRAFIA

Poole, A.R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., and Lavery, S. (2001). Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*, S26-33.

Poole, A.R., Rosenberg, L.C., Reiner, A., Ionescu, M., Bogoch, E., and Roughley, P.J. (1996). Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *J Orthop Res* 14, 681-689.

Punzi, L., Ramonda, R., Deberg, M., Frallonardo, P., Campana, C., Musacchio, E., and Henrotin, Y. (2012). Coll2-1, Coll2-1NO2 and myeloperoxidase serum levels in erosive and non-erosive osteoarthritis of the hands. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 557-561.

Ramonda, R., Lorenzin, M., Modesti, V., Campana, C., Ortolan, A., Frallonardo, P., and Punzi, L. (2013). Serological markers of erosive hand osteoarthritis. *European journal of internal medicine* 24, 11-15.

Ramstad, V.E., Franzen, A., Heinegard, D., Wendel, M., and Reinholt, F.P. (2003). Ultrastructural distribution of osteoadherin in rat bone shows a pattern similar to that of bone sialoprotein. *Calcif Tissue Int* 72, 57-64.

Reardon, A.J., Le Goff, M., Briggs, M.D., McLeod, D., Sheehan, J.K., Thornton, D.J., and Bishop, P.N. (2000). Identification in vitreous and molecular cloning of opticin, a novel member of the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 275, 2123-2129.

Reboul, P., Pelletier, J.P., Tardif, G., Cloutier, J.M., and Martel-Pelletier, J. (1996). The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes: A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 97, 2011-2019.

Redler, I., Mow, V.C., Zimny, M.L., and Mansell, J. (1975). The ultrastructure and biomechanical significance of the tidemark of articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res*, 357-362.

Relic, B., Guicheux, J., Mezin, F., Lubberts, E., Togninalli, D., Garcia, I., van den Berg, W.B., and Guerne, P.A. (2001). IL-4 and IL-13, but not IL-10, protect human synoviocytes from apoptosis. *J Immunol* 166, 2775-2782.

Roos, H., Adalberth, T., Dahlberg, L., and Lohmander, L.S. (1995). Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age. *Osteoarthritis Cartilage* 3, 261-267.

Ross, M.D., Bruggeman, L.A., Hanss, B., Sunamoto, M., Marras, D., Klotman, M.E., and Klotman, P.E. (2003). Podocan, a novel small leucine-rich repeat protein expressed in the sclerotic glomerular lesion of experimental HIV-associated nephropathy. *J Biol Chem* 278, 33248-33255.

Roughley, P.J. (2006). The structure and function of cartilage proteoglycans. *European cells & materials* 12, 92-101.

BIBLIOGRAFIA

- Rubenhagen, R., Schuttrumpf, J.P., Sturmer, K.M., and Frosch, K.H. (2012). Interleukin-7 levels in synovial fluid increase with age and MMP-1 levels decrease with progression of osteoarthritis. *Acta orthopaedica* 83, 59-64.
- Sahebjam, S., Khokha, R., and Mort, J.S. (2007). Increased collagen and aggrecan degradation with age in the joints of Timp3(-/-) mice. *Arthritis Rheum* 56, 905-909.
- Salter, D.M., Millward-Sadler, S.J., Nuki, G., and Wright, M.O. (2002). Differential responses of chondrocytes from normal and osteoarthritic human articular cartilage to mechanical stimulation. *Biorheology* 39, 97-108.
- Samuels, J., Krasnokutsky, S., and Abramson, S.B. (2008). Osteoarthritis: a tale of three tissues. *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases* 66, 244-250.
- Scanzello, C.R., and Goldring, S.R. (2012). The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 51, 249-257.
- Scott, J.E., and Haigh, M. (1985a). Proteoglycan-type I collagen fibril interactions in bone and non-calcifying connective tissues. *Biosci Rep* 5, 71-81.
- Scott, J.E., and Haigh, M. (1985b). 'Small'-proteoglycan:collagen interactions: keratan sulphate proteoglycan associates with rabbit corneal collagen fibrils at the 'a' and 'c' bands. *Biosci Rep* 5, 765-774.
- Schaefer, L., Babelova, A., Kiss, E., Hausser, H.J., Baliova, M., Krzyzankova, M., Marsche, G., Young, M.F., Mihalik, D., Gotte, M., *et al.* (2005). The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* 115, 2223-2233.
- Schaefer, L., and Iozzo, R.V. (2008). Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem* 283, 21305-21309.
- Schenk, R.K., Egli, P.S., and Hunziker, E.B. (1986). In *Articular cartilage morphology*, K.E. Kuettner, R. Schleyerbach, and V.C. Hascall, eds. (New York, Raven Press), pp. 3-22.
- Schmidt, G., Hausser, H., and Kresse, H. (1991). Interaction of the small proteoglycan decorin with fibronectin. Involvement of the sequence NKISK of the core protein. *Biochem J* 280 (Pt 2), 411-414.
- Schonherr, E., Sunderkotter, C., Iozzo, R.V., and Schaefer, L. (2005). Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system. *J Biol Chem* 280, 15767-15772.
- Sharif, M., Kirwan, J.R., Elson, C.J., Granell, R., and Clarke, S. (2004). Suggestion of nonlinear or phasic progression of knee osteoarthritis based on measurements of serum cartilage oligomeric matrix protein levels over five years. *Arthritis Rheum* 50, 2479-2488.
- Shen, Z., Gantcheva, S., Mansson, B., Heinegard, D., and Sommarin, Y. (1998). Chondroadherin expression changes in skeletal development. *Biochem J* 330 (Pt 1), 549-557.

BIBLIOGRAFIA

Shimizu-Hirota, R., Sasamura, H., Kuroda, M., Kobayashi, E., and Saruta, T. (2004). Functional characterization of podocan, a member of a new class in the small leucine-rich repeat protein family. *FEBS Lett* 563, 69-74.

Singh, K., Masuda, K., Thonar, E.J., An, H.S., and Cs-Szabo, G. (2009). Age-related changes in the extracellular matrix of nucleus pulposus and anulus fibrosus of human intervertebral disc. *Spine* 34, 10-16.

Sjoberg, A., Onnerfjord, P., Morgelin, M., Heinegard, D., and Blom, A.M. (2005). The extracellular matrix and inflammation: fibromodulin activates the classical pathway of complement by directly binding C1q. *J Biol Chem* 280, 32301-32308.

Sjoberg, A.P., Manderson, G.A., Morgelin, M., Day, A.J., Heinegard, D., and Blom, A.M. (2009). Short leucine-rich glycoproteins of the extracellular matrix display diverse patterns of complement interaction and activation. *Molecular immunology* 46, 830-839.

Smith, R.L., Carter, D.R., and Schurman, D.J. (2004). Pressure and shear differentially alter human articular chondrocyte metabolism: a review. *Clin Orthop Relat Res*, S89-95.

Sofat, N. (2009). Analysing the role of endogenous matrix molecules in the development of osteoarthritis. *International journal of experimental pathology* 90, 463-479.

Sommarin, Y., and Heinegard, D. (1986). Four classes of cell-associated proteoglycans in suspension cultures of articular-cartilage chondrocytes. *Biochem J* 233, 809-818.

Song, R.H., Tortorella, M.D., Malfait, A.M., Alston, J.T., Yang, Z., Arner, E.C., and Griggs, D.W. (2007). Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis and rheumatism* 56, 575-585.

Song, X., Zeng, L., Jin, W., Thompson, J., Mizel, D.E., Lei, K., Billingham, R.C., Poole, A.R., and Wahl, S.M. (1999). Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis. *J Exp Med* 190, 535-542.

Sophia Fox, A.J., Bedi, A., and Rodeo, S.A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health* 1, 461-468.

Spector, T.D., Harris, P.A., Hart, D.J., Cicuttini, F.M., Nandra, D., Etherington, J., Wolman, R.L., and Doyle, D.V. (1996). Risk of osteoarthritis associated with long-term weight-bearing sports: a radiologic survey of the hips and knees in female ex-athletes and population controls. *Arthritis Rheum* 39, 988-995.

Stahle-Backdahl, M., Sandstedt, B., Bruce, K., Lindahl, A., Jimenez, M.G., Vega, J.A., and Lopez-Otin, C. (1997). Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 76, 717-728.

Stannus, O., Jones, G., Cicuttini, F., Parameswaran, V., Quinn, S., Burgess, J., and Ding, C. (2010). Circulating levels of IL-6 and TNF-alpha are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 1441-1447.

BIBLIOGRAFIA

- Stanton, H., Rogerson, F.M., East, C.J., Golub, S.B., Lawlor, K.E., Meeker, C.T., Little, C.B., Last, K., Farmer, P.J., Campbell, I.K., *et al.* (2005). ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* *434*, 648-652.
- Stevens, A.L., Wishnok, J.S., White, F.M., Grodzinsky, A.J., and Tannenbaum, S.R. (2009). Mechanical injury and cytokines cause loss of cartilage integrity and upregulate proteins associated with catabolism, immunity, inflammation, and repair. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *8*, 1475-1489.
- Stockwell, R.A. (1990). In *Morphology of cartilage*, A. Maroudas, and K. Keuttner, eds. (San Diego, Academic Press), pp. 61-63.
- Sumer, E.U., Schaller, S., Sondergaard, B.C., Tankó, L.B., and Qvist, P. (2006). Application of biomarkers in the clinical development of new drugs for chondroprotection in destructive joint diseases: a review. *Biomarkers* *11*, 485-506.
- Sun, H.B., and Yokota, H. (2002). Reduction of cytokine-induced expression and activity of MMP-1 and MMP-13 by mechanical strain in MH7A rheumatoid synovial cells. *Matrix Biol* *21*, 263-270.
- Svensson, L., Aszodi, A., Reinholt, F.P., Fassler, R., Heinegard, D., and Oldberg, A. (1999). Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J Biol Chem* *274*, 9636-9647.
- Svensson, L., Heinegard, D., and Oldberg, A. (1995). Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5. *J Biol Chem* *270*, 20712-20716.
- Tasheva, E.S., Ke, A., and Conrad, G.W. (2004). Analysis of the expression of chondroadherin in mouse ocular and non-ocular tissues. *Mol Vis* *10*, 544-554.
- Tio, L., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Bishop, P.N., Roughley, P., Farran, A., Benito, P., and Monfort, J. (2013). Characterization of opticin digestion by proteases involved in osteoarthritis development. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*.
- Torzilli, P.A., Bhargava, M., and Chen, C.T. (2011). Mechanical Loading of Articular Cartilage Reduces IL-1-Induced Enzyme Expression. *Cartilage* *2*, 364-373.
- Torzilli, P.A., Bhargava, M., Park, S., and Chen, C.T. (2010). Mechanical load inhibits IL-1 induced matrix degradation in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* *18*, 97-105.
- Troeberg, L., and Nagase, H. (2012). Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* *1824*, 133-145.
- Tveit, M., Rosengren, B.E., Nilsson, J.A., and Karlsson, M.K. (2012). Former male elite athletes have a higher prevalence of osteoarthritis and arthroplasty in the hip and knee than expected. *The American journal of sports medicine* *40*, 527-533.

BIBLIOGRAFIA

Vangsness, C.T., Jr., Spiker, W., and Erickson, J. (2009). A review of evidence-based medicine for glucosamine and chondroitin sulfate use in knee osteoarthritis. *Arthroscopy* 25, 86-94.

Venn, M.F. (1979). Chemical composition of human femoral and head cartilage: influence of topographical position and fibrillation. *Ann Rheum Dis* 38, 57-62.

Viola, M., Bartolini, B., Sonaggere, M., Giudici, C., Tenni, R., and Tira, M.E. (2007). Fibromodulin interactions with type I and II collagens. *Connect Tissue Res* 48, 141-148.

Visse, R., and Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research* 92, 827-839.

Vos, T., Flaxman, A.D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya, K., Salomon, J.A., Abdalla, S., Aboyans, V., *et al.* (2012). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380, 2163-2196.

Waddington, R.J., Roberts, H.C., Sugars, R.V., and Schonherr, E. (2003). Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *European cells & materials* 6, 12-21; discussion 21.

Wakitani, S., Nawata, M., Kawaguchi, A., Okabe, T., Takaoka, K., Tsuchiya, T., Nakaoka, R., Masuda, H., and Miyazaki, K. (2007). Serum keratan sulfate is a promising marker of early articular cartilage breakdown. *Rheumatology (Oxford)* 46, 1652-1656.

Wallace, J.M., Rajachar, R.M., Chen, X.D., Shi, S., Allen, M.R., Bloomfield, S.A., Les, C.M., Robey, P.G., Young, M.F., and Kohn, D.H. (2006). The mechanical phenotype of biglycan-deficient mice is bone- and gender-specific. *Bone* 39, 106-116.

Wandel, S., Juni, P., Tendal, B., Nuesch, E., Villiger, P.M., Welton, N.J., Reichenbach, S., and Trelle, S. (2010). Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis. *BMJ* 341, c4675.

Welgus, H.G. (1991). Stromelysin: structure and function. *Agents Actions Suppl* 35, 61-67.

Wernicke, D., Seyfert, C., Hinzmann, B., and Gromnica-Ihle, E. (1996). Cloning of collagenase 3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol* 23, 590-595.

Wiberg, C., Hedbom, E., Khairullina, A., Lamande, S.R., Oldberg, A., Timpl, R., Morgelin, M., and Heinegard, D. (2001). Biglycan and decorin bind close to the n-terminal region of the collagen VI triple helix. *J Biol Chem* 276, 18947-18952.

Wilson, D.R., McWalter, E.J., and Johnston, J.D. (2008). The measurement of joint mechanics and their role in osteoarthritis genesis and progression. *Rheumatic diseases clinics of North America* 34, 605-622.

BIBLIOGRAFIA

Winnemoller, M., Schmidt, G., and Kresse, H. (1991). Influence of decorin on fibroblast adhesion to fibronectin. *Eur J Cell Biol* 54, 10-17.

Winnemoller, M., Schon, P., Vischer, P., and Kresse, H. (1992). Interactions between thrombospondin and the small proteoglycan decorin: interference with cell attachment. *Eur J Cell Biol* 59, 47-55.

Wislowska, M., and Jablonska, B. (2005). Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis and knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 24, 278-284.

Woolf, A.D., and Pfleger, B. (2003). Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization* 81, 646-656.

Xu, Z., Buckley, M.J., Evans, C.H., and Agarwal, S. (2000). Cyclic tensile strain acts as an antagonist of IL-1 beta actions in chondrocytes. *J Immunol* 165, 453-460.

Yokota, H., Goldring, M.B., and Sun, H.B. (2003). CITED2-mediated regulation of MMP-1 and MMP-13 in human chondrocytes under flow shear. *J Biol Chem* 278, 47275-47280.

Yorimitsu, M., Nishida, K., Shimizu, A., Doi, H., Miyazawa, S., Komiyama, T., Nasu, Y., Yoshida, A., Watanabe, S., and Ozaki, T. (2008). Intra-articular injection of interleukin-4 decreases nitric oxide production by chondrocytes and ameliorates subsequent destruction of cartilage in instability-induced osteoarthritis in rat knee joints. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 764-771.

Young-Min, S.A., Cawston, T.E., and Griffiths, I.D. (2001). Markers of joint destruction: principles, problems, and potential. *Ann Rheum Dis* 60, 545-548.

Zhang, G., Chen, S., Goldoni, S., Calder, B.W., Simpson, H.C., Owens, R.T., McQuillan, D.J., Young, M.F., Iozzo, R.V., and Birk, D.E. (2009a). Genetic evidence for the coordinated regulation of collagen fibrillogenesis in the cornea by decorin and biglycan. *J Biol Chem* 284, 8888-8897.

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

Zhang, W., Doherty, M., Peat, G., Bierma-Zeinstra, M.A., Arden, N.K., Bresnihan, B., Herrero-Beaumont, G., Kirschner, S., Leeb, B.F., Lohmander, L.S., *et al.* (2010a). EULAR evidence-based recommendations for the diagnosis of knee osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 69, 483-489.

Zhang, W., Nuki, G., Moskowitz, R.W., Abramson, S., Altman, R.D., Arden, N.K., Bierma-Zeinstra, S., Brandt, K.D., Croft, P., Doherty, M., *et al.* (2010b). OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 476-499.

BIBLIOGRAFIA

Zhang, X., Mao, Z., and Yu, C. (2004). Suppression of early experimental osteoarthritis by gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10. *J Orthop Res* 22, 742-750.