

Aus dem Institut für klinische Chemie
der Universität zu Köln
Direktor: Privatdozent Dr. med. T. Streichert

**Chondrozyten-COMP-Interaktionen im Rahmen der
Knorpeldegradation – Bedeutung für die
Knorpelhomöostase
&
Identifizierung Arthrose-assoziiierter Antikörper:
Definition einer autoimmun-Arthrose anhand neuer
serologischer Biomarker?**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Johannes Ruthard
aus Celle

promoviert am 20. Januar 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln 2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. A. R. R. Klatt
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. B. Brachvogel

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende, kumulative Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

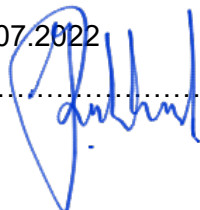
Die in dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Professor Dr. Andreas R. Klatt und den technischen Assistentinnen Frau Gabriele Hermes und Frau Gertrud Kühn von mir selbst ausgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichtete mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 25.07.2022

Unterschrift:



Danksagung

Dank gilt all jenen Menschen, die meine Neugier geweckt haben, verschiedene Ideen und Konzepte mit mir diskutierten sowie mich konstruktiv hinterfragten und auf diese Weise ihre Freude am Suchen und Finden von wissenschaftlichen als auch philosophischen Fragen und Antworten mit mir teilten. Dies gilt meiner Familie, meinen FreundInnen und meinen LehrerInnen – allen voran Professor Dr. Andreas R. Klatt, der mich an wissenschaftliches Denken und Arbeiten heranzuführte und bis hierher begleitet hat. Besonderer Dank gilt meiner Frau, die mir in der Zeit des Schreibens zur Seite stand und die mich ermutigte dranzubleiben.

Für meine Familie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	9
2. EINLEITUNG	10
2.1. Vorwort	10
2.2. Arthrose	10
2.2.1. Überblick	10
2.2.2. Epidemiologie	10
2.2.3. Ätiologie und Risikofaktoren	11
2.2.4. Pathologie	12
2.2.5. Symptome	13
2.2.6. Diagnostik	13
2.2.7. Therapie	14
2.2.8. Prognose	14
2.2.9. Biomarker	14
2.3. Extrazelluläre Knorpelmatrix	16
2.4. Cartilage oligomeric Matrix Protein (COMP)	17
2.5. Tetranectin	18
2.6. Matrilin-3	19
2.7. Kollagen II und Kollagen VI	20
2.8. Fibrillin-2	21
2.9. CLEC3A	21
2.10. TSP-4	22
2.11. Pathomechanismen und therapeutische Ansätze bei der Arthrose	22
2.12. Fragestellungen und Ziele der Arbeit	24
3. MATERIAL UND METHODEN, ERGEBNISSE - PUBLIKATIONEN	25
3.1. Publikation 1: COMP does not directly modify the expression of genes involved in cartilage homeostasis in contrast to several other cartilage matrix proteins	25

3.2. Publikation 2: Identification of antibodies against extracellular matrix proteins in human osteoarthritis	35
4. DISKUSSION	41
4.1. Chondrozyten-COMP-Interaktionen im Rahmen der Knorpeldegradation – Bedeutung für die Knorpelhomöostase	41
4.2. Schlussfolgerung aus der Studie zu Chondrozyten-COMP-Interaktionen	46
4.3. Identifizierung Arthrose-assoziiertes Antikörper: Definition einer autoimmun-Arthrose anhand neuer serologischer Biomarker?	47
4.4. Schlussfolgerung aus der Studie zur Identifizierung Arthrose-assoziiertes Antikörper	53
5. LITERATURVERZEICHNIS	54
ANHANG 1	72

Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
ADAMTS	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
ALK	Activin Receptor like Kinase
BMP	Bone morphogenetic Protein
COMP	Cartilage oligomeric Matrix Protein
CRD	Kohlenhydratbindende Domäne
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CTX-II	C-terminal-quervernetztes-Kollagen-II-Fragment
DAMP	Damage associated molecular Pattern
DIP	Distales Interphalangealgelenk/Fingerendgelenk
EBNA	Ebstein-Barr-Nukleäres-Antigen
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
IL	Interleukin
MAP	Mitogen-aktivierte-Proteine
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
NTX-I	N-terminales Telopeptid aus Kollagen I
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHC	Primäre humane Chondrozyten
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RA	Rheumatoide Arthritis

RGD	Aminosäuresequenz aus Arginin (R), Glycin (G) und Asparaginsäure (D), Integrin-bindende Domäne
RUNX	Runt related Transcription Factor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Smad	Signalprotein aus der TGF- β Signaltransduktion
SNRI	Selektiver-Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitor
TEP	Totalendoprothese
TGF- β	Transforming growth factor β
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
t-PA	Gewebsplasminogenaktivator (tissue Plasminogenactivator)
u-PA	Urokinase

1. Zusammenfassung

Der erste Teil meiner Dissertation beschäftigt sich mit dem Einfluss von Cartilage-Oligomeric-Matrix-Protein (COMP) auf die differentielle Genexpression von humanen Chondrozyten. Hierfür wurden humane Chondrozyten und Knorpelimplantate mit COMP und/oder TGF- β stimuliert und die Expression proinflammatorischer Zytokine und MMPs (IL-6, MMP1, MMP13) sowie die Induktion von Wachstumsfaktoren (TGF- β und BMP-2) und extrazellulären Matrixmolekülen (Kollagen I, Kollagen II, Kollagen X) untersucht. Die untersuchten Proteine spielen eine Rolle in der Pathophysiologie der Arthrose und in der Chondrozytendifferenzierung. COMP allein nahm keinen unmittelbaren Einfluss auf die differentielle Genexpression von Chondrozyten. Die Kostimulation von Chondrozyten mit COMP und TGF- β führte jedoch zu einer stärkeren IL-6 Freisetzung als die Stimulation mit TGF- β allein. Somit konnte eine kooperative Wirkung von COMP und TGF- β an humanen Chondrozyten nachgewiesen werden. Wird die veränderte TGF- β -Signaltransduktion bei einer Arthrose berücksichtigt, könnte COMP somit zu einer Verstärkung der TGF- β -abhängigen Prozesse im Rahmen einer Arthrose führen.

Der zweite Teil meiner Dissertation beschäftigt sich mit der Frage nach der Existenz von Arthrose-assoziierten Antikörpern. Insbesondere wurde untersucht, ob Antikörper gegen die extrazellulären Matrixproteine Matrilin-3, Kollagen II, Kollagen VI, Fibrillin-2, CLEC3A, Tetranectin, Thrombospondin-4 und COMP im Rahmen einer Arthrose nachgewiesen werden können. Für den Antikörpernachweis wurden die oben genannten Proteine mittels Immunoblot unter der Verwendung von PatientInnenserum als Erstantikörper und Antihumanglobulin als Zweitantikörper untersucht. Insgesamt fand sich eine erhöhte Prävalenz von Autoantikörpern gegen TSP-4, COMP und CLEC3A im Serum von PatientInnen mit einer Arthrose im Vergleich zu gesunden ProbandInnen. Somit könnte der Nachweis von Autoantikörpern gegen TSP-4, COMP und CLEC3A die Diagnose einer Arthrose unterstützen und einen autoimmunen bzw. Autoantikörper-assoziierten Arthrosesubtyp identifizieren. Bei PatientInnen mit einer autoimmunen Arthrose könnten immunmodulatorische/immunsuppressive Therapien erfolgreich sein.

2. Einleitung

2.1. Vorwort

Die hier vorliegende Dissertation gliedert sich entsprechend der ihr zugrundeliegenden Projekte in zwei Teile. Im ersten Teil wurde die biologische Wirkung von Cartilage oligomeric Matrix Protein (COMP) an primären humanen Chondrozyten (PHC) untersucht. Die Ergebnisse der Studie wurde im Journal Connective Tissue Research publiziert ¹. Gefördert wurde die Studie durch ein Stipendium des Köln Fortune Programms (Begabtenförderung für Studentinnen und Studenten der Medizin und Zahnmedizin; Nr. 189/2012). Im zweiten Teil wurde die Hypothese überprüft, ob im Serum von PatientInnen mit einer Arthrose Autoantikörper gegen Proteine der extrazellulären Knorpelmatrix nachweisbar sind. Die Ergebnisse der Studie wurden im Journal Biochemical and Biophysical Research Communications publiziert ² und zum Patent angemeldet (Europäische Patentanmeldung EP 17209795.8; Nachweis von Autoantikörpern zur Diagnose von degenerativen Erkrankungen des Skelettsystems).

2.2. Arthrose

2.2.1. Überblick

Die Arthrose ist eine degenerative Erkrankung der Gelenke. Ist der Krankheitsprozess erst einmal angestoßen, schreitet er so lange fort, bis der gelenkbildende Knorpel komplett aufgebraucht ist. Die Ätiologie der Arthrose ist nicht abschließend geklärt, jedoch sind diverse Risikofaktoren für die Entstehung einer Arthrose bekannt. Grundsätzlich kann die Arthrose jedes Gelenk befallen, sie ist jedoch besonders häufig in den distalen Interphalangealgelenken (DIPs) sowie im Knie und im Hüftgelenk anzutreffen. Zentrales Symptom ist dabei der Gelenkschmerz. Ein Teil der PatientInnen zeigt einen asymptomatischen Verlauf. Kommt es im Krankheitsverlauf zur Entzündung des Gelenks, wird von einer aktivierten Arthrose gesprochen. Die Diagnose wird überwiegend durch klinische Zeichen und eine Bildgebung gesichert. Zur Behandlung stehen konservative und operative Methoden zur Verfügung. Diagnostische und therapeutische Arthrosebiomarker konnten sich in der medizinischen Alltagspraxis bislang nicht durchsetzen und verlaufsmodifizierende medikamentöse Therapien der Arthrose fehlen bisher.

2.2.2. Epidemiologie

Die Arthrose ist eine der häufigsten altersassoziierten Erkrankungen, wobei Frauen häufiger betroffen sind als Männer. Je nach Krankheitsdefinition, Alter, Geschlecht und geographischer Lage gibt es deutliche Unterschiede in den Krankheitsprävalenzen ³. Radiologisch findet sich bei 40 % der Frauen im Alter von 50 bis 54 Jahren eine Arthrose in den DIPs, bei ca. 15 % in den Kniegelenken und bei 2 – 3 % in den Hüftgelenken ⁴. Im Alter von 70 bis 74 Jahren steigen

die Prävalenzen einer Arthrose bei Frauen in den DIPs auf 75 %, in den Knien auf 35 – 40 % und in den Hüften auf 10 – 15 % an ⁴. Männer zeigen im Alter von 50 bis 54 Jahren zu 25 % eine Arthrose in den DIPs, zu 10 – 15 % in den Knien und zu ca. 2 % in den Hüften ⁴. Im Alter von 70 bis 74 Jahren steigen die Prävalenzen einer Arthrose bei Männern in den DIPs auf 60 %, in den Knien auf 20 – 25 % und in den Hüften auf 5 – 10 % an ⁴. Die mit Abstand häufigste Manifestationsform einer Arthrose zeigt sich in Form von Bandscheibendegeneration und Intervertebralgelenksarthrose. Die Prävalenz der Intervertebralgelenksarthrose liegt für Frauen mit 75 Jahren bei ca. 25 – 30 % und bei Männern im gleichen Alter bei ca. 35 – 40 % ⁴. Bis zum 80. Lebensjahr haben ca. 85 % der Bevölkerung Bandscheibendegenerationen an der Halswirbelsäule und 65 – 70 % der Frauen und Männer zeigen degenerative Bandscheibenveränderungen an der Lendenwirbelsäule ⁴. Die hier zitierten Daten wurden der niederländischen Epidemiology of Osteoarthritis: Zoetermeer (EPOZ) Studie entnommen ⁴. Die zitierten, epidemiologischen Daten stammen somit aus einem westeuropäischen Land. Die höchsten Krankheitsprävalenzen finden sich bei einer röntgenbasierten Krankheitsdefinition der Arthrose ^{3,5}. Deutlich geringere Prävalenzen einer Arthrose finden sich, wenn eine rein symptombezogene Krankheitsdefinition gefordert wird ⁵. Häufig kommt es im Verlauf einer Arthrose zur stetigen Abnahme der Mobilität der PatientInnen. Durch die Kombination von zunehmender Immobilität und Alter stellt die Arthrose somit einen starken indirekten kardiovaskulären Risikofaktor dar ⁶. Die mit dem Alter steigende Inzidenz und Prävalenz einer Arthrose und die damit verbundenen Arbeitsausfälle, Berufsunfähigkeit sowie die krankheitsassoziierten Behandlungskosten und Belastungen für das Gesundheitssystem erklären die hohe sozioökonomische Bedeutung der Arthrose für die Gesellschaft in Deutschland ⁷.

2.2.3. Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie der Arthrose ist bis heute nicht abschließend geklärt. Grundsätzlich wird zwischen einer primären (idiopathischen) und einer sekundären (auf Grund von krankheitsauslösenden Risikofaktoren beruhenden) Arthrose unterschieden ⁸. In der Fachliteratur werden insbesondere genetischen Faktoren eine Schlüsselrolle in der Ätiologie sowohl primärer als auch sekundärer Arthrosen zugeschrieben ⁹. Der Ausbruch einer Arthrose hängt jedoch von weiteren Umweltfaktoren sowie von mechanischen und metabolisch-biochemischen Einflüssen ab ⁹. Zu den Risikofaktoren für eine Arthrose gehören das Alter ¹⁰⁻¹², das (weibliche) Geschlecht ¹², Übergewicht ^{11,13}, Achsfehlstellungen der gelenkbildenden Knochen ¹⁴, Gelenktraumata ^{15,16}, eine beruflich bedingte Überlastung der Gelenke (kniende Tätigkeiten) ¹⁷, metabolische und nutritive Faktoren (Gicht, Diabetes, Vitamin C/D Spiegel) ¹⁸⁻²² und eine systemische Entzündung im Sinne einer erhöhten Konzentration des C-reaktiven Protein (CRP) ²³.

2.2.4. Pathologie

Im Verlauf einer Arthrose kommt es zu typischen Veränderungen an den gelenkbildenden Strukturen. Die Knorpelschicht wird immer dünner ^{24,25} bis im Endstadium nur noch offener Knochen als Gelenkoberfläche vorliegt ²⁵. Es kommt zu einer meist milden Synovialitis, einer Kapselfibrose ²⁶ und zu sklerotischen Veränderungen des subchondralen Knochens ²⁷. In späten Stadien finden sich Osteophyten an den Gelenkrändern ²⁸.

Histopathologisch kommt es im Verlauf einer Arthrose zunächst zum Verlust der wasserbindenden Proteoglykane, insbesondere von Aggrecan ²⁵. Durch den Verlust von Aggrecan sinkt der Wassergehalt des Knorpels, was zu einem Substanzverlust und zu einer Demaskierung der Kollagenfasern führt ²⁵. Die Synovialflüssigkeit verändert ihre viskoelastischen Eigenschaften, was zu einem verstärkten Scherstress an der Knorpeloberfläche führt ²⁹⁻³². In der Folge beginnt eine mechanische und enzymatische Abtragung der superfiziellen Kollagenfasern, es bilden sich Fissuren und tiefe Längsrisse im Knorpel, die sogenannte Fibrillierung ²⁵. Durch den Abbau des Kollagen-II-Grundgerüsts kommt es zu einem irreversiblen Höhenverlust der Knorpelschicht. Die Knorpelzellen zeigen nun auf gesamter Höhe des Knorpels eine ausgeprägte Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Enzymen vom A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs (ADAMTS) Typ ^{33,34}. Dies stellt neben der mechanischen Überbelastung des Knorpels die biochemische Grundlage des erhöhten Knorpelkatabolismus dar. Im Endstadium zeigen Chondrozytencluster im fast vollständig aufgebrauchten Knorpel eine hohe Expression von knorpelabbauenden Enzymen ³⁵. Im subchondralen Knochen zeigt sich histopathologisch im Verlauf einer Arthrose eine auch im Röntgen zu detektierende subchondrale Sklerose ^{36,37}. Diese ist gekennzeichnet durch eine Knochenfibrose und einen verstärkten Umsatz des Knochengewebes mit Ersatz durch minderwertigen, mineralisierten Knochen ³⁸. Die mechanische Überlastung des Knochens durch Verlust an stoßdämpfendem Knorpel führt zu Nekrosen des Knochengewebes und durch den Abtrag dieser Nekrosen entstehen Hohlräume im Knochen ³⁹. Zerbricht die Knochendeckplatte über einer solchen Abräumhöhle, entsteht eine direkte Verbindung zwischen dem Markraum des Knochens und der Gelenkhöhle, eine sogenannte Geröllzyste ^{39,40}. Der Nachweis von Geröllzysten bei PatientInnen mit einer Arthrose wird mit einer beschleunigten Progression, stärkerer Schmerzsymptomatik und einer früheren Notwendigkeit für einen chirurgischen Gelenkersatz (Endoprothesen) assoziiert ⁴¹. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass eine Synovialitis mit Invasion mononukleärer Zellen in die Synovialmembran einen wichtigen pathophysiologischen Aspekt der Arthrose darstellt ⁴². Der Nachweis einer Synovialitis mittels Magnetresonanztomographie (MRT) wird als frühes Zeichen einer Arthrose gesehen und stellt ein hohes Risiko für ihre Progression dar ⁴³.

2.2.5. Symptome

Das zentrale Symptom einer Arthrose ist der Gelenkschmerz bzw. der gelenknahe Schmerz. Als Leitsymptome einer frühen Arthrose gelten der Anlaufschmerz, der Belastungsschmerz, der Ermüdungsschmerz, der Endphasenschmerz (Schmerzen in Extrempositionen der Gelenke) und die Schmerzausstrahlung in proximal oder distal gelegene Körperstrukturen⁴⁴. Die Spätsymptome einer Arthrose sind der Dauer- und der Nachtschmerz sowie der Bewegungsverlust beziehungsweise die Steifheit im betroffenen Gelenk⁴⁴. Durch eine Schonhaltung in einem betroffenen Gelenk kommt es typischerweise in weiter proximal oder distal gelegenen Gelenken, die funktional von der Schonhaltung betroffen sind (relative Überbelastung), zu einer Schmerzwanderung⁴⁵. Kommt es im Rahmen einer Arthrose zu einer akuten Entzündung des betroffenen Gelenks mit akuter Schmerzzunahme, Rötung, Schwellung, Überwärmung und akuter Bewegungseinschränkung, wird von einer aktivierten Arthrose gesprochen⁴⁶⁻⁴⁹.

2.2.6. Diagnostik

Die Diagnose einer Arthrose wird in erster Linie anhand der Anamnese, der Symptome und der körperlichen Untersuchung der PatientInnen gestellt⁴⁵. Gesichert werden kann die Diagnose mittels bildgebender Verfahren wie Röntgen, Computertomographie (CT) und MRT⁵⁰⁻⁵³. Eine Ultraschalluntersuchung der Gelenke erlaubt eine Beurteilung von Gelenkergüssen, den Nachweis einer Synovialitis, von Neovaskularisationen und einer Osteophyten-Bildung⁵⁴⁻⁵⁶. Eine durch Ultraschall gesicherte Synovialitis ist darüber hinaus ein positiver Prädiktor für die Progression einer Polyarthrose⁵⁷. Labormedizinisch konnten sich bisher keine diagnostischen Arthrosebiomarker in der Alltagspraxis durchsetzen, dennoch hilft das Labor beim Ausschluss von Differentialdiagnosen^{52,53}.

Im Röntgenbild lässt sich eine Arthrose anhand des Kellgren-Lawrence-Scores in vier Schweregrade einteilen^{58,59}. Diese sind abhängig vom Ausmaß der im Röntgenbild sichtbaren arthrotischen Veränderungen am Gelenk. Beurteilt werden die subchondrale Sklerose, die Kontur der Gelenkflächen, die Gelenkspaltverschmälerung, die Osteophytenbildung sowie Geröllzysten und Gelenkdeformitäten^{58,59}. Erschwerend für die Diagnostik ist, dass in der frühen Arthrose das Röntgenbild unauffällig imponieren kann⁶⁰. Umgekehrt können PatientInnen mit deutlichen arthrosetypischen Veränderungen im Röntgenbild asymptomatisch sein^{61,62}. Unter der strikten Einhaltung der American-College-of-Rheumatology (ACR)-Kriterien für die Diagnose einer Arthrose kann die Prävalenz in frühen, ACR-negativen Stadien unterschätzt werden⁶³. Inzwischen gibt es Hinweise, dass sich diese diagnostische Lücke mit Hilfe des MRT schließen lassen könnte. Mittels MRT (T2 und T1 ρ Relaxation) ließen sich bereits präklinische, asymptomatische PatientInnen von gelenkgesunden PatientInnen unterscheiden⁶⁴ und auch frühe Arthrostadien erkennen⁵¹.

2.2.7. Therapie

Für die Behandlung einer Arthrose stehen zunächst konservative Therapieansätze im Vordergrund ^{52,53,65}. Die konservative Therapie hat das Ziel, Schmerzen zu kontrollieren, die Risikofaktoren einer Arthrose zu reduzieren und mittels funktioneller Trainingstherapie den Bewegungsapparat so zu unterstützen, dass die Mobilität einer an-einer-Arthrose erkrankten Person möglichst lange erhalten werden kann ^{52,53,65,66}. Konkret bedeutet dies in den meisten Fällen eine medikamentöse Schmerztherapie mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), Gewichtsreduktion, eine Versorgung mit orthopädischen Schuheinlagen, gezielter Muskelaufbau der gelenkstabilisierenden Muskelgruppen, Bewegungstherapie und Krankengymnastik ^{52,53,65,66}. Gelenkerhaltende Operationen können in bestimmten Fällen, wie unter anderem bei einem Meniskusriss, eine Rolle spielen ⁵³. In den letzten Jahren spielen internetbasierte, PatientInnen-Selbstmanagement-Programme (e-Health) sowohl in der Prävention als auch in der Therapie einer Arthrose eine immer größere Rolle ⁶⁷. Kann durch die konservative Therapie keine ausreichende Symptomkontrolle erreicht werden, folgt als Ultima Ratio der operative Gelenkersatz durch Teil- oder Totalendoprothesen (TEP) ^{52,53,65,66}.

2.2.8. Prognose

Die Prognose einer Arthrose hängt vom Vorliegen von Risikofaktoren und genetischen Faktoren ab. Insgesamt werden genetischen Faktoren ca. 50 % der Manifestationswahrscheinlichkeit einer Arthrose zugeschrieben ⁶⁸. Wichtige Faktoren für eine beschleunigte Progression und somit für eine schlechtere Prognose sind die Schmerzintensität, eine positive Familienanamnese, Übergewicht, die initiale Gelenkspaltverschmälerung, intraartikuläre Kortison-Injektionen, Gelenkfehlstellungen und der röntgenologische Arthrosenachweis im Nachbargelenk ⁶⁹. Den Risikofaktoren Übergewicht, strukturelle Knorpelschäden (Traumata) und Bewegungsmangel wird hingegen eine größere Bedeutung für die Inzidenz der Kniegelenksarthrose zugeschrieben als für ihre Progression ⁷⁰. In Mausmodellen konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Fettgewebe einen direkten Einfluss auf die Empfänglichkeit für eine Arthrose hat und dass es die mit einer Arthrose einhergehenden systemischen und gelenkgebundenen Entzündungsreaktionen reguliert ⁷¹. Der größte Teil der PatientInnen mit einer Arthrose zeigt einen stabilen oder nur mild-progredienten Verlauf ⁶⁹. Es gibt jedoch auch Formen der Arthrose mit einer beschleunigten Progression, einer stärkeren Schmerzsymptomatik und mit einer ausgeprägten entzündlichen Komponente ⁶⁹.

2.2.9. Biomarker

Eine Arthrose zeigt in aller Regel einen chronischen Verlauf über mehrere Jahrzehnte. Röntgenuntersuchungen (anterior-posteriorer Strahlengang, stehend) sind mit einer hohen Messunsicherheit bezüglich der tatsächlichen Verschmälerung des Gelenkspaltes als Grad

der Krankheitsprogression verbunden ^{72,73}. Diese Messunsicherheit bei der Progressionsbeurteilung und die langen Krankheitsverläufe einer Arthrose machen sehr hohe Fallzahlen und Untersuchungszeiträume für Studien zu verlaufsmodifizierenden Therapien notwendig. Daher erscheinen biochemische oder hochauflösende, bildmorphologische Biomarker essenziell für die Entwicklung und Identifizierung Krankheitsverlauf-modifizierender-Arthrosemedikamente ^{74,75}, wobei anzumerken ist, dass biochemische Biomarker deutlich kostengünstiger und weniger zeitintensiv in ihrer Anwendung sind als bildmorphologische Biomarker auf MRT-Basis.

Biomarker werden definiert als objektive und quantifizierbare Eigenschaften (unter anderem Proteine, RNA, DNA, bildmorphologische Marker), für die gezeigt werden kann, dass sie natürliche und pathologische Abläufe oder eine therapeutische Intervention in ihrer Dynamik widerspiegeln können ^{76,77}. Die große Mehrzahl der in der Forschung erprobten Biomarker für eine Arthrose leiten sich aus der Pathophysiologie der Arthrose ab ⁷⁸. Kommt es zum Abbau von Knorpel oder subchondralem Knochen und zu einer Entzündung im Gelenk, werden die an den genannten Prozessen beteiligten Biomoleküle über die Zeit in die Synovia und teilweise in das Blut freigesetzt. Darüber hinaus konnten in den letzten Jahren durch spezielle MRT-Untersuchungen einige bildmorphologische Arthrosemiarker identifiziert werden ^{79,80}. Knorpel und Knochen bestehen unter anderem aus sehr vielen unterschiedlichen Proteinen, von denen viele als mögliche Biomarker in Frage kommen ⁷⁸. Um die wissenschaftliche Kommunikation und die Entwicklung von Arthrosemiarkern zu erleichtern, wurde eine Systematik für die Arthrosemiarker geschaffen ⁸¹. Der ideale Arthrosemiarker wäre in der Lage, spezifisch zwischen an-einer-Arthrose und nicht-an-einer-Arthrose erkrankten Personen zu unterscheiden und wäre bereits in einem sehr frühen Arthrosemiastadium nachweisbar (diagnostischer Biomarker) ⁸¹. Die Dynamik eines idealen Arthrosemiarkers würde darüber hinaus Aussagen zur Prognose erlauben (prognostischer Biomarker) ⁸¹, die Höhe seiner Konzentration würde positiv mit dem Arthrosemiastadium korrelieren (Burden-of-Disease-Biomarker) ⁸¹ und er würde sensibel auf effektive Therapien (Efficacy-of-Intervention-Biomarker) reagieren ⁸¹. Darüber hinaus wurde der Begriff des investigativen Biomarkers geprägt, um zu verdeutlichen, dass für einen potentiellen Biomarker weitere wissenschaftliche Untersuchungen zur Sicherung seiner Anwendbarkeit gemacht werden müssen ⁸¹. Zu den am besten charakterisierten Arthrosemiarkern gehören unter anderem COMP und C-terminal-quervernetztes-Kollagen-II-Fragment (CTX-II) ^{78,82}. Im Rahmen einer Metaanalyse bei der COMP im Serum von PatientInnen mit einer Gonarthrose und einem Kellgren-Lawrence-Score von ≥ 2 untersucht wurde, konnte nachgewiesen werden, dass die Bestimmung von COMP PatientInnen mit einer Gonarthrose von kniegesunden Personen unterscheiden kann ⁸³. Bei PatientInnen mit einer Gonarthrose fand sich darüber hinaus eine positive Korrelation zwischen erhöhten CRP und COMP Konzentrationen im Serum und der Inzidenz und

Progression der Arthrose ⁸⁴. Weiter zeigten PatientInnen mit einer verstärkten Schmerzsymptomatik im Rahmen einer Arthrose höhere COMP-Serumspiegel als PatientInnen mit keiner oder milder Schmerzsymptomatik ⁸⁴. Der Nachweis von CTX-II (im Urin) erlaubte ebenfalls eine Unterscheidung von kniegesunden Personen und PatientInnen mit einer Gonarthrose, sofern die ArthrosepatientInnen im Röntgen einen Kellgren-Lawrence-Score von 3 oder 4 zeigten ^{85,86}. Die Bestimmung von COMP und CTX-II zur Diagnose einer Arthrose übersieht folglich frühe Stadien einer Gonarthrose (Kellgren-Lawrence-Score ≤ 2). Das Problem, frühe Arthrostadien nicht zu detektieren, scheint auf viele biochemische Arthrosebiomarker zuzutreffen ⁸⁷. In einer Metaanalyse zu Arthrosebiomarkern fanden sich Hinweise, dass N-terminales Telopeptid aus Kollagen I (NTX-I) möglicherweise zur Diagnose einer frühen Arthrose verwendet werden könnte ⁸⁷. Einschränkend fordern die AutorInnen eine Bestätigung dieses Ergebnisses durch eine größere, prospektive Untersuchung und sie geben keine klare Definition für eine frühe Arthrose ⁸⁷. Die eingeschlossenen Studien haben darüber hinaus unterschiedliche Definitionen für die Arthrostadien verwendet, von denen die meisten einen niedrigen Kellgren-Lawrence-Score (≤ 2) zum Nachweis einer frühen Arthrose fordern ⁸⁷. Finden sich im Röntgen jedoch sichtbare Arthrosezeichen, liegt unter pathophysiologischen Gesichtspunkten bereits ein fortgeschrittenes Arthrostadium vor ^{88,89}. Somit ist die Verwendung des Begriffs der frühen Arthrose an dieser Stelle kritisch zu sehen. Eine mögliche Erklärung für die geringe diagnostische Aussagekraft von biochemischen Arthrosebiomarkern in frühen Arthrostadien könnte die renale Elimination kleiner Proteinfragmente (Degradationsprodukte) bei initial geringer Dynamik des Knorpeldegradationsprozesses sein. Sollte sich jedoch ein indirekter Nachweis der Knorpeldegradationsprodukte anhand von Antikörpern gegen diese bewerkstelligen lassen, könnte so das Problem der niedrigen Konzentrationen und der schnellen Elimination gelöst werden.

2.3. Extrazelluläre Knorpelmatrix

Das Knorpelgewebe besteht aus Chondrozyten und der von ihnen gebildeten und sie im Volumen weit übertreffenden extrazellulären Matrix ⁹⁰. Im Rahmen der Knorpelreifung verlieren die aus mesenchymalen Stammzellen hervorgegangenen Chondrozyten weitestgehend ihre Teilungsfähigkeit und steuern den Aufbau, die Erhaltung und auch die Reparatur der extrazellulären Knorpelmatrix ⁹⁰. Im gesunden Knorpel besteht ein Gleichgewicht zwischen der Synthese der von den reifen Chondrozyten gebildeten extrazellulären Knorpelmatrix und ihrem Abbau ⁹¹. Die extrazelluläre Knorpelmatrix kann untergliedert werden in Strukturproteine (Kollagene) und wasserbindende Proteine (Proteoglykane) ^{90,92}. Das wichtigste Strukturprotein des Knorpels ist Kollagen II (ca. 90 % der Kollagenmasse) ^{90,93}, welches die Matrix von der Knorpelbasis hin zur Synovia in Fibrillen arkadenförmig durchzieht und dem Knorpel seine Form, Zug- und Druckfestigkeit gibt ^{90,94}. Hauptvertreter der wasserbindenden Proteoglykane ist Aggrecan, das durch seine geladenen Glukosaminoglykan-Seitenketten eine riesige

Hydrathülle im Knorpel festhält⁹⁵. Unter Druckeinwirkung verliert der Knorpel Wasser an die Synovia und nimmt es nach Druckentlastung wieder auf⁹⁵. Durch diesen Mechanismus erhält der Knorpel seine Eigenschaft als dynamischer Stoßdämpfer. Darüber hinaus enthält die extrazelluläre Matrix des Knorpels diverse glykosylierte Matrixproteine, die unter anderem fibrillenassoziiert oder gebunden an die Proteoglykane vorkommen.

2.4. Cartilage oligomeric Matrix Protein (COMP)

COMP ist ein nicht-kollagenes Glykoprotein aus der Gruppe der Metalloproteine mit einem Molekulargewicht von 524 Kilodalton (kDa)⁹⁶, das hauptsächlich im Knorpel sowie in Sehnen, Bändern und in der Synovia gefunden wird^{97,98}. Als Homopentamer setzt es sich aus fünf identischen Monomeren zusammen⁹⁶. Jedes Monomer besteht aus einer N-terminalen α -Helix (Oligomerisierungsdomäne), vier epidermalen- Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF)-ähnlichen Domänen, sieben Thrombospondin-Typ-3-Repeats und einer C-terminalen Thrombospondin-C-Domäne⁹⁶. Das ausgereifte, pentamerere COMP wird über Disulfidbindungen in seiner N-terminalen α -Helix stabilisiert⁹⁹. COMP beschleunigt die Fibrillogenese von Kollagen II und reguliert den Kollagenfibrillen-Durchmesser^{100,101}. Es bindet an eine Vielzahl von Kollagenen (I, II, IX, XII und XIV)^{102,103} und interagiert mit mehreren anderen nicht-kollagenen Knorpelmatrixproteinen wie Aggrecan¹⁰⁴, Matrilinen¹⁰⁵ und Fibronectin¹⁰⁶. Mutationen im COMP-Gen werden mit Krankheiten wie multipler epiphysärer Dysplasie (MED) und Pseudoachondroplasie (PSACH) in Verbindung gebracht¹⁰⁷. Dabei handelt es sich um Erkrankungen, die mit einer vorzeitigen Arthrose einhergehen¹⁰⁷. Erhöhte Spiegel von COMP und COMP-Fragmenten wurden im Knorpel, in der Synovia und im Serum von PatientInnen mit traumatisch geschädigtem Knorpel, einer Arthrose und einer rheumatoiden Arthritis (RA) nachgewiesen¹⁰⁸⁻¹¹¹. COMP zählt zu den am besten charakterisierten Biomarkern der Arthrose^{78,82-84}. COMP wird durch die knorpelabbauenden Enzyme der MMP-Familie, darunter MMP1, MMP3 und MMP9 proteolytisch prozessiert¹¹². ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, ADAMTS7 und ADAMTS12 sind ebenfalls in der Lage COMP zu schneiden¹¹³⁻¹¹⁵. Für diese Proteinase konnte gezeigt werden, dass sie eine Schlüsselrolle in der Knorpeldegradation einer Arthrose spielen^{116,117}. Darüber hinaus zeigt COMP Eigenschaften als Aktivator und Modulator des Komplementsystems¹¹⁸. Bindet COMP an C1q oder Mannose-bindendes Lektin, kommt es zur Hemmung des klassischen Komplementweges¹¹⁸. Interagiert COMP mit C3 und Properdin, kann es den alternativen Komplementweg aktivieren¹¹⁸. Weiterhin ist COMP in der Lage, über sein Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD)-Motiv an Integrine zu binden und so die Chondrozytenadhäsion zu verstärken¹¹⁹. COMP ist auch in der Lage, RGD-unabhängig mit Integrinen zu interagieren und bindet an den CD47-Rezeptor¹²⁰. Die Integrinrezeptor-vermittelte Signaltransduktion (Interleukin (IL)-6) spielt eine Rolle in der Steuerung von Entzündungsprozessen¹²¹. In den letzten Jahren wurde COMP in Zusammenhang mit einigen weiteren pathologischen

Prozessen gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass COMP auch bei fibrotischen Prozessen im Körper eine Rolle spielt. Eine erhöhte COMP-Expression wurde bei der Leber- und Lungenfibrose beschrieben wie auch bei der systemischen Sklerodermie ¹²²⁻¹²⁵. Eine erniedrigte COMP-Expression konnte in der extrazellulären Matrix des Herzmuskels im Rahmen von dilatativen Kardiomyopathien gezeigt werden ¹²⁶. Über die Eigenschaften als Biomarker für die Arthrose und die RA hinaus konnte gezeigt werden, dass COMP auch bei traumatischen Knorpelschäden ¹⁰⁸, bei der Hüftkopfnekrose ¹²⁷, beim femoroazetabulärem Impingement ¹²⁸ und beispielweise nach einem Marathon ¹²⁹ deutlich erhöhte Werte im Serum zeigt. Im Zusammenhang mit Prostata- und Brustkrebs ist eine erhöhte COMP-Gewebsexpression mit einer verstärkten Stromainvasion und einer herabgesetzten Apoptoserate der Krebszellen verbunden ¹²⁶. Vor einigen Jahren konnte für Matrilin-3 wie auch für Kollagen-II-Fragmente eine proinflammatorische Wirkung an PHC nachgewiesen werden ¹³⁰⁻¹³². Proinflammatorischen endogenen Signalproteinen oder auch Damage associated molecular Pattern (DAMP) und der von ihnen verursachten Aktivierung des angeborenen Immunsystems über Toll-like-Rezeptoren wird inzwischen eine klare Rolle in der Pathophysiologie der Arthrose eingeräumt ¹³³. Wie oben beschrieben, nimmt COMP an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen der extrazellulären Matrix teil und bindet an Integrine. Somit stellt sich die Frage, ob auch COMP wie Kollagen II und Matrilin-3 Eigenschaften eines endogenen Signalmoleküls hat und die differentielle Genexpression von Chondrozyten beeinflusst.

2.5. Tetranectin

Tetranectin ist ein Protein aus dem humanen Blutplasma und bindet über die Kringel 4-Domäne an Plasminogen. Darüber hinaus verstärkt es die Plasminogenaktivierung durch den Gewebe-Plasminogenaktivator ¹³⁴. Tetranectin besitzt eine N-terminale α -Helix und eine C-terminale kohlenhydratbindende Domäne (CRD), hat einige Kalziumbindungsstellen und bildet Homotrimere ^{135,136}. Tetranectin bindet Lipoprotein(a) ¹³⁷, wird in Thrombozyten exprimiert und zeigt eine kalziumabhängige Fibrinbindung ¹³⁸. Darüber hinaus wird Tetranectin im Endothel, im Epithel des Gastrointestinaltraktes, in Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, Granulozyten, im Muskelgewebe und in Fibroblasten exprimiert ¹³⁹. In der Embryonalentwicklung wird Tetranectin mit der Myogenese und Muskelregeneration ¹⁴⁰ als auch mit der Wundheilung in Verbindung gebracht ¹⁴¹. Beim Menschen zeigte sich die Expression von Tetranectin in stabilen atherosklerotischen Plaques erhöht ¹⁴². Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Tetranectinkonzentration im Serum negativ mit der Anzahl an atherosklerotischen Läsionen bei PatientInnen mit koronarer Herzerkrankung korreliert sowie herzgesunde PatientInnen höhere Tetranectinkonzentrationen im Serum aufwiesen ¹⁴². Weiter zeigte sich, dass erniedrigte Tetranectinkonzentrationen im Serum ein negativ-prognostischer Marker für eine Herzinsuffizienz sind ¹⁴³. Auf Vorläuferzellen des Fettgewebes

zeigt Tetranectin eine adipogene Wirkung¹⁴⁴. Für die adipogene Funktion konnte die plasminogenbindende Domäne von Tetranectin identifiziert werden¹⁴⁵. Im Rahmen maligner Tumorerkrankungen wurde eine Erhöhung von Tetranectin im Plasma von Patientinnen mit muzinösem Ovarialkarzinomen und eine Erniedrigung von Tetranectin im Plasma bei Patientinnen mit anderen malignen gynäkologischen Tumoren nachgewiesen¹⁴⁶. In einer dänischen Studie zum Ovarialkarzinom waren höhere Serumspiegel und Gewebsexpression von Tetranectin mit einem längerem Gesamtüberleben assoziiert¹⁴⁷. Der in der dänischen Studie gefundene Überlebensvorteil erhöhter Tumorgewebsexpression von Tetranectin war jedoch analytisch an die Verwendung eines polyklonalen Tetranectin-Antikörper-Assay gebunden¹⁴⁷. Die Assay auf Basis von monoklonalen Tetranectin-Antikörpern zeigten keinen Überlebensvorteil¹⁴⁷. Weiter könnte Tetranectin eine Rolle bei dem Metastasierungsprozess von Melanomen spielen¹⁴⁸. Bei PatientInnen mit einem Magenkarzinom hatte eine erhöhte Tetranectinexpression im Tumorgewebe einen negativ prognostischen Vorhersagewert¹⁴⁹.

2.6. Matrilin-3

Matrilin-3 ist ein extrazelluläres Matrixprotein aus der Proteinfamilie der Matriline und besteht aus einer positiv geladenen Domäne, einer von-Willebrand-Faktor-A (vWFA)-ähnlichen Domäne, vier EGF-Domänen und einer α -Helix¹⁵⁰. Matrilin-3 bildet Homotetramere wie auch Heterooligomere mit Matrilin-1¹⁵¹. Das Monomer hat eine molare Masse von 48,9 kDa¹⁵⁰. Im Rahmen der Embryonalentwicklung wurde Matrilin-3 insbesondere in Knorpel und Knochen nachgewiesen¹⁵¹. Eine besonders hohe Gewebsexpression von Matrilin-3 wurde im Rahmen von Wachstums- und Umbauprozessen beschrieben¹⁵¹. Im Knorpel fungieren Matrilin-3 und seine nahen Verwandten (Matrilin-1,2,4) als Bindeglied zwischen dem Kollagenetzwerk (über COMP, Kollagen-IX-abhängig) und den Proteoglykanen^{98,152,153}. COMP bindet Matrilin-3 mit hoher Affinität und Mutationen in beiden Proteinen sind ursächlich für Chondrodysplasien, die mit Kleinwuchs und vorzeitiger Arthrose einhergehen^{107,154,155}. Im Rahmen einer Arthrose zeigt sich eine mit dem Schweregrad der Schäden assoziierte gesteigerte Matrilin-3 Expression¹⁵⁶. Im Rahmen von erblicher Handarthrose (Arthrose der Fingerendgelenke) fand sich im Matrilin-3-Gen eine Mutation, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko vergesellschaftet ist¹⁵⁷. Matrilin-3 zeigt durch eine direkte Inhibition von Bone morphogenetic Protein (BMP)-2 einen antagonistischen Effekt auf die Terminaldifferenzierung von Chondrozyten¹⁵⁸. Im Gegensatz zu den proinflammatorischen Eigenschaften von Matrilin-3 (siehe Kapitel COMP) wurden für Matrilin-3 ebenfalls chondroprotektive Effekte durch eine Hochregulation von IL-1-Rezeptor-Antagonist und durch eine verstärkte Kollagen II- und Aggrecansynthese sowie eine verminderte ADAMTS5-Expression beschrieben¹⁵⁹.

2.7. Kollagen II und Kollagen VI

Kollagen II ist das Hauptkollagen des Knorpels^{90,93}. Es besteht aus drei identischen α -1-Ketten, die sich zu einer Tripelhelix, dem Prokollagen II, zusammenlagern. Das Prokollagen II oligomerisiert nach Abspaltung der N-terminalen und C-terminalen Propeptide zu Kollagen-II-Fibrillen^{93,160,161}. Die Kollagen-II-Fibrillen durchziehen die Knorpelmatrix arkadenförmig von der Knorpelbasis hin zur Synovia und verleihen dem Knorpel seine Form, Zug- und Druckfestigkeit^{90,91,94}. Mutationen im Kollagen-II-Gen werden unter dem Begriff der Typ-II-Kollagenopathien zusammengefasst und zeigen ein weites Spektrum an unterschiedlich schweren klinischen Erscheinungsbildern. Ein Erscheinungsbild einer Typ-II-Kollagenopathie kann eine frühe Arthrose sein^{162,163}.

Kollagen VI ist ein nicht fibrilläres Kollagen, das perlenkettenartige Mikrofilamente (Netze) bildet und aus sechs verschiedenen α -Ketten (α -1- & α -2-Kette, mit α -3-,4-,5- oder 6-Kette) zusammengesetzt sein kann, die sich zu einem Monomer zusammenlagern. Vier solcher Monomere bilden ein reifes Kollagen-VI-Tetramer¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Die Domänenstruktur der verschiedenen Kollagen-VI- α -Ketten ist komplex, Hauptkomponenten sind vWFA-Domänen und eine kollagene, helikale Domäne¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Kollagen VI ist beteiligt an Prozessen wie Differenzierung, Regeneration, Autophagie, Vermittlung von Zugfestigkeit, Knochendichte, Myelinisierung und Entzündung sowie Fibrose in verschiedenen Geweben¹⁶⁶. In der Muskulatur bilden Kollagen VI und Kollagen IV die kollagenen Hauptbestandteile der endomysialen, extrazellulären Matrix und verbinden so Myozyten und die extrazelluläre Muskelmatrix zu einer stabilen Funktionseinheit¹⁶⁷. Im Rahmen von Krankheitsassoziationen zeigen sich Mutationen im Kollagen VI ursächlich für einige erblich bedingte Myopathien¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. In einer Studie zum kolorektalen Karzinom konnte eine erhöhte tumorstromale Expression von Kollagen VI mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert werden¹⁷¹. Bei PatientInnen mit einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) zeigten sich Kollagen-VI-Fragmente (degradationsassoziierte Neoepitope) im Vergleich zu Lungengesunden Personen im Serum erhöht. Die Konzentration eines einzelnen Kollagen-VI-Fragmentes zeigte eine schwache, negative Korrelation zur Lungenfunktion, insgesamt fand sich jedoch keine Korrelation zwischen dem klinischen Schweregrad (Gold Klassifikation) und den Kollagen-VI-Fragment-Konzentrationen¹⁷². Im humanen Knorpel ist Kollagen VI insbesondere in der perizellulären Matrix exprimiert¹⁷³. Im Rahmen einer experimentellen Mausstudie zu einer traumainduzierten, temporo-mandibularen Gelenkarthrose zeigte sich Kollagen VI sowohl in der perizellulären als auch in der interterritorialen Knorpelmatrix stadienabhängig vermindert¹⁷⁴. Eine verminderte oder fehlende histologische Kollagen-VI-Expression wurde folglich als Arthrosebiomarker vorgeschlagen¹⁷⁴.

2.8. Fibrillin-2

Fibrillin-2 gehört mit Fibrillin-1 zu den Hauptbestandteilen extrazellulärer Mikrofibrillen in sowohl elastischen Fasersystemen (Koexpression mit Elastin) als auch in nicht elastischem Bindegewebe ¹⁷⁵. Fibrillin-2 ist ein Multidomänenprotein mit einer molekularen Masse von ca. 350 kDa und einer komplexen Anordnung verschiedener Domänen – darunter unter anderem EGF-ähnliche Domänen, Transforming-growth-factor (TGF)-ähnliche Domänen und Fibrillin-Motive ¹⁷⁵. Fibrillin-2 wird in den meisten menschlichen Organanlagen, darunter auch im embryonalen Knochen und Knorpel, exprimiert ^{175,176}. Darüber hinaus sind Fibrillin-1 und Fibrillin-2 Hauptbestandteile der perizellulären Matrix in den Sehnen ¹⁷⁷. Mutationen in den Genen für Fibrillin-1 und Fibrillin-2 verursachen das Marfansyndrom und die kongenitale kontrakturale Arachnodaktylie ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Die Stigmata beider Erkrankungen sind mit schwerwiegenden Veränderungen in der Komposition der extrazellulären Matrix des Bindegewebes vergesellschaftet ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Funktionell zeigen Fibrillin-1 und Fibrillin-2 regulatorische Funktionen in der Steuerung der TGF- β - und BMP-Aktivität und haben somit einen direkten Einfluss auf die Osteogenese ¹⁸¹. TGF- β wie auch BMPs sind die Kernfaktoren in der Terminaldifferenzierung der Chondrozyten und mit Prozessen der Arthrose assoziiert ¹⁸²⁻¹⁸⁷.

2.9. CLEC3A

Bei CLEC3A handelt es sich um ein knorpelspezifisches C-Typ-Lektin ¹⁸⁸ mit einer Expression in ruhenden, proliferierenden und hypertrophen Knorpelzonen. Es bildet überwiegend Monomere, kann jedoch auch Di- und Trimere bilden ¹⁸⁹. Das CLEC3A-Monomer mit einem Molekulargewicht von 21,9 kDa setzt sich von N-terminal nach C-terminal aus einer stark positiv geladenen Domäne, gefolgt von einer α -Helix und abgeschlossen durch eine CRD-Domäne zusammen ¹⁸⁹. Schon sehr lange ist die Verbindung zwischen Molekülen der extrazellulären Matrix und der Aktivierung des Gerinnungssystems (Kollagene, von-Willebrand-Faktor, Gewebefaktor) bekannt ¹⁹⁰⁻¹⁹². CLEC3A ist in der Lage, die tissue-Plasminogenaktivator (t-PA)-vermittelte Plasminogenaktivierung zu verstärken ¹⁸⁹. Plasmin ist in der Lage, MMPs zu aktivieren ¹⁹³. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym Urokinase (u-PA), ein Plasminogen-Aktivator, verstärkt in arthrotischem Knorpel exprimiert wird ¹⁹⁴. Kürzlich wurde eine starke antimikrobielle Wirkung bei aus CLEC3A-abgeleiteten Peptiden nachgewiesen, die sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien einschließt ¹⁹⁵. Membranständiges CLEC3A wird durch MMP-7 zwischen der CRD- und der Oligomerisierungsdomäne geschnitten, wodurch seine laminin- und fibronectinvermittelte Bindung an die extrazelluläre Matrix aufgehoben werden kann ¹⁹⁶. Interessanterweise wurde eine erhöhte Expression von CLEC3A in Tumoren mit einer schlechteren Prognose bei duktalem Mammakarzinomen beschrieben ¹⁹⁷. Bei neuroendokrinen Tumoren des Pankreas

deutete eine erhöhte Tumorexpression von CLEC3A auf ein höheres Rezidivrisiko nach Resektion hin ¹⁹⁸. Mit Hilfe eines genomweiten Expressionsprofils von arthrotischem Knorpel konnte unter anderem CLECA3A als Arthrose-assoziiertes Gen identifiziert werden ¹⁹⁹. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CLEC3A nach IL-1- β -Stimulation aus Knorpelimplantaten proteolytisch freigesetzt wird ²⁰⁰.

2.10. TSP-4

Thrombospondin-4 (TSP-4) ist ein Mitglied der Thrombospondin-Familie ²⁰¹. Das aus fünf identischen Untereinheiten aufgebaute Pentamer von TSP-4 hat ein Molekulargewicht von ca. 550 kDa und zeigt im Beisein von Kalzium eine kompaktere Konformation als ohne Kalzium sowie eine kalziumabhängige veränderte proteolytische Suszeptibilität ²⁰². TSP-4-Monomere bestehen aus einer heparinbindenden Domäne, einer α -Helix, vier Typ-2-EGF-ähnlichen-Domänen, Typ-3-kalziumbindenden-Domänen und der globulären C-terminalen Thrombospondin-Domäne ^{201,203}. TSP-4 wird in knochenbildenden Geweben (unter anderem im Knorpel) im Rahmen der Embryonalentwicklung ²⁰⁴, in Sehnen ²⁰⁵, in der quergestreifter Muskulatur ²⁰¹ und im Nervensystem ²⁰⁶ exprimiert. TSP-4 ist ein wichtiger Regulator für den Aufbau der extrazellulären Matrix verschiedener Gewebe ²⁰⁶⁻²⁰⁸. Am Herzmuskel spielt TSP-4 sowohl eine Rolle in der Regulation der hypertonieinduzierten Myokardhypertrophie als auch bei der Myokardfibrose ²⁰⁹⁻²¹³. TSP-4 spielt unter anderem eine Rolle in der Regulation von Kalziumionenkanälen bei neuropathischen Schmerzen ^{214,215} sowie bei der Regulation von axonalem Wachstum und Innervationsprozessen ^{206,216}. Darüber hinaus spielt es eine wichtige Rolle in der Regulation von Gefäßwachstum und wurde auch im Rahmen der Tumor-Neoangiogenese als wichtiger Regulationsfaktor identifiziert ^{217,218}. Dementsprechend konnte die TSP-4-Expression in einigen Tumoren als negativer prognostischer Faktor identifiziert werden ²¹⁹⁻²²². Kürzlich konnte gezeigt werden, dass TSP-4 bei einer Arthrose eine stadienabhängig-erhöhte Expression in geschädigtem Knorpel aufweist ²²³.

2.11. Pathomechanismen und therapeutische Ansätze bei der Arthrose

Vor der Entdeckung der Rolle von Entzündungsmediatoren und MMPs in der Pathophysiologie der Arthrose wurde die Arthrose lange Zeit für eine rein degenerative, verschleißdominierte Entität gehalten ²²⁴. Inzwischen wird der leichten, chronisch-anhaltenden Gelenkentzündung beziehungsweise dem niedrigschwelligen inflammatorischen Milieu eine zentrale Bedeutung in der Arthrosepathophysiologie zugeschrieben ²²⁵. Proinflammatorische Interleukine, wie IL-1, IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α , die aus Chondrozyten und eingewanderten Leukozyten freigesetzt werden ²²⁶⁻²²⁹, führen zu einer verstärkten Expression von ADAMTS4 und ADAMTS5, wodurch es zum proteolytischen Abbau von Aggrecan kommt ^{116,230-233}. Ebenso induzieren IL-1, IL-6 und TNF- α die Expression von MMPs (MMP1, MMP3, MMP 9, MMP13), die den Knorpel weiter abbauen ¹¹⁷. Die Identifizierung dieser Pathomechanismen

legte die Vermutung nahe, dass eine medikamentöse Unterbrechung der Entzündungskaskaden oder der in der Arthrose aktiven Proteinase einen modifizierenden Effekt auf den Krankheitsverlauf haben könnte^{74,234}. Diese Ansätze konnten jedoch durch Studien mit Medikamenten, die in der Behandlung der RA erfolgreich eingesetzt werden (Immunsuppressiva, Interleukin-Inhibitoren, TNF- α -Inhibitoren), nicht auf die Arthrose übertragen werden^{75,235}. Auch Behandlungsversuche mit Proteinaseinhibitoren blieben bei der Arthrose erfolglos oder zeigten sich zu nebenwirkungsreich²³⁶. Als ursächlich für die bisherigen, erfolglosen Studien für verlaufsmodifizierende Therapien bei einer Arthrose wird diskutiert, ob die Arthrose vielmehr ein Überbegriff für sehr unterschiedliche Entitäten ist und PatientInnen mit einer Arthrose besser charakterisiert werden müssten, um sie einer erfolgreichen, individualisierten, medikamentösen Therapie zuzuführen²³⁷. So wurden in den letzten Jahren mit einigem Erfolg ein immer größerer Schwerpunkt auf die Identifizierung arthrosespezifischer, transkriptomischer und proteomischer Fingerabdrücke (molekulare Endotypen) gelegt²³⁸. Eine Voraussetzung für den Erfolg von verlaufsmodifizierenden Therapien und Medikamenten im Rahmen einer Arthrose könnte darüber hinaus in der Identifizierung von frühen, präklinischen Arthrostadien liegen, die noch keine potenziell irreversiblen morphologischen Korrelate (Kellgren-Lawrence-Score ≥ 1) zeigen und somit für therapeutische Interventionen noch empfänglich sind^{88,89,239}. Inzwischen ist bekannt, dass das angeborene Immunsystem bei der Initiation und Progression der Arthrose eine Rolle spielt^{133,240}. Bei einer Synovialitis im Rahmen einer Arthrose kommt es zu einer Invasion von mononukleären Zellen in die Synovialmembran, darunter Makrophagen, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten²⁴¹⁻²⁴³. Mittlerweile festigt sich auch die Auffassung, dass eine Synovialitis bereits in der frühen Arthrose eine wichtige Rolle spielt und sie bereits in frühen Arthrostadien bildmorphologisch nachgewiesen werden kann²⁴³. Außerdem wurde beschrieben, dass antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen in der Synovia arthrotischer Gelenke aktiviert werden^{243,244}. All diese Beobachtungen von entzündlichen Veränderungen in der Arthrosepathophysiologie sowie die in das arthrotische Gelenk eingewanderten, immunologischen Zellen, die Aktivierung der angeborenen Immunität, die Knorpelmatrix-Komplement-Interaktionen und die arthrosebestimmenden Interleukine werfen die Frage auf, ob es im Rahmen einer Arthrose auch zu einer Aktivierung des erworbenen Immunsystems mit Antikörperbildung kommen könnte.

2.12. Fragestellungen und Ziele der Arbeit

In der hier vorliegenden Dissertation beschäftigt sich der erste Teil mit der Frage nach einem potenziellen Einfluss von COMP auf die differentielle Genexpression von PHC ¹. Insbesondere wurde untersucht, ob COMP an Chondrozyten die Expression proinflammatorischer Zytokine und MMPs induziert, die im Rahmen einer Arthrose eine Rolle spielen und ob COMP an der Induktion beziehungsweise an der Expression von Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixmolekülen, die für bestimmte Differenzierungswege in humanen Chondrozyten stehen, beteiligt ist.

Der zweite Teil der Dissertation beschäftigt sich mit der Frage nach der Existenz von Arthrose-assoziierten Antikörpern ². Insbesondere wurde untersucht, ob der Nachweis von Antikörpern gegen extrazelluläre Matrixproteine (darunter TSP-4, COMP und CLEC3A), die im Rahmen einer Arthrose nachgewiesen werden können, die Diagnose einer Arthrose unterstützen kann und ob der Nachweis von Arthrose-assoziierten Antikörpern einen autoimmunen Arthrosesubtyp definiert. Darüber hinaus werden mögliche therapeutische Konsequenzen eines Nachweises von Arthrose-assoziierten Antikörpern diskutiert.

3. Material und Methoden, Ergebnisse - Publikationen

- 3.1. Publikation 1: COMP does not directly modify the expression of genes involved in cartilage homeostasis in contrast to several other cartilage matrix proteins**

ORIGINAL RESEARCH

COMP does not directly modify the expression of genes involved in cartilage homeostasis in contrast to several other cartilage matrix proteins

Johannes Ruthard¹, Matthias Kamper², Jörg H. Renno¹, Gertrud Kühn¹, Ute Hillebrand¹, Stefan Höllriegel⁴, Wibke Johannis¹, Frank Zaucke^{2,3}, and Andreas R. Klatt¹

¹Institute for Clinical Chemistry, University of Cologne, Cologne, Germany, ²Center for Biochemistry, Medical Faculty, University of Cologne, Cologne, Germany, ³Cologne Center for Musculoskeletal Biomechanics, Medical Faculty, University of Cologne, Cologne, Germany, and ⁴Dreifaltigkeitskrankenhaus, Cologne, Germany

Abstract

Objective: We investigated whether COMP may modify cartilage metabolism and play a role as an endogenous disease aggravating factor in OA.

Materials and methods: Full-length and monomeric COMP was recombinantly expressed in human embryonic kidney cells and purified it via affinity chromatography. Purified COMP was used to stimulate either primary human chondrocytes or cartilage explants. Changes in the expression profiles of inflammatory genes, differentiation markers and growth factors were examined by immunoassay and by quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.

Results: Incubation of primary human chondrocytes or cartilage explants in the presence of COMP did not induce statistically significant changes in the expression of IL-6, MMP1, MMP13, collagen I, collagen II, collagen X, TGF- β 1 and BMP-2.

Conclusions: In contrast to collagen II and matrilin-3, COMP lacks the ability to trigger a proinflammatory response in chondrocytes, although it carries an RGD motif and can bind to integrins. COMP is a well-accepted biomarker for osteoarthritis but increased COMP levels do not necessarily correlate with inflammation.

Keywords

COMP, cartilage, chondrocyte, cartilage explants, matrilin, osteoarthritis, TGF- β 1

History

Received 13 January 2014

Revised 23 July 2014

Accepted 28 July 2014

Published online 27 August 2014

Introduction

Osteoarthritis (OA) is one of the most common diseases in industrialized countries. With the age of 55 years every second person has radiographic OA (1). However, the etiology of OA remains elusive. Pathobiochemically, a disbalance between cartilage degradation and production results in progressive cartilage destruction (2). Once the degenerative process is initiated the structurally inflicted cartilage is not able to cope with mechanical stress. At the molecular level cartilage degradation is driven by matrix degrading enzymes like matrix metalloproteinases (MMPs) and ADAMTSs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs). MMPs and ADAMTSs belong to the metzincin superfamily of extracellular peptidases, which are secreted in proforms having zinc bound in their catalytic center (3). Virtually all extracellular matrix molecules are among their substrates (4). MMP1 and MMP13 are upregulated in OA and both are capable of activating proMMPs by sequential proteolysis of their propeptide.

ADAMTS1, ADAMTS4 and ADAMTS5 have been identified as aggrecanases (5) and aggrecan depletion has been described as an important process preceding degradation of collagen II in OA (6). Thus, ADAMTS4 and ADAMTS5 are considered to be key enzymes in OA (7). The expression of MMPs and ADAMTSs is triggered by proinflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α). In OA, IL-1 β is responsible for elevated levels of MMP1, MMP3, MMP13 and a decrease of collagen II and aggrecan expression (8). TNF- α plays an important role in the release of IL-1 β , IL-6 and IL-8 (9), thus triggering a cascade of proinflammatory reactions in chondrocytes, as well as being a mediator for the development of neuropathic pain (10). IL-6 is also considered to be an important mediator in OA by upregulating MMP3 and MMP13 expression in chondrocytes (11).

In the past, several studies provided evidence that cartilage extracellular matrix proteins act as endogenous disease aggravation factors. It was shown that collagen II is able to induce MMP1, MMP3, MMP13, MMP14 and inflammatory cytokines like IL-6 (12). The discoidin domain receptor-2 (DDR2) was identified as the receptor being responsible for the transduction of the collagen II-mediated activation of NF- κ B and mitogen-activated protein kinases (MAP kinases)

Correspondence: Dr Andreas R. Klatt, PhD, Institut für Klinische Chemie, Universität zu Köln, Kerpener Str. 62, 50924 Köln, Germany. Tel: +49-221-478-5291. Fax: +49-221-478-5273. E-mail: andreas.klatt@uk-koeln.de

(13). Furthermore, fibronectin fragments were shown to induce MMP1 and MMP3 as well as proinflammatory cytokines like IL-1 β , TNF- α and IL-6 (14,15). Matrilin-3, a cartilage-specific cartilage matrix protein, was reported to induce MMP1, MMP3 and MMP13 expression. Further, proinflammatory cytokines, among others IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-8 as well as the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were upregulated (16). Further studies to identify the active portion of matrilin-3 revealed that the von-Willebrand-A1 (VWA1) domain is responsible for the induction of IL-6 in primary human chondrocytes (PHCs) (17). With the ability to induce the expression of proinflammatory cytokines and matrix degrading enzymes, these matrix proteins and matrix protein fragments may substantially contribute to the pathogenesis of OA.

Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is another non-collagenous glycoprotein of the extracellular matrix that is mainly found in cartilage (18), but also in tendon, synovium and ligaments. COMP forms homopentamers with a molecular weight of 524 kDa (18). Each monomer consists of an N-terminal coiled-coil domain, four epidermal growth factor (EGF)-like domains, eight thrombospondin type-3 repeats and a C-terminal thrombospondin-C domain. Mature pentameric COMP is stabilized via disulfide bonds at the end of its coiled-coil domain (19). COMP accelerates collagen fibrillogenesis and regulates fibril diameter. It binds to a variety of collagens (I, II, IX, XII and XIV) (20,21) and interacts with several other non-collagenous cartilage matrix proteins like aggrecan, matrilins and fibronectin (22–24). Mutations in the COMP gene have been linked to human diseases like multiple epiphyseal dysplasia (MED) and pseudoachondroplasia (PSACH), two conditions that are accompanied by premature OA (25,26). Elevated levels of COMP and COMP fragments were detected in cartilage, synovial fluid and serum of patients with traumatically damaged cartilage, OA and rheumatoid arthritis (RA), respectively (27–30). COMP is already used and widely accepted as a diagnostic OA marker and, interestingly, its concentration correlates with disease severity and progression (31,32). Degradation of COMP by cartilage degrading enzymes of the MMP family, including MMP1, MMP3 and MMP9 was described (33,34). ADAMTS4 is able to degrade COMP *in vitro* (35) and ADAMTS7 and ADAMTS12 are key enzymes responsible for the degradation of COMP *in vivo*. Interestingly, an increased expression of both these enzymes was reported in cartilage and synovium of patients with arthritis (36–38). Recently, a role for COMP as a modulator of the complement system was described. COMP binds to C1q and mannose-binding lectin (MBL) resulting in an inhibition of the classical pathway, but by binding C3 and properdin COMP can activate the alternative complement pathway (39). COMP carries an integrin-binding RGD motif and several potential receptors were described. COMP binds to α 5 β 1 and α V β 3 integrins which mediate chondrocyte attachment. It also interacts with α 7 β 1 integrin and in an RGD independent manner with the CD47 receptor (40–43).

In the present study, we aimed to investigate whether increased COMP levels are able to modify gene expression in cartilage. We used recombinantly expressed COMP to

stimulate either PHCs or cartilage explants and examined the expression of genes relevant for cartilage homeostasis such as cytokines, MMPs, collagens and growth factors.

Materials and methods

Cloning, expression and purification of recombinant COMP

Full-length rat COMP (flcCOMP, full-length-construct) cDNA (GenBank accession number NM_012834.1) and cDNA-encoding COMP monomers lacking the oligomerization domain (mCOMP), were cloned into the episomal N-terminally Strep II-tagged expression vector pCEP-Pu in frame with the sequence of the BM-40 signal peptide (44). The expression constructs were transfected into human embryonic kidney (HEK) 293 Epstein–Barr virus nuclear antigen (EBNA) cells with FuGENE HD Transfection Reagent (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Cells were selected with puromycin (1 μ g/ml) in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) GlutaMax (Gibco, Darmstadt, Germany) with 10% fetal calf serum (FCS) (PAN, Aidenbach, Germany), 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Darmstadt, Germany) and 1% amphotericin B (Gibco, Darmstadt, Germany). For protein production, cells were cultured in DMEM/F12 with 1% FCS, 1% penicillin/streptomycin and 1% amphotericin B. Cell culture supernatants were harvested after 3–4 days, centrifuged to remove cell debris and stored at -20°C . For purification, supernatants were filtrated (0.22 μ m) and loaded onto a streptactin column (IBA, Goettingen, Germany) according to the manufacturer's protocol.

Isolation, culture and stimulation of PHCs and human cartilage explants

Hip and knee joints were procured from OA patients undergoing artificial joint replacement surgery. For PHC isolation, OA-affected and unaffected cartilage was cut, minced and incubated sequentially with pronase (0.4% w/v; Calbiochem, Billerica, MA, 90 min) and with collagenase-P (0.025% w/v, Roche, Basel, Switzerland, 16 h) in DMEM/F12 containing 5% FCS and 50 μ g/ml gentamycin in a CO₂ incubator (5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C). Resulting chondrocyte suspensions were filtered (100 and 40 μ m), centrifuged and resuspended in DMEM/F12 containing 10% BD NU-serum (BD Biosciences, San Jose, CA) with 50 μ g/ml gentamycin. For explant preparation, cartilage was cut into pieces (2 \times 2 mm) and incubated in DMEM/F12 containing 10% BD NU-serum (BD Biosciences, San Jose, CA) with 50 μ g/ml gentamycin.

Purified COMP to be used for stimulation experiments was dialyzed against DMEM/F12 containing 50 μ g/ml gentamycin and analyzed for endotoxin contamination with the limulus amoebocyte lysate (LAL) QCL-1000 (Lonza, Basel, Switzerland) kit according to the manufacturer's instructions. Chondrocytes were seeded into 48-well (Falcon, BD Biosciences, San Jose, CA, 1×10^5 cells per well) or 6-well plates (Falcon, BD Biosciences, San Jose, CA, 1×10^6 cells per well), and explants were placed in 24-well plates (Falcon, BD Biosciences, San Jose, CA, five or six explants yielding 50–60 mg cartilage per well), and incubated with indicated

concentrations of COMP and TGF- β 1, respectively. Cells and cell culture supernatants were harvested after 24 h. As a negative control PHCs were treated with dialysis buffer (devoid of COMP; control) or DMEM/F12 containing 50 μ g/ml gentamycin (wild-type). COMP concentration was determined using the turbidimetric benzethonium chloride assay (cobas U/CSF protein protocol) in a Roche (Basel, Switzerland)/Hitachi modular analyzer.

Cartilage protein extraction

Human cartilage was cut off the articular surfaces of knee or hip joints and pulverized in liquid nitrogen. The milled cartilage was suspended in Tris-buffered saline (TBS) containing 1 M NaCl, 10 mM EDTA and 2 M urea and proteins were extracted over night at 4 °C.

Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting

Samples were separated on a 4–12% Bis–Tris gel (Invitrogen, Carlsbad, CA) and stained with Coomassie brilliant blue (Merck). For immunoblotting, the proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (0.45 μ m, Invitrogen, Carlsbad, CA). Membranes were blocked in TBS with 0.05% Tween and 5% milk powder, incubated with an affinity-purified polyclonal rabbit antibody against COMP in a dilution of 1:4000 (45) in TBS with 0.05% Tween and 5% milk powder, and finally incubated in a 1:5000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated polyclonal donkey anti-rabbit IgG antiserum (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Great Britain) in TBS with 0.05% Tween and 5% milk powder. Membranes were treated with ECL Plus according to the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Great Britain), and bands detected with specific antibodies were visualized on Hyperfilm (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, Great Britain).

Enzyme-linked immunosorbent assay

IL-6 concentrations in cell culture medium samples were determined using an IL-6 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (BD Bioscience, San Jose, CA) in accordance with the manufacturer's protocol. All values were normalized to dialysis buffer and depicted as x-fold induction.

Quantitative real-time RT-PCR

Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect mRNAs encoding MMP1, MMP13, IL-6, collagen I, collagen II, collagen X, TGF- β 1 and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) (for primers see Table 1). Total mRNA was isolated and reversely transcribed into cDNA using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. Quantitative real-time RT-PCR was performed using the LightCycler DNA Master SYBR Green I Kit, the LightCycler device and software (Roche, Basel, Switzerland). Quantitation was achieved using gene-specific standard curves and normalizing the data to GAPDH.

Table 1. Primer sequences.

Gene	Primer
BMP-2	forward 5'-AAT TCC CCG TGA CCA GAC TTT T-3'
	reverse 5'-CCC GGG GGA GCC ACA ATC-3'
collagen I	forward 5'-AGC GCT GGT TTC GAC TTC AGC TTC C-3'
	reverse 5'-CAT CGG CAG GGT CGG AGC CCT-3'
collagen II	forward 5'-CAA CAC TGC CAA CGT CCA GAT-3'
	reverse 5'-CTG CTT CGT CCA GAT AGG CAA T-3'
collagen X	forward 5'-AGG ACC ACC GGG ACC ATC AGC-3'
	reverse 5'-TCT CCC GGA AAA CCT CTA TCA CC-3'
GAPDH	forward 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'
	reverse 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'
IL-6	forward 5'-CCT TCG GTC CAG TTG CCT TCT-3'
	reverse 5'-GTT GTT TTC TGC CAG TGC CTC TTT-3'
MMP1	forward 5'-ATT CTA CTG ATA TCG GGG CTT TGA-3'
	reverse 5'-ATG TCC TTG GGG TAT CCG TGT AG-3'
MMP13	forward 5'-GCT GCC TTC CTC TTC TTG AG-3'
	reverse 5'-TGC TGC ATT CTC CTT CAG GA-3'
TGF- β 1	forward 5'-CGG AGT TGT GCG GCA GTG GTT GAG-3'
	reverse 5'-GGC GCC CGG GTT ATG CTG GTT GTA-3'

Absolute values were then normalized to the dialysis buffer resulting in relative values representing x-fold changes.

Statistical analysis

For statistical analysis of normal distribution, we used the online version of the Shapiro–Wilk test. Outlier estimation was performed by the Grubbs' outlier test. The entity “*N*” was defined as the number of patients, whereas the entity “*n*” was defined as the number of all measurements in one category (e.g. IL-6, MMP1). Analysis of differences between statistical groups was performed by analysis of variance (ANOVA) and *p* values < 0.05 were considered to be significant.

Results

Cloning, expression and purification of COMP

We recombinantly expressed N-terminally double strep-tagged full-length COMP and COMP lacking the oligomerization domain in HEK 293-EBNA cells. The expression vector includes the N-terminal signal peptide of BM40 for efficient secretion of COMP into the cell culture medium. COMP was purified out of the cell culture supernatant using a streptactin column. The purity and identity of COMP was analyzed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and immunoblot (Figure 1). N-terminal proteolytic processing of full-length COMP in a linker region between the coiled coil and the first EGF-like domain has been described earlier and leads to the formation of different oligomeric species in which one or more monomeric subunits of the pentameric COMP are cleaved off (45). Each oligomeric form that still carries at least one strep tag can be purified. In contrast, the cleaved monomers lacking the coiled-coil domain and thus not carrying the tag anymore will not bind to the column. These fragments are lost upon affinity chromatography. As expected, eluted flcCOMP appears as five bands representing monomeric to pentameric COMP. COMP lacking the oligomerization domain (mCOMP) migrates as a single band (Figure 1).

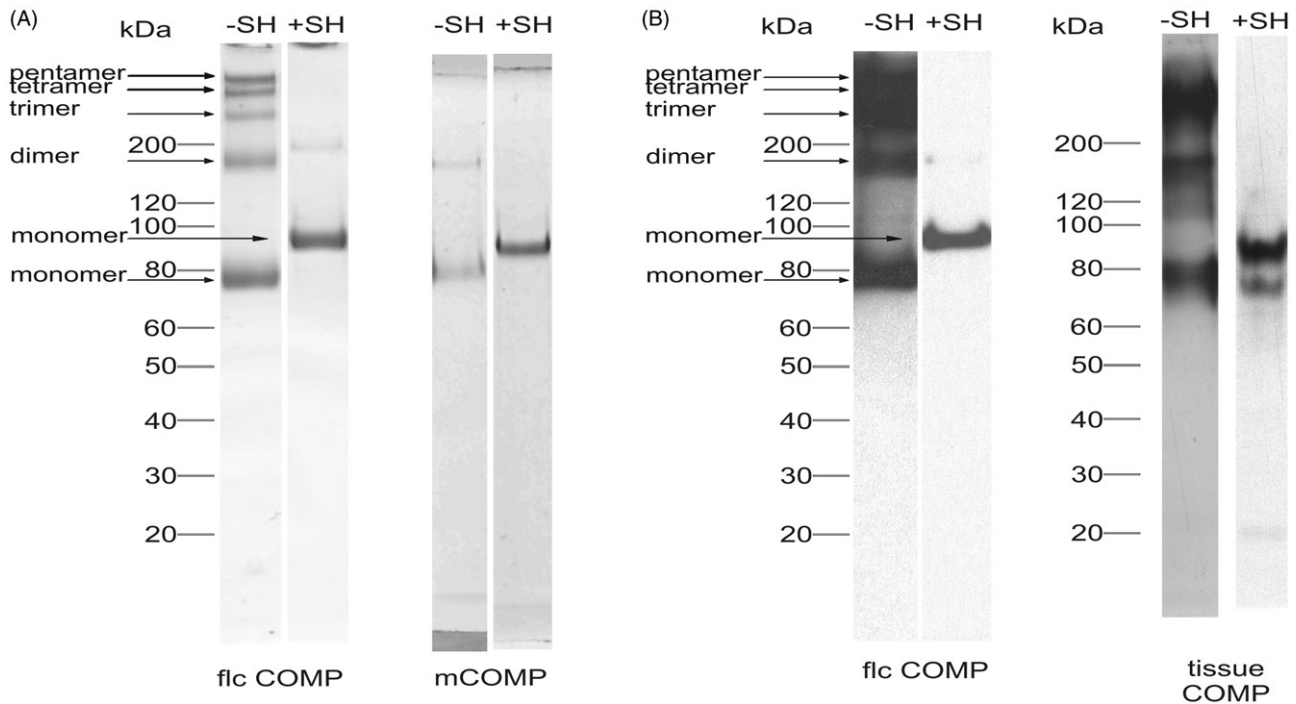


Figure 1. Recombinant, affinity-purified oligomeric COMP (flcCOMP), mCOMP and cartilage tissue extract (tissue COMP) were subjected to SDS-PAGE. The purity and the identity of recombinant COMP was determined by Coomassie staining (A) and immunoblot (B) under non-reducing (-SH) and reducing (+SH) conditions. The migration pattern of recombinant COMP was compared to cartilage tissue-extracted COMP (B).

Oligomeric COMP is stabilized by interchain disulfide bonds within the coiled-coil domain. Reduction of COMP prior to electrophoretic separation leads to a single band in the SDS-PAGE, representing a full-length monomer. Reduction of intramolecular disulfide bonds of COMP monomers leads to a slower migration in the SDS-PAGE compared to non-reduced COMP (Figure 1).

To exclude that proteolytic cleavage observed upon recombinant expression is a cell culture artifact, we compared the band patterns of recombinant and tissue-extracted COMP and detected a similar band pattern, demonstrating that proteolytic processing of COMP occurs also in tissue and that COMP in cartilage exists in different oligomeric forms, from monomer to pentamer (Figure 1).

Investigation of IL-6 release upon treatment of PHCs and cartilage explants with COMP and TGF- β 1

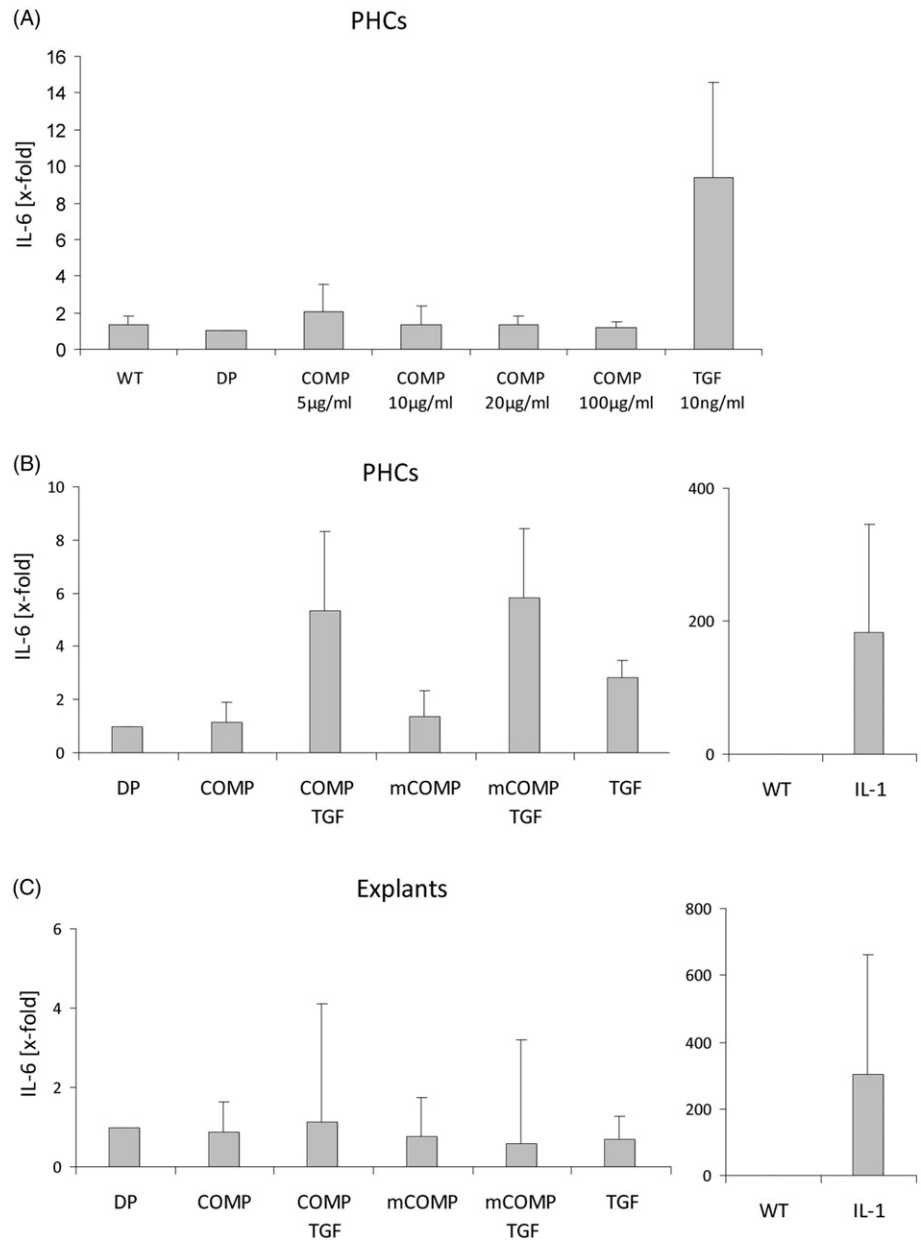
To investigate whether COMP can induce IL-6 release in PHCs, cells were incubated with COMP and TGF- β 1 in different concentrations (Figure 2). Serum concentrations of COMP between 10 and 20 μ g/ml have been reported (46). We therefore stimulated with COMP in physiologic concentrations between 5 and 20 μ g/ml but in addition also used higher concentrations up to 100 μ g/ml. After 24 h, the cell culture supernatants were harvested and analyzed using an IL-6 ELISA. The values were normalized to the dialysis buffer (for details see "Material and methods" section). Treatment of PHCs with COMP even in high concentrations did not lead to a statistically significant change in IL-6 release (ANOVA: $p=0.07$; $n=67$; $F=2.14$; power=0.77). As expected, incubation of PHCs with TGF- β 1 led to a statistically significant increase of IL-6 release (ANOVA: $p=0.02$; $F=9.12$; $n=8$; power=0.68) (47) (Figure 2).

Next, we incubated PHCs and cartilage explants in the presence of either full-length or mCOMP (20 μ g/ml) or COMP together with TGF- β 1 (10 ng/ml). Cartilage explants were included in the experiments, because these often give different results to isolated chondrocytes which points to an important regulative function of the extracellular matrix. IL-1 β was chosen as a positive control and dialysis buffer as the negative control (Figure 2). After 24 h, the cell culture supernatants were harvested and analyzed using an IL-6 ELISA. The values were normalized to the dialysis buffer. Neither treatment of PHCs nor of cartilage explants with COMP lead to a statistically significant change in IL-6 release compared to control (ANOVA: $p=0.77$; $n=12$; $F=0.26$). (ANOVA: $p=0.49$; $n=12$; $F=0.77$). COMP together with TGF- β 1 and TGF- β 1 alone gave a highly significant increase of IL-6-release from PHCs (ANOVA: $p=0.001$; $n=24$; $F=6.41$) whereas there was no change in IL-6-release from cartilage explants (ANOVA: $p=0.19$; $n=24$; $F=1.68$).

Changes in gene expression in PHCs upon treatment with COMP

We further analyzed whether COMP is able to alter the expression of genes relevant for cartilage metabolism such as IL-6 and MMPs, collagens and growth factors (Figure 3). Again, PHCs were cultured in the presence of COMP in different concentrations. After 24 h PHCs were harvested, total RNA was isolated and reversely transcribed into cDNA. The cDNA levels of IL-6, MMP1, MMP13, collagen I, collagen II, collagen X, TGF- β 1 and BMP-2 were evaluated by quantitative real-time RT-PCR. Incubation of PHCs with different COMP concentrations did not lead to a statistically significant change in expression levels for IL-6, MMP1, MMP13, collagen I, collagen II, collagen X, TGF- β 1 and

Figure 2. Effect of COMP on the IL-6 release of PHCs (A and B) and cartilage explants (C) measured by ELISA. PHCs and cartilage explants were treated with COMP and/or TGF- β 1 in the indicated concentrations, or with a combination of 20 μ g/ml COMP and 10 ng/ml TGF- β 1. IL-6 release was normalized to basal release in control cultures (DP). Bars depict relative IL-6 expression/release in the different groups. Error bars represent the standard deviation. Differences between the WT, DP and COMP groups were not statistically significant. IL-1 β and TGF- β 1 were used as a positive control (WT = wild-type PHCs; DP = PHCs treated with dialysis buffer).



BMP-2 (ANOVA: IL-6: $p=0.09$; $F=2.16$; $n=39$; power = 0.75; MMP1: $p=0.29$; $F=1.29$; $n=54$; power = 0.78; MMP13: $p=0.57$; $F=0.75$; $n=54$; power = 0.92; collagen I: $p=0.67$; $F=0.59$; $n=54$; power = 0.86; collagen II: $p=0.73$; $F=0.51$; $n=54$; power = 0.87; collagen X: $p=0.29$; $F=1.27$; $n=53$; power = 0.78; TGF- β 1: $p=0.51$; $F=0.83$; $n=56$; power = 0.82; BMP-2: $p=0.74$; $F=0.5$; $n=54$; power = 0.88). As positive control, we incubated PHCs in the presence of TGF- β 1. Incubation of PHCs with TGF- β 1 led to an increase of TGF- β 1 mRNA (ANOVA: TGF- β 1: $p=0.02$; $F=9.24$; $n=10$; power = 0.64), to an almost significant increase of IL-6 mRNA (ANOVA: IL-6: $p=0.06$; $F=6.79$; $n=6$; power = 0.72) and to a significant reduction of MMP1 mRNA (ANOVA: MMP1: $p=0.02$; $F=11.15$; $n=8$; power = 0.69).

For MMP13, collagen I, collagen II, collagen X and BMP-2 no statistically significant changes in expression levels were found after incubation of PHCs with TGF- β 1

(supplementary material) (ANOVA: MMP13: $p=0.38$; $F=0.9$; $n=8$; power = 0.60; collagen I: $p=0.27$; $F=1.48$; $n=8$; power = 0.60; collagen II: $p=0.47$; $F=0.59$; $n=8$; power = 0.62; collagen X: $p=0.36$; $F=0.94$; $n=9$; power = 0.57; BMP-2: $p=0.91$; $F=0.01$; $n=8$; power = 0.91).

Discussion

COMP and COMP fragments are found to be elevated in cartilage, synovial fluid and blood plasma of OA patients. Thus, COMP is widely utilized as an OA marker for the assessment of disease progression and severity (48). In the present study, we examined if COMP can directly and independently alter the expression of genes in chondrocytes that are involved in cartilage homeostasis and turnover.

We incubated PHCs and cartilage explants with COMP and TGF- β 1 at different concentrations and analyzed the release of IL-6 as this is a major proinflammatory cytokine

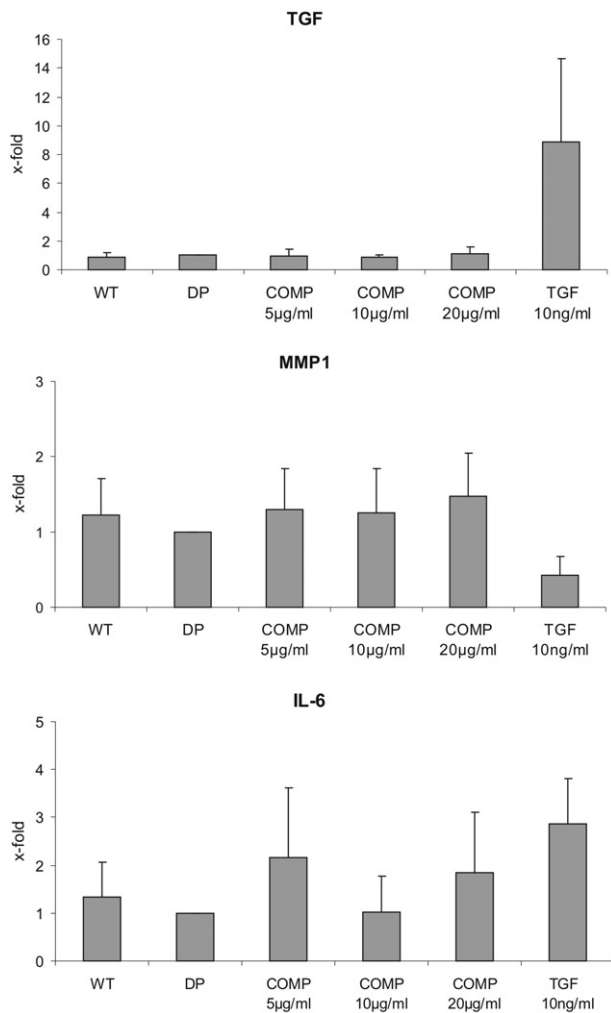


Figure 3. Effect of COMP on the TGF- β 1, MMP1 and IL-6 expression of PHCs measured by quantitative real-time RT-PCR. PHCs were treated with COMP at the indicated concentrations. Gene expression levels were standardized to the housekeeping gene (GAPDH). TGF- β 1, MMP1 and IL-6 expression was normalized to basal expression in control cultures (DP). Bars depict relative TGF- β 1, MMP1 and IL-6 expression in the different groups. Error bars represent the standard deviation. Differences between the WT, DP and COMP treatment are not statistically significant. Difference between WT/DP and TGF- β 1 is statistically significant. (WT = wild-type PHCs; DP = PHCs treated with dialysis buffer).

involved in cartilage turnover (11). For IL-6, a strong gene induction by other endogenous cartilage proteins such as fibronectin, collagen II and matrilin-3 was previously shown (12,14,15,17,49). However, the stimulation of PHCs with COMP concentrations of up to 100 μ g/ml did not induce increased IL-6 release into the medium. Increased proteolytic activity during pathologic cartilage degeneration will give rise to fragmentation of matrix proteins. Intact and fragmented COMP may induce different cellular responses. We therefore included mCOMP in our analysis but also here we could not detect any significant changes in IL-6 release. The fact that stimulation with IL-1 β or TGF- β 1 led to increased IL-6 levels (47), demonstrates that the cells are able to react if an appropriate stimulus is present.

Co-stimulation of PHCs with COMP and TGF- β 1 led to an increase of IL-6-release compared to stimulation of PHCs

with TGF- β 1 alone. This is in accordance with recent observations by others (50).

In cartilage explants, neither COMP nor TGF- β 1, but IL-1 β caused an increased IL-6 release. Both the intact and mCOMP may be too large to diffuse into the cartilage explants and COMP may bind to and be captured by other matrix molecules before it reaches the cells. The latter possibility may also apply to the much smaller TGF- β 1 which did also not cause an increased IL-6 release.

We furthermore analyzed the gene expression of IL-6 in PHCs. Again, stimulation with COMP had no effect while TGF- β 1 induced nearly significant changes in expression levels. In addition to IL-6, we investigated the gene expression of MMP1 and MMP13. MMP1 and MMP13 are the key proteases involved in cartilage breakdown (51). While MMP1 is especially expressed in early OA and downregulated in late OA, MMP13 is characteristically expressed in late OA and plays a pivotal role by degrading collagen II (52). It was also shown that MMP1 and MMP13 are strongly induced by endogenous cartilage proteins such as fibronectin, collagen II and matrilin-3 (49). We further investigated the expression of collagen II, collagen I and collagen X. Collagen II is the most prominent structural protein of the cartilage extracellular matrix and thus a marker for mature chondrocytes, as well as for anabolic/regenerative processes. Specific fragments of collagen II reveal different enzymatic pathways of human cartilage collagen degradation by cathepsins and MMPs and can therefore be used as specific biomarkers (53). Collagen I is expressed in early chondrocyte differentiation and can be used to discriminate between mature chondrocytes and their precursor cells (54). Collagen X plays an important role in chondrocyte terminal differentiation and chondrocyte hypertrophy (55). Examined growth factors were TGF- β 1 and BMP2. TGF- β 1 is one of the key players that trigger chondrocyte lineage differentiation. It induces anabolic processes in young chondrocytes and leads to terminal differentiation and hypertrophy in old chondrocytes (56). BMP-2 also plays a role in chondrocyte terminal differentiation (57). Terminal differentiation is an important process preceding endochondral ossification and related to tissue remodeling associated with OA. We hypothesized that not only proinflammatory cytokines and proteases could contribute to cartilage homeostasis, but that also genes that are implicated in the differentiation state of chondrocytes could be relevant. However, COMP did not show any ability to directly modify the gene induction of IL-6, MMP1, MMP13, collagen I, collagen II, collagen X, TGF- β 1 and BMP-2.

Interestingly, fibronectin and fibronectin fragments show a strong proinflammatory activity after binding to α 5 β 1 integrin the fibronectin receptor (58). Fibronectin was shown to activate the MAP kinase and NF- κ B resulting in cytokine expression and subsequent MMP release (59–62). Surprisingly, even though COMP carries an RGD integrin-binding motif and has similar binding activity to α 5 β 1 integrin, COMP did not show any proinflammatory activity in chondrocytes. Further studies are needed to understand why the downstream signaling is different even though fibronectin and COMP potentially bind to the same receptor.

Matrilin-3 is a homotetrameric non-collagenous glycoprotein of the cartilage extracellular matrix (63), that was also

reported to bind weakly to integrins (64,65) and was shown to induce proinflammatory cytokines as well as MMPs in human chondrocytes (16). Interestingly, matrilin-3 was found to be upregulated in OA patient cartilage and synovial fluid and increased matrilin-3 cartilage deposition was associated with disease severity (66,67). Furthermore, matrilin-3 is detectable in serum and the serum levels increase in accordance with matrilin-3 cartilage release into the synovial fluid (67). Matrilin-3 binds to COMP and collagens (22,68). It is attractive to speculate that matrix proteins regulate the availability and activity of growth factors. COMP was shown to directly interact with TGF- β 1 and in a complex together with the growth factor indirectly modify chondrocyte behavior (50). COMP might target and concentrate TGF- β 1 activity which is abundantly present in the blood (69) to tissues like cartilage that are susceptible for TGF- β 1 signaling. ADAMTS4 and ADAMTS5 have already been shown to be important factors in OA by degrading aggrecan and unmasking collagens (7). Recently, it was shown that matrilin-3 is also degraded by ADAMTS4 and ADAMTS5 and; interestingly, also COMP can be cleaved by ADAMTS4 (35). However, it remains unclear if the resulting fragments of the two matrix proteins have any significant biologic activity. While full-length COMP did not show any direct effect on chondrocytes, both full-length matrilin-3 and fragments influence OA development and show elevated expression through disease development. Therefore, matrilin-3 may prove to be not only an OA marker, but also, in contrast to COMP, play a functional role in the inflammatory aspect of the disease.

Acknowledgments

We thank Mats Paulsson for carefully reading the article.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest.

This work was supported by the Koeln Fortune Program (Nr. 189/2012)/Faculty of Medicine, University of Cologne and by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to F.Z. (ZA561/2-1).

References

- Dahaghin S, Bierma-Zeinstra SM, Ginai AZ, Pols HA, Hazes JM, Koes BW. Prevalence and pattern of radiographic hand osteoarthritis and association with pain and disability (the Rotterdam study). *Ann Rheum Dis* 2005;64:682-7.
- Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier JP. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001;15:805-29.
- Cawston TE, Wilson AJ. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006;20:983-1002.
- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
- Nagase H, Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 2003;5:94-103.
- Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Rorabeck C, Bourne R, Poole AR. Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest* 1995; 96:2859-69.
- Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis. *J Cell Biochem* 2011;112:3507-14.
- Richardson DW, Dodge GR. Effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes. *Am J Vet Res* 2000;61:624-30.
- Aoki Y, Ohtori S, Ino H, Douya H, Ozawa T, Saito T, Moriya H, Takahashi K. Disc inflammation potentially promotes axonal regeneration of dorsal root ganglion neurons innervating lumbar intervertebral disc in rats. *Spine* 2004;29:2621-6.
- Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett* 2004;361:184-7.
- Ryu JH, Yang S, Shin Y, Rhee J, Chun CH, Chun JS. Interleukin-6 plays an essential role in hypoxia-inducible factor 2 α -induced experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice. *Arthritis Rheum* 2011;63:2732-43.
- Klatt AR, Paul-Klausch B, Klinger G, Kuhn G, Renno JH, Banerjee M, Malchau G, Wielckens K. A critical role for collagen II in cartilage matrix degradation: collagen II induces pro-inflammatory cytokines and MMPs in primary human chondrocytes. *J Orthop Res* 2009;27:65-70.
- Klatt AR, Zech D, Kuhn G, Paul-Klausch B, Klinger G, Renno JH, Schmidt J, Malchau G, Wielckens K. Discoidin domain receptor 2 mediates the collagen II-dependent release of interleukin-6 in primary human chondrocytes. *J Pathol* 2009;218:241-7.
- Homandberg GA, Meyers R, Xie DL. Fibronectin fragments cause chondrolysis of bovine articular cartilage slices in culture. *J Biol Chem* 1992;267:3597-604.
- Homandberg GA, Hui F, Wen C, Purple C, Bewsey K, Koepf H, Huch K, Harris A. Fibronectin-fragment-induced cartilage chondrolysis is associated with release of catabolic cytokines. *Biochem J* 1997;321(Pt 3):751-7.
- Klatt AR, Klinger G, Paul-Klausch B, Kuhn G, Renno JH, Wagener R, Paulsson M, Schmidt J, Malchau G, Wielckens K. Matrilin-3 activates the expression of osteoarthritis-associated genes in primary human chondrocytes. *FEBS Lett* 2009;583:3611-17.
- Klatt AR, Paul-Klausch B, Klinger G, Hillebrand U, Kuhn G, Kobbe B, Renno JH, Johannis W, Paulsson M, Wagener R. The matrilin-3 VWA1 domain modulates interleukin-6 release from primary human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2013;21: 869-73.
- Newton G, Weremowicz S, Morton CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lawler J. Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein. *Genomics* 1994;24:435-9.
- Efimov VP, Engel J, Malashkevich VN. Crystallization and preliminary crystallographic study of the pentamerizing domain from cartilage oligomeric matrix protein: a five-stranded α -helical bundle. *Proteins* 1996;24:259-62.
- Halasz K, Kassner A, Morgelin M, Heinegard D. COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem* 2007;282: 31166-73.
- Agarwal P, Zwolanek D, Keene DR, Schulz JN, Blumbach K, Heinegard D, Zaucke F, Paulsson M, Krieg T, Koch M, Eckes B. Collagen XII and XIV, new partners of cartilage oligomeric matrix protein in the skin extracellular matrix suprastructure. *J Biol Chem* 2012;287:22549-59.
- Mann HH, Ozbek S, Engel J, Paulsson M, Wagener R. Interactions between the cartilage oligomeric matrix protein and matrilins. Implications for matrix assembly and the pathogenesis of chondrodysplasias. *J Biol Chem* 2004;279:25294-8.
- Chen FH, Herndon ME, Patel N, Hecht JT, Tuan RS, Lawler J. Interaction of cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 with aggrecan. *J Biol Chem* 2007;282:24591-8.
- Di Cesare PE, Chen FS, Moergelin M, Carlson CS, Leslie MP, Perris R, Fang C. Matrix-matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin. *Matrix Biol* 2002;21:461-70.
- Briggs MD, Hoffman SM, King LM, Olsen AS, Mohrenweiser H, Leroy JG, Mortier GR, Rimoin DL, Lachman RS, Gaines ES, et al. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nat Genet* 1995;10:330-6.
- Hecht JT, Nelson LD, Crowder E, Wang Y, Elder FF, Harrison WR, Francomano CA, Prange CK, Lennon GG, Deere M, et al.

- Mutations in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia. *Nat Genet* 1995;10:325–9.
27. Saxne T, Heinegard D. Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br J Rheumatol* 1992;31:583–91.
 28. Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, DiCesare PE, Michel BA, Hauselmann HJ. Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Br J Rheumatol* 1997;36:1151–60.
 29. Hummel KM, Neidhart M, Vilim V, Hauser N, Aicher WK, Gay RE, Gay S, Häuselmann HJ. Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fibroblasts and synovial fluids. *Br J Rheumatol* 1998;37:721–8.
 30. Di Cesare PE, Carlson CS, Stoleran ES, Hauser N, Tulli H, Paulsson M. Increased degradation and altered tissue distribution of cartilage oligomeric matrix protein in human rheumatoid and osteoarthritic cartilage. *J Orthop Res* 1996;14:946–55.
 31. Vilim V, Olejarova M, Machacek S, Gatterova J, Kraus VB, Pavelka K. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:707–13.
 32. Verma P, Dalal K. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in knee osteoarthritis: a novel diagnostic and prognostic biomarker. *J Orthop Res* 2013;31:999–1006.
 33. Ganu V, Goldberg R, Peppard J, Rediske J, Melton R, Hu SI, Wang W, Duvander C, Heinegård D. Inhibition of interleukin-1 α -induced cartilage oligomeric matrix protein degradation in bovine articular cartilage by matrix metalloproteinase inhibitors: potential role for matrix metalloproteinases in the generation of cartilage oligomeric matrix protein fragments in arthritic synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1998;41:2143–51.
 34. Stracke JO, Fosang AJ, Last K, Mercuri FA, Pendas AM, Llano E, Perris R, Di Cesare PE, Murphy G, Knäuper V. Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *FEBS Lett* 2000;478:52–6.
 35. Dickinson SC, Vankemmelbeke MN, Buttle DJ, Rosenberg K, Heinegard D, Hollander AP. Cleavage of cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) by matrix metalloproteinases and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs. *Matrix Biol* 2003;22:267–78.
 36. Liu CJ, Kong W, Ilalov K, Yu S, Xu K, Prazak L, Fajardo M, Sehgal B, Di Cesare PE. ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *FASEB J* 2006;20:988–90.
 37. Liu CJ, Kong W, Xu K, Luan Y, Ilalov K, Sehgal B, Yu S, Howell RD, Di Cesare PE. ADAMTS-12 associates with and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *J Biol Chem* 2006;281:15800–8.
 38. Guo F, Lai Y, Tian Q, Lin EA, Kong L, Liu C. Granulin-epithelin precursor binds directly to ADAMTS-7 and ADAMTS-12 and inhibits their degradation of cartilage oligomeric matrix protein. *Arthritis Rheum* 2010;62:2023–36.
 39. Happonen KE, Saxne T, Aspberg A, Mergelin M, Heinegard D, Blom AM. Regulation of complement by cartilage oligomeric matrix protein allows for a novel molecular diagnostic principle in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:3574–83.
 40. Tan K, Duquette M, Joachimiak A, Lawler J. The crystal structure of the signature domain of cartilage oligomeric matrix protein: implications for collagen, glycosaminoglycan and integrin binding. *FASEB J* 2009;23:2490–501.
 41. Wang L, Zheng J, Du Y, Huang Y, Li J, Liu B, Liu CJ, Zhu Y, Gao Y, Xu Q, Kong W, Wang X. Cartilage oligomeric matrix protein maintains the contractile phenotype of vascular smooth muscle cells by interacting with $\alpha(7)\beta(1)$ integrin. *Circ Res* 2010;106:514–25.
 42. Chen FH, Thomas AO, Hecht JT, Goldring MB, Lawler J. Cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 supports chondrocyte attachment through interaction with integrins. *J Biol Chem* 2005;280:32655–61.
 43. Rock MJ, Holden P, Horton WA, Cohn DH. Cartilage oligomeric matrix protein promotes cell attachment via two independent mechanisms involving CD47 and $\alpha V\beta 3$ integrin. *Mol Cell Biochem* 2010;338:215–24.
 44. Agarwal P, Schulz JN, Blumbach K, Andreasson K, Heinegard D, Paulsson M, Mauch C, Eming SA, Eckes B, Krieg T. Enhanced deposition of cartilage oligomeric matrix protein is a common feature in fibrotic skin pathologies. *Matrix Biol* 2013;32:325–31.
 45. Thur J, Rosenberg K, Nitsche DP, Pihlajamaa T, Ala-Kokko L, Heinegard D, Paulsson M, Maurer P. Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *J Biol Chem* 2001;276:6083–92.
 46. Forslind K, Eberhardt K, Jonsson A, Saxne T. Increased serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein. A prognostic marker in early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1992;31:593–8.
 47. Guerne PA, Carson DA, Lotz M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones *in vitro*. *J Immunol* 1990;144:499–505.
 48. Hoch JM, Mattacola CG, Medina McKeon JM, Howard JS, Lattermann C. Serum cartilage oligomeric matrix protein (sCOMP) is elevated in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 2011;19:1396–404.
 49. Sofat N. Analysing the role of endogenous matrix molecules in the development of osteoarthritis. *Int J Exp Pathol* 2009;90:463–79.
 50. Haudenschild DR, Hong E, Yik JH, Chromy B, Mergelin M, Snow KD, Acharya C, Takada Y, Di Cesare PE. Enhanced activity of transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) bound to cartilage oligomeric matrix protein. *J Biol Chem* 2011;286:43250–8.
 51. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* 2006;11:529–43.
 52. Sun L, Wang X, Kaplan DL. A 3D cartilage - inflammatory cell culture system for the modeling of human osteoarthritis. *Biomaterials* 2011;32:5581–9.
 53. Bay-Jensen AC, Andersen TL, Charni-Ben Tabassi N, Kristensen PW, Kjaersgaard-Andersen P, Sandell L, Garnero P, Delaissé JM. Biochemical markers of type II collagen breakdown and synthesis are positioned at specific sites in human osteoarthritic knee cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:615–23.
 54. Zhang F, Yao Y, Su K, Pang PX, Zhou R, Wang Y, Wang DA. Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes by adenoviral vector-mediated TGF- $\beta 3$ and collagen-1 silencing shRNA in 3D culture. *Ann Biomed Eng* 2011;39:3042–54.
 55. Zheng Q, Zhou G, Morello R, Chen Y, Garcia-Rojas X, Lee B. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression *in vivo*. *J Cell Biol* 2003;162:833–42.
 56. van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom A, van den Berg WB. TGF- β signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:1539–45.
 57. Paphathanasiou I, Malizos KN, Tsezou A. Bone morphogenetic protein-2-induced Wnt/ β -catenin signaling pathway activation through enhanced low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 catabolic activity contributes to hypertrophy in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R82.
 58. Hofer U, Syfrig J, Chiquet-Ehrismann R. Identification and characterization of a dimeric chicken fibronectin receptor. Subunit-specific monoclonal antibodies to the putative chicken $\alpha 5 \beta 1$ integrin. *J Biol Chem* 1990;265:14561–5.
 59. Forsyth CB, Pulai J, Loeser RF. Fibronectin fragments and blocking antibodies to $\alpha 2 \beta 1$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2002;46:2368–76.
 60. Pulai JI, Del Carlo Jr M, Loeser RF. The $\alpha 5 \beta 1$ integrin provides matrix survival signals for normal and osteoarthritic human articular chondrocytes *in vitro*. *Arthritis Rheum* 2002;46:1528–35.
 61. Homandberg GA, Costa V, Wen C. Fibronectin fragments active in chondrocytic chondrolysis can be chemically cross-linked to the $\alpha 5$ integrin receptor subunit. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:938–49.
 62. Pulai JI, Chen H, Im HJ, Kumar S, Hanning C, Hegde PS, Loeser RF. NF- κB mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *J Immunol* 2005;174:5781–8.

63. Klatt AR, Nitsche DP, Kobbe B, Morgelin M, Paulsson M, Wagener R. Molecular structure and tissue distribution of matrilin-3, a filament-forming extracellular matrix protein expressed during skeletal development. *J Biol Chem* 2000;275:3999–4006.
64. Mann HH, Sengle G, Gebauer JM, Eble JA, Paulsson M, Wagener R. Matrilins mediate weak cell attachment without promoting focal adhesion formation. *Matrix Biol* 2007;26:167–74.
65. Klatt AR, Becker AK, Neacsu CD, Paulsson M, Wagener R. The matrilins: modulators of extracellular matrix assembly. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43:320–30.
66. Pullig O, Weseloh G, Klatt AR, Wagener R, Swoboda B. Matrilin-3 in human articular cartilage: increased expression in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:253–63.
67. Vincourt JB, Gillet P, Rat AC, Guillemin F, Netter P, Mainard D, Magdalou J. Measurement of matrilin-3 levels in human serum and synovial fluid using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20: 783–6.
68. Fresquet M, Jowitt TA, Ylostalo J, Coffey P, Meadows RS, Ala-Kokko L, Thornton DJ, Briggs MD. Structural and functional characterization of recombinant matrilin-3 A-domain and implications for human genetic bone diseases. *J Biol Chem* 2007;282: 34634–43.
69. Huang L, Jia J, Liu R. Decreased serum levels of the angiogenic factors VEGF and TGF- β 1 in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Neurosci Lett* 2013;550:60–3.

Supplementary material available online

Supplementary Figure S1: Effect of COMP on the collagen I, collagen X, collagen II, MMP13 and BMP-2 expression of primary human chondrocytes measured by quantitative real-time RT-PCR.

Supplemental material available at informahealthcare.com/cts

3.2. Publikation 2: Identification of antibodies against extracellular matrix proteins in human osteoarthritis



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Identification of antibodies against extracellular matrix proteins in human osteoarthritis

Johannes Ruthard ^a, Gabriele Hermes ^a, Ursula Hartmann ^b, Gerhard Sengle ^b, Georg Pongratz ^c, Benedikt Ostendorf ^c, Matthias Schneider ^c, Stefan Höllriegel ^d, Frank Zaucke ^e, Raimund Wagener ^b, Thomas Streichert ^a, Andreas R. Klatt ^{a,*}

^a Institute for Clinical Chemistry, Medical Faculty, University of Cologne, Kerpener Str. 62, 50924, Cologne, Germany

^b Center for Biochemistry, Medical Faculty, University of Cologne, Joseph-Stelzmann-Str. 52, 50931, Cologne, Germany

^c Institute for Rheumatology, Hiller Research Unit for Rheumatology, Moorenstr. 5, 40225, Düsseldorf, Germany

^d Sana-Dreifaltigkeitskrankenhaus, Aachener Str. 445, 50933, Cologne, Germany

^e Dr Rolf M Schwiete Research Unit for Osteoarthritis, Orthopädische Universitätsklinik Friedrichsheim gGmbH, Marienburgstr. 2, 60528, Frankfurt am Main, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2018

Accepted 7 July 2018

Available online xxx

Keywords:

Thrombospondin

Cartilage oligomeric matrix protein

CLEC3A

Osteoarthritis

Cartilage

Autoantibodies

ABSTRACT

We investigated the presence of autoantibodies against the extracellular matrix proteins thrombospondin-4 (TSP-4), cartilage oligomeric matrix protein (COMP), C-type lectin domain family 3 member A (CLEC3A), collagen II, collagen VI, matrilin-3, and fibrillin-2 in the serum of osteoarthritis (OA) patients. We compared those results with the presence of such antibodies in rheumatoid arthritis (RA) patients and in healthy donors (HD). Our study examines whether antibodies against extracellular proteins can be used as potential biomarkers to support the clinical diagnosis of OA. 10 OA, 10 RA patients and 10 HD were enrolled in this explorative cross-sectional study. SDS-PAGE and immunoblot were used to investigate the presence of antibodies against extracellular matrix proteins. The serum of 5/10 OA patients but 0/10 HD exhibited TSP-4 IgG isotype antibodies ($P = 0.033$). The serum of 8/10 OA patients but only 1/10 HD exhibited IgG isotype antibodies against TSP-4 or COMP ($P = 0.005$). The serum of 9/10 OA patients but only 1/10 HD exhibited IgG isotype antibodies against TSP-4, COMP or CLEC3A ($P = 0.005$). We found strong evidence for the presence of IgG isotype autoantibodies against the cartilage extracellular matrix proteins TSP-4, COMP and CLEC3A in OA. The detection of IgG isotype autoantibodies against TSP-4, COMP and CLEC3A may support the clinical diagnosis of OA. OA with autoantibodies against cartilage extracellular matrix proteins defines a new OA subgroup suggesting that patients with high concentrations of autoantibodies may benefit from an immune suppressive therapy.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

OA diagnosis is currently based on clinical symptoms, especially articular pain, radiographic findings and laboratory data [1]. In early OA, X-ray imaging often remains negative [2]. Magnetic resonance imaging (MRI) assessment of OA patients has provided improved diagnostic features, especially for early OA [3]. Through ultrasound imaging, thickening and inflammation of the synovial membrane has recently been shown to be associated with OA [4].

However, in cases when X-ray imaging reveals no signs of OA and MRI assessment is not accessible, the diagnosis of OA relies on clinical features. In these situations, the identification of an OA biomarker could support the clinical diagnosis of OA.

Recent research has provided evidence that the immune system plays an important role in OA. In the course of OA, fragments of cartilage extracellular matrix proteins are released into the synovial fluid and the blood [5]. Specific cartilage protein fragments released have been shown to activate the complement system [6], which in turn plays a pivotal role in OA [7]. Further, it has been shown that activated professional antigen presenting cells (APC) ingest and process extracellular matrix proteins and play a role in OA pathophysiology [8]. Activated APCs release IL-6 and other pro-inflammatory factors [9]. IL-6, a major OA cytokine [10]

* Corresponding author. Institute for Clinical Chemistry, Medical Faculty, University of Cologne, Germany.

E-mail address: andreas.klatt@uk-koeln.de (A.R. Klatt).

associated with increased IgG concentrations in synovial fluid [11], leads to secretion of IL-21 [12]. IL-21 has been shown to be elevated in OA patients [13] and to induce antibody production [12]. If autoantibodies against extracellular matrix proteins could be detected, these could possibly be used to simplify the clinical diagnosis of OA.

The purpose of this study was to analyze the serum of OA patients for the presence of autoantibodies against extracellular matrix proteins (matrilin-3, C-type lectin domain family 3 member A (CLEC3A), cartilage oligomeric matrix protein (COMP), thrombospondin-4 (TSP-4), fibrillin-2) and against network-forming cartilage collagens (collagen II, collagen VI). Furthermore, we compared the results with the presence of the autoantibodies in the serum of rheumatoid arthritis (RA) patients and healthy donors (HD). We discuss whether antibodies against extracellular matrix proteins can be used as potential biomarkers to support the clinical diagnosis of OA, to stratify patients suffering from OA and to identify OA patients who would benefit from an immune modulatory therapy.

2. Materials and methods

Subjects - The study was performed at the Universities of Düsseldorf and of Cologne. This explorative cross-sectional study includes 10 OA and 10 RA patients and 10 HD. Inclusion criterion for the OA group was a diagnosed OA; exclusion criteria for the OA group were RA and other autoimmune diseases or cancer. Inclusion criterion for the RA group was a diagnosed RA; exclusion criteria were OA and other autoimmune diseases or cancer. Inclusion criterion for the HD group were no symptoms of a joint disease; exclusion criteria were OA, RA and other autoimmune diseases or cancer. The average age of the OA group was 63 (± 8) years, that of the RA group was 54 (± 11) years and for the HD group 40 (± 9) years. The proportion of women and men was evenly distributed in all groups. The study was approved by the ethics committee of the University of Düsseldorf (No. 2018-88-KFogU, No. 3828) and Charité Berlin (EA1/193/10, No. 3483).

3. Methods

Blood samples - Blood samples were centrifuged at $2772 \times g$ for 10 min and stored in aliquots at -20°C .

Proteins - The cDNA of human tetranectin, human monomeric matrilin 3 (lacking the C-terminal coiled coil domain) [14], human CLEC3A [15] and a human fibrillin-2 fragment [16] were cloned into modified pCEP-Pu vectors and transfected into HEK-293 EBNA cells. The recombinant proteins were purified using affinity chromatography from the supernatant of the cells. Human collagen II was purified with pepsin from human cartilage [17]. Native human collagen VI (Abcam, Cambridge, UK), recombinant human TSP-4 (R&D Systems, Minneapolis, USA) and recombinant human COMP (R&D Systems, Minneapolis, USA) were commercially available.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblot - To detect antibodies against extracellular matrix proteins in the serum samples, extracellular matrix proteins (1 $\mu\text{g}/\text{lane}$) were separated using SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane (0.45 μm , Invitrogen, Carlsbad, USA). Free binding sites were blocked with milk powder (5%) and bovine serum albumin (1%) in Tris-buffered saline with 0.1% Tween (TBS-T) and incubated with patient's serum (1:200 in 5% milk powder and 1% bovine serum albumin in TBS-T) followed by an HRP-conjugated anti-human IgG antibody (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). Signals were detected after incubation using ECL Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and the ChemiDoc XRS + imaging system (BioRad, Munich, Germany).

Statistical analysis - Categorical data analysis for contingency tables was performed using the chi-square or Miller-Fisher-Exact test using IBM SPSS-software. Odds ratios and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated using Medcalc[®] software (Ostend, Belgium).

4. Results

The purity and migration pattern of the human extracellular proteins TSP-4, COMP, CLEC3A, matrilin-3, fibrillin-2, collagen II, and collagen VI was analyzed using SDS-PAGE and Coomassie Brilliant Blue staining at the beginning and end of the study (Fig. 1). All proteins showed a specific band pattern and no contaminations.

Using SDS-PAGE followed by immunoblot, we examined the serum of 10 OA, 10 RA patients and 10 HD for the presence of IgG isotype antibodies against extracellular matrix cartilage proteins with patient's serum as primary antibody. Human tetranectin, a serum protein, was used as negative control. Signals in the appropriate position that were distinguishable from the background were assessed as positive (Fig. 2).

The presence of IgG antibodies against extracellular matrix proteins in the different groups is summarized in Tables 1a and 1b. Noteworthy, the serum of 5/10 OA patients but 0/10 HD ($P = 0.033$) exhibited TSP-4 IgG isotype antibodies (Table 1a).

The odds ratio for OA and the presence of TSP-4 IgG isotype antibodies was 21 (95% CI: 1-454). The serum of 9/10 RA patients but 0/10 HD ($P < 0.001$) exhibited TSP-4 IgG isotype antibodies (Table 1b). The odds ratio for RA and the presence of TSP-4 IgG isotype antibodies was 133 (95% CI: 5-3674).

TSP-4, COMP, and CLEC3A were more frequently found in the OA group. The serum of 8/10 of the OA group but only 1/10 of that of the HD group exhibited IgG isotype antibodies against TSP-4 or COMP ($P = 0.005$). The odds ratio for OA and the presence of TSP-4 or COMP IgG isotype antibodies was 36 (95% CI: 3-476). The serum

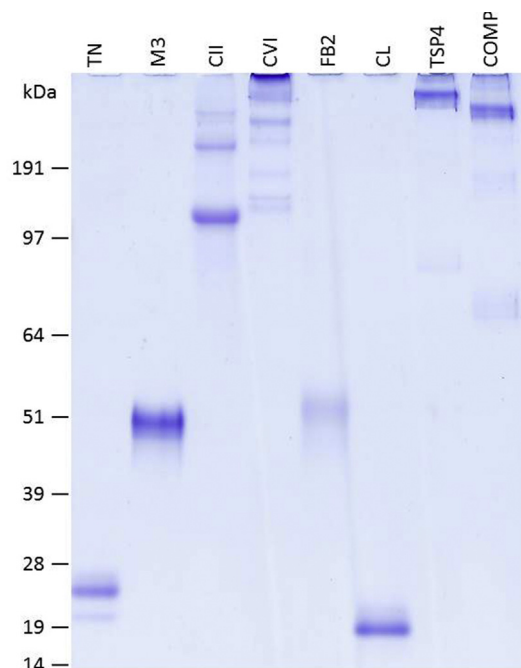


Fig. 1. Quality control of the proteins used in this study. Human tetranectin (TN), matrilin-3 (M3), collagen II (CII), collagen VI (CVI), fibrillin-2 (FB2), CLEC3A (CL), TSP-4 (TSP4), and COMP (COMP) were separated using SDS-PAGE under non-reducing conditions and stained with Coomassie Brilliant Blue. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

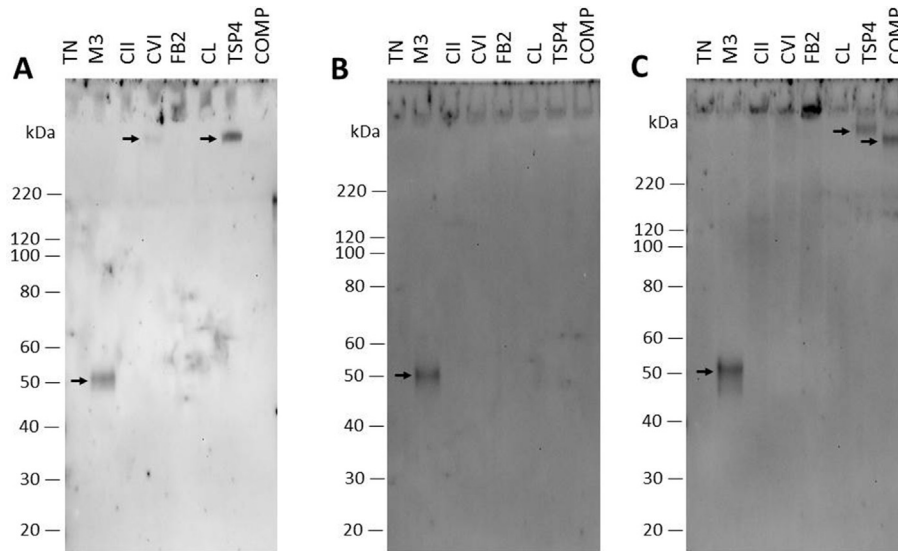


Fig. 2. Representative presentation of an immunoblot of each study group (A = OA, B = HD, C = RA) with patients' serum as primary antibody. Protein samples were separated using SDS-PAGE and analyzed using immunoblot with patient's serum as primary antibody. The following antibodies were detected: in (A) IgG isotype antibodies against matrilin-3, collagen VI and TSP-4, in (B) IgG isotype antibodies against matrilin-3 and in (C) IgG isotype antibodies against matrilin-3, TSP-4 and COMP (all marked with arrows). TN: Tetranectin, M3: matrilin-3, CII: collagen II, CVI: collagen VI, FB2: fibrillin-2, CL: CLEC3A, TSP-4: TSP4.

Table 1a

IgG isotype antibodies in the OA and HD study group. Number of positive tested participants/total number of participants in group. * Fisher's exact test.

	OA	HD	P*
TSP-4	5/10	0/10	0.033
COMP	4/10	1/10	0.303
CLEC3A	2/10	0/10	0.474
Matrilin-3	10/10	10/10	1
Collagen II	0/10	7/10	0.003
Collagen VI	1/10	0/10	1
Fibrillin-2	0/10	0/10	1
Tetranectin	0/10	0/10	1

Table 1b

IgG isotype antibodies in the RA and HD study group. Number of positive tested participants/total number of participants in group. * Fisher's exact test.

	RA	HD	P*
TSP-4	9/10	0/10	<0.001
COMP	10/10	1/10	<0.001
CLEC3A	4/10	0/10	0.025
Matrilin-3	10/10	10/10	1
Collagen II	1/10	7/10	0.020
Collagen VI	2/10	0/10	0.136
Fibrillin-2	0/10	0/10	1
Tetranectin	0/10	0/10	1

of 9/10 of the OA group but only 1/10 of the HD group exhibited IgG isotype antibodies against TSP-4, COMP or CLEC3A ($P = 0.005$). The odds ratio for OA and the presence of TSP-4, COMP or CLEC3A IgG isotype antibodies was 81 (95% CI: 4-1505) (Table 2).

Table 2

Combination of IgG isotype antibodies. Number of positive tested participants for TSP-4 or COMP, and TSP-4, COMP or CLEC3A IgG isotype antibodies/total number of participants in group. * Fisher's exact test.

	OA	HD	P*
TSP-4/COMP	8/10	1/10	0.005
TSP-4/COMP/CLEC3A	9/10	1/10	0.001

5. Discussion

In our study, we detected the presence of TSP-4 IgG isotype antibodies, and there was a statistically significant difference in the frequency of TSP-4 IgG isotype antibodies between the OA group and the HD group. The detection of TSP-4 IgG isotype antibodies may thus help to discriminate between healthy individuals and patients suffering from OA. TSP-4 is a major regulator of the extracellular matrix organization and production and remodeling during response to injury [18]. However, TSP-4 has not been found in healthy cartilage. Using the RT-PCR technique, we could show a strong expression of TSP-4 in primary human chondrocytes isolated from OA cartilage (not shown). Expression of TSP-4 is closely associated with TGF-beta signaling, and TSP-4 is probably induced in osteoarthritic cartilage in response to TGF-beta signaling and cartilage matrix degradation [19].

In a parallel analysis of IgG isotype antibodies against TSP-4, COMP and CLEC3A, we found a highly statistically significant difference between the frequency of IgG isotype antibodies against TSP-4, COMP and CLEC3A in OA patients compared to HD. Serum antibody reactions against TSP-4, COMP and CLEC3A were also detected in the RA group. However, when RA has been ruled out, the analysis of IgG isotype antibodies against TSP-4 or the parallel analysis of IgG isotype antibodies against TSP-4, COMP and CLEC3A may support the clinical diagnosis of OA.

OA can be differentiated into primary and secondary OA [20]. Primary OA lacks a definite disease causing factor, whereas in secondary OA the disease is classified according to the different causative risk factors. Common OA risk factors are trauma, surgery, obesity, metabolic disorders, endocrinological disorders, rheumatic diseases, articular malalignment, or dysplasia [21]. Our findings show that it is highly likely that there is an OA subgroup where antibodies against extracellular matrix proteins and the immune system in general play an important role.

Several studies describe how RA can cause the production of antibodies against cartilage extracellular matrix proteins [22], and antibodies against connective tissue proteins can be causative for arthritis-like conditions; injection of collagen II and of COMP leads to arthritis [23,24] and antibodies against matrilin-1 are associated

with relapsing polyarthritides [25]. These findings are *in vivo* examples of pathologically relevant autoantibodies against cartilage extracellular matrix proteins that lead to cartilage degradation, and it is likely that high concentrations of autoantibodies contribute to the disease activity of RA. Similarly, high concentrations of autoantibodies generated in the course of OA may also carry out pathophysiological actions.

The concentration and the number of different autoantibodies could be decisive in whether autoantibodies cause pathophysiological alterations or not. It is likely that the subgroups of OA can be subdivided into patients with or without or with high or low autoantibody levels against extracellular matrix proteins. It is also tempting to speculate that OA patients with high concentrations of autoantibodies might benefit from a local or systemic immune suppressive or immune modulatory therapy targeting B cells.

In this context it is interesting that intraarticular cortisone therapy has been reported to exacerbate disease progression in some cases of OA [26], even though it is regarded as safe [27]. Cortisone has been shown to drive immunoglobulin synthesis in plasma cells under pro-inflammatory co-stimulation [28]. The presence of autoreactive antibodies in the course of OA could explain an exacerbated disease progression after intraarticular cortisone administration. Recently, intraarticular administration of fluoxetine [29], a WNT pathway inhibitor, showed promising results as a drug for the treatment of OA. WNT signaling was shown to be relevant in B cell activation and proliferation [30]. Possibly, fluoxetine works as DMOAD by reducing the amount of OA autoantibodies.

We also investigated the presence of IgG isotype antibodies in patients' serum using ELISA (not shown). In these tests, we could detect IgG isotype antibodies against extracellular matrix proteins, with the results showing a moderate consistency with the immunoblot results. We assume that the moderate consistency between the results of immunoblot and ELISA is probably due to contaminations of the protein preparations that are not detectable by SDS-PAGE and Coomassie Brilliant Blue staining.

We also investigated the presence of IgM isotype antibodies in the serum of OA patients and HD. As we found no correlation with TSP-4 or COMP IgM isotype antibodies, we abandoned the investigation of IgM isotype serum antibodies in our study group.

In conclusion, the serum of OA patients contains IgG isotype autoantibodies against the cartilage extracellular matrix proteins TSP-4, COMP, and CLEC3A. The detection of these autoantibodies could therefore be used to support the clinical diagnosis of OA. Furthermore, a new OA patient subgroup with autoantibodies against cartilage extracellular matrix proteins could be identified. Immune suppressive therapy may be suitable for OA patients with high concentrations of these autoantibodies.

Source of funding

Collection of OA samples was sponsored by the Hydro Research Foundation. Collection of RA samples was founded by BMBF, AthroMark (01EC1009). Raimund Wagener and Frank Zaucke have received funding from the European Community's Seventh Framework Programme under grant agreement no 602300 (SYBIL).

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.036>.

References

[1] R. Altman, E. Asch, D. Bloch, G. Bole, D. Borenstein, K. Brandt, W. Christy,

- T.D. Cooke, R. Greenwald, M. Hochberg, et al., Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and therapeutic criteria committee of the American rheumatism association, *Arthritis Rheum.* 29 (1986) 1039–1049.
- [2] M.T. Hannan, D.T. Felson, T. Pincus, Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee, *J. Rheumatol.* 27 (2000) 1513–1517.
- [3] A.A. Qazi, J. Folkesson, P.C. Pettersen, M.A. Karsdal, C. Christiansen, E.B. Dam, Separation of healthy and early osteoarthritis by automatic quantification of cartilage homogeneity, *Osteoarthritis Cartilage* 15 (2007) 1199–1206.
- [4] I. Moller, D. Bong, E. Naredo, E. Filippucci, I. Carrasco, C. Moragues, A. Iagnocco, Ultrasound in the study and monitoring of osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage* 16 (Suppl 3) (2008) S4–S7.
- [5] M. Lotz, J. Martel-Pelletier, C. Christiansen, M.-L. Brandi, O. Bruyère, R. Chapurlat, J. Collette, C. Cooper, G. Giacomelli, J.A. Kanis, M.A. Karsdal, V. Kraus, W.F. Lems, I. Meulenbelt, J.-P. Pelletier, J.-P. Raynaud, S. Reiter-Niesert, R. Rizzoli, L.J. Sandell, W.E. Van Spil, J.-Y. Reginster, Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives, *Ann. Rheum. Dis.* 72 (2013) 1756–1763.
- [6] A.P. Sjöberg, G.A. Manderson, M. Morgelin, A.J. Day, D. Heinegard, A.M. Blom, Short leucine-rich glycoproteins of the extracellular matrix display diverse patterns of complement interaction and activation, *Mol. Immunol.* 46 (2009) 830–839.
- [7] Q. Wang, A.L. Rozelle, C.M. Lepus, C.R. Scanzello, J.J. Song, D.M. Larsen, J.F. Crish, G. Bebek, S.Y. Ritter, T.M. Lindstrom, I. Hwang, H.H. Wong, L. Punzi, A. Encarnacion, M. Shamloo, S.B. Goodman, T. Wyss-Coray, S.R. Goldring, N.K. Banda, J.M. Thurman, R. Gobeze, M.K. Crow, V.M. Holers, D.M. Lee, W.H. Robinson, Identification of a central role for complement in osteoarthritis, *Nat. Med.* 17 (2011) 1674–1679.
- [8] V.B. Kraus, G. McDaniel, J.L. Huebner, T.V. Stabler, C.F. Pieper, S.W. Shipes, N.A. Petry, P.S. Low, J. Shen, T.A. McNearney, P. Mitchell, Direct *in vivo* evidence of activated macrophages in human osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage* 24 (2016) 1613–1621.
- [9] K. Sochorova, R. Horvath, D. Rozkova, J. Litzman, J. Bartunkova, A. Sediva, R. Spisek, Impaired Toll-like receptor 8-mediated IL-6 and TNF-alpha production in antigen-presenting cells from patients with X-linked agammaglobulinemia, *Blood* 109 (2007) 2553–2556.
- [10] S. Kaneko, T. Satoh, J. Chiba, C. Ju, K. Inoue, J. Kagawa, Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis, *Cytokines Cell Mol. Ther.* 6 (2000) 71–79.
- [11] E. Hermann, B. Fleischer, W.J. Mayet, T. Poralla, K.H. Meyer zum Buschenfelde, Correlation of synovial fluid interleukin 6 (IL-6) activities with IgG concentrations in patients with inflammatory joint disease and osteoarthritis, *Clin. Exp. Rheumatol.* 7 (1989) 411–414.
- [12] O. Dienz, S.M. Eaton, J.P. Bond, W. Neveu, D. Moquin, R. Noubade, E.M. Briso, C. Charland, W.J. Leonard, G. Ciliberto, C. Teuscher, L. Haynes, M. Rincon, The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4(+) T cells, *J. Exp. Med.* 206 (2009) 69–78.
- [13] Y. Shan, C. Qi, Y. Liu, H. Gao, D. Zhao, Y. Jiang, Increased frequency of peripheral blood follicular helper T cells and elevated serum IL21 levels in patients with knee osteoarthritis, *Mol. Med. Rep.* 15 (2017) 1095–1102.
- [14] A.R. Klatt, D.P. Nitsche, B. Kobbe, M. Morgelin, M. Paulsson, R. Wagener, Molecular structure and tissue distribution of matrilin-3, a filament-forming extracellular matrix protein expressed during skeletal development, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 3999–4006.
- [15] D. Lau, D. Elezagic, G. Hermes, M. Morgelin, A.P. Wohl, M. Koch, U. Hartmann, S. Hollriegel, R. Wagener, M. Paulsson, T. Streichert, A.R. Klatt, The cartilage-specific lectin C-type lectin domain family 3 member A (CLEC3A) enhances tissue plasminogen activator-mediated plasminogen activation, *J. Biol. Chem.* 293 203–214.
- [16] B. Pilecki, A.T. Holm, A. Schlosser, J.B. Moeller, A.P. Wohl, A.V. Zuk, S.E. Heumuller, R. Wallis, S.K. Moestrup, G. Sengle, U. Holmskov, G.L. Sorensen, Characterization of microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) as a tropoelastin- and fibrillin-binding protein involved in elastic fiber formation, *J. Biol. Chem.*, 291 1103–1114.
- [17] K.G. Vogel, M. Paulsson, D. Heinegard, Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon, *Biochem. J.* 223 (1984) 587–597.
- [18] O. Stenina-Adognravi, E.F. Plow, Thrombospondin-4 in tissue remodeling, *Matrix Biol.*
- [19] E.G. Frolova, J. Drazba, I. Krukovets, V. Kostenko, L. Blech, C. Harry, A. Vasanji, C. Drumm, P. Sul, G.J. Jenniskens, E.F. Plow, O. Stenina-Adognravi, Control of organization and function of muscle and tendon by thrombospondin-4, *Matrix Biol.*, 37 35–48.
- [20] J.W. Michael, K.U. Schluter-Brust, P. Eysel, The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee, *Dtsch Arztebl Int* 107 (2010) 152–162.
- [21] D.T. Felson, R.C. Lawrence, P.A. Dieppe, R. Hirsch, C.G. Helmick, J.M. Jordan, R.S. Kington, N.E. Lane, M.C. Nevitt, Y. Zhang, M. Sowers, T. McAlindon, T.D. Spector, A.R. Poole, S.Z. Yanovski, G. Ateshian, L. Sharma, J.A. Buckwalter, K.D. Brandt, J.F. Fries, Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors, *Ann. Intern. Med.* 133 (2000) 635–646.
- [22] T. Glant, J. Csongor, T. Szucs, Immunopathologic role of proteoglycan antigens in rheumatoid joint disease, *Scand. J. Immunol.* 11 (1980) 247–252.
- [23] P.H. Wooley, H.S. Luthra, J.M. Stuart, C.S. David, Type II collagen-induced

- arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates, *J. Exp. Med.* 154 (1981) 688–700.
- [24] S. Carlsen, K.S. Nandakumar, J. Backlund, J. Holmberg, M. Hultqvist, M. Vestberg, R. Holmdahl, Cartilage oligomeric matrix protein induction of chronic arthritis in mice, *Arthritis Rheum.* 58 (2008) 2000–2011.
- [25] A.-S. Hansson, M. Johannesson, L. Svensson, K.S. Nandakumar, D. Heinegård, R. Holmdahl, Relapsing polychondritis, induced in mice with matrilin 1, is an antibody- and complement-dependent disease, *Am. J. Pathol.* 164 (2004) 959–966.
- [26] G.N. Chandler, V. Wright, Deleterious effect of intra-articular hydrocortisone, *Lancet* 2 (1958) 661–663.
- [27] R.G. Gray, N.L. Gottlieb, Intra-articular corticosteroids. An updated assessment, *Clin. Orthop. Relat. Res.* (1983) 235–263.
- [28] D.A. Cooper, M. Duckett, V. Petts, R. Penny, Corticosteroid enhancement of immunoglobulin synthesis by pokeweed mitogen-stimulated human lymphocytes, *Clin. Exp. Immunol.* 37 (1979) 145–151.
- [29] K. Miyamoto, B. Ohkawara, M. Ito, A. Masuda, A. Hirakawa, T. Sakai, H. Hiraiwa, T. Hamada, N. Ishiguro, K. Ohno, Fluoxetine ameliorates cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting Wnt/beta-catenin signaling, *PLoS One* 12 (2017) e0184388.
- [30] T. Reya, M. O’Riordan, R. Okamura, E. Devaney, K. Willert, R. Nusse, R. Grosschedl, Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism, *Immunity* 13 (2000) 15–24.

4. Diskussion

4.1. Chondrozyten-COMP-Interaktionen im Rahmen der Knorpeldegradation – Bedeutung für die Knorpelhomöostase

COMP's Eigenschaften als Modulator verschiedener Prozesse in der extrazellulären Matrix (u. a. Komplement- und Wachstumsfaktoren) und seine Protein- und Zellinteraktionen sowie seine Verwendung als Arthrosebiomarker ^{78,82-84} machen COMP zu einem vielversprechenden Kandidaten als endogenes Signalmolekül. Im Rahmen dieser Studie wurde daher untersucht, ob COMP einen Einfluss auf die differenzielle Genexpression von PHC nehmen kann. Hierfür wurde COMP (natives, oligomeres Protein) rekombinant hergestellt und mit PHC als auch mit Knorpelimplantaten inkubiert. PHC wurden anschließend mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) auf eine veränderte Genexpression von IL-6, MMP1, MMP13, Kollagen I, Kollagen II, Kollagen X, TGF- β und BMP-2 und mittels Immunoassay auf eine veränderte IL-6 Freisetzung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass COMP allein keine Veränderungen in der Expression der untersuchten Moleküle induzierte. Die verschiedenen Proteine, die im Rahmen der Genexpressionsanalysen untersucht wurden, sind Differenzierungsmarker und Marker für katabole, anabole und entzündliche Prozesse im Knorpel. IL-6 stellt hierbei ein zentrales Zytokin in der Arthrosepathophysiologie dar ²²⁶⁻²²⁹ und in anderen Studien führte eine Stimulation von PHC mit Kollagen II und Matrilin-3 zu einer erhöhten IL-6 Freisetzung ^{130,132,245}. Die Proteinasen MMP1 und MMP13, deren Expression durch IL-1- β , TNF- α und IL-6 induziert wird, die wiederum als Schlüsselinterleukine der Arthrose identifiziert wurden ^{117,228,246-248}, sind in der Arthrose im Wesentlichen am Knorpelabbau beteiligt ^{117,249,250}. Für MMP1 wird eine besondere Rolle in der frühen Arthrose vermutet ²⁵¹, während MMP13 in der Arthrose insgesamt exprimiert wird und hohe Expressionslevel für die späte Arthrose typisch sind ^{247,249,251}. Da MMP1 und MMP13 eine starke direkte oder indirekte Induktion durch endogene Knorpelproteine wie Kollagen II und Matrilin-3 zeigen ¹³⁰⁻¹³², wurde ihre Genexpression ebenfalls in dieser Studie untersucht. Die Expression von Kollagen I, Kollagen II und Kollagen X in Chondrozyten kann Aufschluss auf ihren Differenzierungszustand geben. Kollagen II ist das wichtigste Strukturprotein der extrazellulären Knorpelmatrix. Es wird von Chondrozyten exprimiert und gilt als Marker für reifen Knorpel oder Marker der chondrogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen ^{90,94,252-255}. Kollagen I hingegen zählt als Dedifferenzierungsmarker in Chondrozyten ^{256,257}. Die Kollagen-I-Expression erlaubt somit eine Abgrenzung zwischen reifen und dedifferenzierten Chondrozyten. Dies spielt insbesondere bei Experimenten mit PHC eine Rolle. Werden PHC in Zellkultur außerhalb ihrer Knorpelmatrix kultiviert, verlieren sie schnell den Phänotyp eines Chondrozyten (Kollagen-II- und Aggrecan-Expression) und nehmen einen fibroblastenähnlichen Phänotyp an (u. a. Kollagen-I-Synthese anstelle von Kollagen-II-Synthese) ^{257,258}. Im Gegensatz dazu dient

Kollagen X als Marker für die terminale Differenzierung der Chondrozyten^{259,260}. Diese geht der endochondralen Ossifikation an den chondroossären Junctionen voran²⁵⁹ und ist außerdem mit den strukturellen Veränderungen in der Arthrose assoziiert^{261,262}. Neben TGF- β , das einen wichtigen Differenzierungsfaktor für Chondrozyten darstellt^{183,263,264}, wurde auch die Expression von BMP-2, welches durch COMP gebunden wird und auf diese Weise die BMP-2 Aktivität am BMP-2-Rezeptor verstärkt, untersucht²⁶⁵. BMP-2 spielt eine Rolle bei der terminalen Differenzierung von Chondrozyten^{183,185,186}.

Fibronectinfragmente (insbesondere RGD-Motiv tragende Fragmente) führen über die Bindung an $\alpha 5\beta 1$ -Integrine zur MMP-Aktivierung an Chondrozyten und an Fibroblasten und sind mit der Aktivierung der Mitogen-aktivierte-Protein (MAP)-Kinasen, des Nuclear-Factor-kappa-B (NF- κ B)-Signalweges und mit der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (IL-1- β , IL-6, TNF- α und TGF- β) assoziiert²⁶⁶⁻²⁷⁰. Intaktes Fibronectin zeigt diese Aktivitäten jedoch nicht^{266,270}. Auch COMP bindet an Integrinrezeptoren ($\alpha 5\beta 1$ -Integrin, $\alpha 5\beta 3$ -Integrin) und verstärkt auf diese Weise die Adhärenz von Chondrozyten an COMP-tragenden Oberflächen^{271,272}. In der hier vorliegenden Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass COMP, im Gegensatz zu Fibronectinfragmenten, nicht zu einer Aktivierung proinflammatorischer Signalwege und Proteinase in PHC führt. Daher wurde neben nativem (pentamerem) COMP ebenfalls ein COMP-Fragment (monomeres COMP ohne Oligomerisierungsdomäne) zur Stimulation von PHC verwendet. Auch das monomere COMP zeigte keine Aktivierung proinflammatorischer Signalwege und Proteinase in PHC. Der Unterschied zwischen Fibronectin und COMP ließe sich gegebenenfalls durch eine eingeschränkte Aktivität des RGD-Motivs in intaktem oligomeren und monomeren COMP erklären (stereochemische Inhibition durch blockierende Faltung). In kristallographischen Strukturanalysen von COMP zeigte sich ein Teil des RGD-Motivs eingefaltet und nur das Arginin des RGD-Motivs vollständig in Lösung²⁷³. COMP ist das Substrat verschiedener Proteinase, darunter MMP1, MMP3, MMP9, MMP13, MMP19, MMP20, ADAMTS4, ADAMTS7 und ADAMTS12^{113-115,274,275}. Außerdem konnte für COMP eine arthrosespezifisch veränderte Degradation und somit die Entstehung von arthrosespezifischen Neoepitopen nachgewiesen werden^{276,277}. Weitere Studien sind notwendig, um zu verstehen, ob das RGD-Motiv in intaktem COMP ausschließlich die Zelladhäsion, jedoch keine weitere Rezeptoraktivierung erlaubt und ob COMP-Fragmente mit vollständig freiem RGD-Motiv (Neoepitope) in der Lage wären, proinflammatorische Prozesse in Chondrozyten zu aktivieren. Eine neuere Untersuchung zur Aktivierung proinflammatorischer Signalwege im Knorpel durch COMP-Fragmente (knorpeldegradationsassoziierte Neoepitope) konnte jedoch keine solche Aktivität nachweisen²⁷⁸. Bei Untersuchungen zur Tumorzellproliferation und Tumorprogression fanden sich in den letzten Jahren weitere Hinweise auf eine direkte, COMP-vermittelte Signaltransduktion über sowohl den MAP-Kinase-Signalweg als auch über eine mögliche Bindung von COMP an

CD36, ein Thrombospondin-Rezeptor, als auch über den Notch-Signalweg ^{279,280}. Darüber hinaus scheint COMP über den Notch-Signalweg eine Rolle bei der Differenzierung glatter Muskelzellen zu spielen ²⁸¹.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass COMP die Wirkung von TGF- β an humanen Knochenmarksstammzellen verstärkt, indem es zu einer Oligomerisierung des Wachstumsfaktors führt ²⁸². Eine Wirkverstärkung durch COMP-vermittelte Oligomerisierung konnte auch für den Wachstumsfaktor BMP-2 gezeigt werden ²⁶⁵. Daher wurden in dieser Studie PHC und Knorpelimplantate mit COMP mit und ohne TGF- β inkubiert und anschließend mittels Immunoassay die IL-6-Freisetzung untersucht. Die Stimulation von PHC mit TGF- β führte zu einer Erhöhung der IL-6-Freisetzung und wurde durch Kostimulation mit COMP verstärkt. Somit konnte gezeigt werden, dass COMP auch an PHC die TGF- β Wirkung verstärken kann. Dies ist bedeutsam für die Arthrose, da sowohl für COMP als auch für TGF- β eine verstärkte Expression im Verlauf der Arthrose nachgewiesen wurde ²⁸³⁻²⁸⁶. TGF- β verstärkt die Expression von COMP in Knorpelvorläuferzellen ²⁸⁷. Sollte TGF- β auch in vivo die COMP-Expression verstärken und somit wiederum seine eigene Wirkung (u. a. IL-6 Expression) potenzieren können, käme es zu einem positiven, proinflammatorischen Rückkopplungsmechanismus. Lange Zeit wurde TGF- β eine ausschließlich anabole Wirkung an Chondrozyten zugeschrieben und der Einsatz von TGF- β zur Knorpelregeneration diskutiert ¹⁸⁷. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass TGF- β in Abhängigkeit von den auf den Chondrozyten exprimierten Rezeptoren unterschiedliche Wirkungen entfaltet ^{183,184}. Bindet TGF- β an den Activin-receptor-like-kinase (ALK)-5-Rezeptor, kommt es zur Chondrogenese ^{184,288}. Die Bindung von TGF- β an den im Alter und in der Arthrose stärker exprimierten ALK-1-Rezeptor wird hingegen mit einer verstärkten Expression von MMP-13 und der terminalen Differenzierung von Chondrozyten in Verbindung gebracht ^{183,184,289}. In jungen Chondrozyten überwiegen die ALK4/5/7 Rezeptoren für TGF- β mit subsequenter Smad2/3-Phosphorylierung und folgender Inaktivierung des Runx related Transcription Factor (RUNX)-2, sodass die Terminaldifferenzierung der Chondrozyten unterbunden wird ¹⁸³. In gealterten Chondrozyten bzw. Chondrozyten aus arthrotischem Knorpel bindet TGF- β an die Rezeptoren ALK1/2/3/6 mit subsequenter Smad1/5/8-Phosphorylierung. Durch die darauffolgende RUNX-2-Aktivierung kommt es dann zur Terminaldifferenzierung ¹⁸³. Für diese altersabhängige bzw. arthroseassoziierte Veränderung in der TGF- β -Signaltransduktion spielt der Wnt-Signalweg eine zentrale Rolle ^{182,290}. Interessanterweise werden Mediatoren dieses Signalweges aktuell als Target-Kandidaten für Krankheitsverlauf modifizierende, pharmakologische Therapien diskutiert, darunter auch der Selektive-Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitor (SNRI) Fluoxetin ²⁹¹⁻²⁹³. Darüber hinaus wurden SNRIs bereits in verschiedenen klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit zur Schmerzreduktion bei einer Arthrose untersucht und Daten aus einer aktuellen Metaanalyse legen eine Wirksamkeit bei einer Arthrose nahe ²⁹⁴. Es werden jedoch

weitere von der Pharmaindustrie unabhängige klinische Studien zur Verifikation des schmerzlindernden Effektes von SNRIs bei einer Arthrose gefordert ²⁹⁴.

Zur Untersuchung eines Einflusses von COMP auf die differenzielle Genexpression von Chondrozyten wurden auch humane Knorpelimplantate verwendet. Knorpelimplantate werden hergestellt, indem Knorpel in kleine Würfel geschnitten wird und diese in Kulturmedium kultiviert werden. Bei Knorpelimplantaten handelt es sich daher um ein ex-vivo-System, in dem die Chondrozyten in ihrer dreidimensionalen, extrazellulären Matrix untersucht werden können. Die Implantate wurden mit COMP, TGF- β oder mit IL-1- β inkubiert und anschließend mittels Immunoassay auf eine veränderte IL-6-Freisetzung untersucht. In den Knorpelimplantaten verursachte jedoch nur eine Inkubation mit IL-1- β eine erhöhte IL-6-Freisetzung. Eine Inkubation mit TGF- β mit oder ohne COMP führte an den Knorpelimplantaten nicht zu einer erhöhten IL-6-Expression. Warum sich PHC anders als Knorpelimplantate verhalten ist unklar. Die extrazelluläre Knorpelmatrix stellt bereits unabhängig von Matrixprotein-Interaktionen eine mögliche Diffusionsbarriere für COMP und andere Moleküle mit einem hohen Molekulargewicht dar ²⁹⁵. COMP liegt im Knorpel gebunden an Kollagen II und andere Matrixproteine (Matrilin, Aggrecan) vor ^{104-106,273,296} und bindet auch Wachstumsfaktoren wie TGF- β ²⁸². Somit könnte im Knorpel bereits vorhandenes COMP freies TGF- β binden und es in der Matrix festhalten. Ebenfalls könnte das freie und mit TGF- β assoziierte COMP in der Matrix durch die Interaktion mit Kollagen II, Matrilin-3 und Aggrecan immobilisiert werden. Dadurch gelänge TGF- β nicht an die Rezeptoren auf den Chondrozyten, um seine Wirkung entfalten zu können. IL-1- β hingegen konnte wahrscheinlich auf Grund seiner geringen Größe von ca. 17 kDa ²⁹⁷ und ohne bekannte Bindungspartner in der extrazellulären Matrix ²⁹⁸ frei durch die Knorpelmatrix zu den Chondrozyten diffundieren. Somit führte eine Inkubation von Knorpelimplantaten mit IL-1- β zu einer Erhöhung der IL-6-Freisetzung.

Für die isolierte Untersuchung der Wirkung von COMP auf PHC im Sinne einer direkten Protein-Zellrezeptor-Interaktion mussten sowohl die PHC als auch COMP in reiner und freier Form vorliegen. Die PHC wurden durch Verdau der extrazellulären Knorpelmatrix aus dieser befreit, gewaschen und dann als Monolayerkultur kultiviert. Zur Minimierung des Dedifferenzierungsrisikos ²⁵⁶⁻²⁵⁸ wurden die PHC nach einer Passage (Umsetzen der Zellen von einer in eine andere Zellkulturflasche) für die Zellkulturexperimente verwendet. COMP wurde rekombinant in einem eukaryotischen Expressionssystem (humane 293-Ebstein-Barr-Nukleäres-Antigen (EBNA)-Zellen) hergestellt. Die Expression von COMP in einem eukaryotischen Expressionssystem soll eine möglichst natürliche Glykosylierung gewährleisten ²⁹⁹. Dies ist von zentraler Bedeutung für die Bioaktivität, Stabilität und die Immunogenität von rekombinant hergestellten Proteinen ²⁹⁹. Nach der Aufreinigung wurde die Reinheit und Identität von COMP mittels Natriumdodecylsulfat-

Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung sowie mittels Immunoblot geprüft und mit aus humanem Knorpel stammendem COMP verglichen. Darüber hinaus wurde eine Kontamination des rekombinant hergestellten COMP mit Lipopolysaccharid (LPS) mittels limulus-amebocyte-lysate (LAL)-QCL-1000-Test (Lonza, Basel, Schweiz) ausgeschlossen. Für Untersuchungen an der zellulären Signaltransduktion und Zelldifferenzierung ist der Ausschluss einer LPS-Kontamination von besonderer Wichtigkeit³⁰⁰. LPS zählt zu den stärksten bekannten Induktoren proinflammatorischer Signaltransduktionskaskaden und ruft über den Toll-like-Rezeptor (TLR)-4 mit NF- κ B-Aktivierung in allen TLR-4 tragenden Zellen die Ausschüttung von TNF- α , IL-1- β , IL-6 und IL-8 hervor³⁰¹⁻³⁰³. Bei der Aufkonzentrierung von Strep-markierten, rekombinanten Proteinen über eine Streptactin-Säule muss eine Kontamination mit LPS bedacht werden. Das für die Streptactin-Säule verwendete Streptactin wird in *Escherichia coli* (Bakterien) hergestellt und kovalent an eine Agarose-Matrix gekoppelt³⁰⁴. Bei der Präparation kann es daher abhängig von der jeweiligen Charge zu einer Anreicherung von LPS in der Agarose-Matrix kommen und dadurch können Proteineluate mit LPS kontaminiert werden.

Zur Untersuchung des Einflusses von COMP auf die Interleukin-Freisetzung von PHC wurde IL-6 im Überstand der PHC mittels Immunoassay bestimmt. IL-6 spielt zusammen mit IL-1- β , TNF- α und TGF- β eine zentrale regulatorische Rolle in der Arthrose^{117,226-229,305}. Dabei zeigt IL-6 eine IL-1- β , TNF- α und TGF- β abhängige Expression^{227,306}. In anderen Studien fand sich eine deutliche IL-6-Induktion durch endogene Matrixmoleküle^{130-132,245,266}, weshalb IL-6 auch in dieser Studie als „Markerinterleukin“ verwendet wurde. Bei der Bestimmung von IL-6 ist auf eine zügige Aufarbeitung der gewonnenen Proben zu achten, da IL-6 eine geringe biologische Stabilität und kurze Halbwertszeit hat³⁰⁷.

Neben der Untersuchung einer veränderten Proteinfreisetzung mittels Immunoassay wurde der Einfluss von COMP auf die differenzielle Genexpression von PHC untersucht. Die Untersuchung mittels qPCR bietet den Vorteil mit einem geringen Zeit- und Kostenaufwand eine Veränderung in der Transkription mehrerer Gene zu untersuchen. Weitere Methoden der Expressionsanalyse auf Proteinebene wären eine 2D-Gelelektrophorese³⁰⁸ oder massenspektrometrische Untersuchungen von Chondrozyten- und Knorpellysaten gewesen³⁰⁹. Insbesondere Massenspektrometrie-basierte Proteomanalysen sind in der Lage mit größerer Sicherheit zunächst unbekannte Veränderungen in biologischen Systemen aufzudecken³⁰⁹.

Eine Einschränkung dieser Studie ist die Tatsache, dass zur Stimulation von humanen Chondrozyten murines COMP verwendet wurde. Ein Vergleich der Primärstruktur von murinem und humanem COMP (UniProtKB: P35444 und P49747) zeigt eine Übereinstimmung von 90 % und eine Ähnlichkeit von 93,1 % (siehe Anhang 1). In früheren Studien konnte eine Modulation der Genexpression von PHC durch Kollagen II aus Huhn und durch murines

Matrilin-3 nachgewiesen werden ^{130-132,245}. Eine biologische Aktivität des murinen COMP an humanen Chondrozyten erscheint daher als sehr wahrscheinlich. So zeigte in der hier vorliegenden Studie eine Kostimulation von PHC mit humanem TGF- β und murinem COMP eine höhere IL-6-Freisetzung als die alleinige Inkubation von PHC mit humanem TGF- β . Dies bestätigt die Annahme der biologischen Wirksamkeit/Bindungsfähigkeit von murinem COMP an humane Proteine und Zellrezeptoren.

4.2. Schlussfolgerung aus der Studie zu Chondrozyten-COMP-Interaktionen

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass COMP alleine keinen unmittelbaren Einfluss auf die differenzielle Genexpression von PHC nimmt, wie dies für andere endogene Knorpelmatrixproteine gezeigt wurde ^{130-132,245,266-268,270}. Die gemeinsame Inkubation von PHC mit COMP und TGF- β führte jedoch zu einer stärkeren IL-6-Freisetzung als die Stimulation von PHC mit TGF- β allein. Daher konnte eine kooperative Wirkung von COMP und TGF- β auf PHC, wie sie in anderen Zelltypen beschrieben wurde ^{282,310}, bestätigt werden. Wird die veränderte TGF- β -Signaltransduktion bei einer Arthrose berücksichtigt ^{183,184,289}, könnte COMP somit zu einer Verstärkung der TGF- β -abhängigen Prozesse im Rahmen einer Arthrose führen.

4.3. Identifizierung Arthrose-assoziiertes Antikörper: Definition einer autoimmun-Arthrose anhand neuer serologischer Biomarker?

Proinflammatorische Zytokine, eine MMP- und ADAMTS-vermittelte Degradation der Knorpelmatrix, die Invasion von Immunzellen in die Synovia und die Aktivierung der angeborenen Immunität sowie die Knorpelmatrix-Komplement-Interaktionen wurden bereits im Rahmen der Pathophysiologie einer Arthrose beschrieben. Um eine humorale, adaptive Immunantwort im Rahmen einer Arthrose zu untersuchen, wurde Serum auf die Existenz von Arthrose-assoziierten Antikörpern untersucht (explorative Querschnittsstudie). Zum Nachweis von Antikörpern gegen Matrilin-3, Kollagen II, Kollagen VI, Fibrillin-2, CLEC3A, Tetranectin, TSP-4 und COMP wurden diese durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot mit Serum als Erstantikörper analysiert. Bei Matrilin-3, Kollagen II, CLEC3A und COMP handelt es sich um Proteine, die in erster Linie im Knorpel exprimiert werden. Kollagen VI, Fibrillin-2 und TSP-4 stellen weitere extrazelluläre Matrixproteine dar, die ebenfalls im Knorpel oder in der Knorpelgenese eine Rolle spielen und bei Tetranectin handelt es sich um einen nahen Verwandten von CLEC3A. Die Prävalenz der Antikörper bei PatientInnen mit einer Arthrose wurde mit der Prävalenz der Antikörper bei RA-PatientInnen und gesunden ProbandInnen verglichen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen fanden sich für Antikörper gegen TSP-4, COMP, Kollagen II und CLEC3A.

Dass Antikörper gegen Komponenten der extrazellulären Knorpelmatrix im Rahmen einer Arthrose eine Rolle spielen könnten, wurde bereits in den 1980er Jahren vermutet ³¹¹. So konnten bei PatientInnen mit einer Arthrose Antikörper gegen ein Chondrozyten-Membranextrakt nachgewiesen werden ³¹¹. Die Zielantigene aus dem Chondrozyten-Membranextrakt konnten bis heute nicht identifiziert werden. In der hier vorliegenden Studie zeigten sich Antikörper gegen TSP-4 signifikant häufiger bei PatientInnen mit einer Arthrose als bei den gesunden Kontrollen. Der Nachweis von TSP-4-Antikörpern könnte folglich die Diagnose einer Arthrose unterstützen. Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass bei PatientInnen mit einer Arthrose die TSP-4-Expression im Knorpel mit dem Knorpelschaden positiv korreliert ²²³. Darüber hinaus fanden sich Hinweise auf arthrosespezifische TSP-4-Neopeptide, die für eine veränderte Degradation von TSP-4 im Rahmen einer Arthrose im Vergleich zum natürlichen Gewebeumsatz sprechen ²²³. Unlängst konnte gezeigt werden, dass TGF- β ein Regulator der TSP-4-Expression ist und dass TSP-4 seinerseits die TGF- β -Wirkung moduliert ²¹⁷. TGF- β wiederum spielt eine zentrale Rolle im Rahmen der Pathophysiologie der Arthrose ^{182-184,187}. Ähnlich zu TSP-4 finden sich auch für COMP (TSP-5) und COMP-Fragmente erhöhte Konzentrationen im Knorpel, in der Synovia und im Serum von PatientInnen mit einer Arthrose ¹⁰⁸⁻¹¹⁰. COMP zeigt ebenfalls einen modulierenden (verstärkenden) Einfluss auf die Wirkung von TGF- β ²⁸². In der hier vorliegenden Studie wurden Antikörper gegen COMP häufiger bei ProbandInnen mit einer Arthrose als bei den

gesunden ProbandInnen nachgewiesen. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Auch Antikörper gegen CLEC3A wurden häufiger bei PatientInnen mit einer Arthrose nachgewiesen als bei gesunden ProbandInnen. Dieser Unterschied war ebenfalls nicht statistisch signifikant. Insgesamt konnten Antikörper gegen extrazelluläre Matrixproteine häufiger bei PatientInnen mit einer Arthrose als bei den gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Dieser Unterschied war statistisch hoch signifikant. Somit könnte die Untersuchung von Antikörpern gegen TSP-4, COMP und CLEC3A die diagnostische Sensitivität zum Nachweis einer Arthrose deutlich erhöhen.

Die Entstehung von lokalen und/oder systemischen Arthrose-assoziierten Autoantikörpern gegen extrazelluläre Matrixproteine ließe sich wie folgt erklären. Die Pathophysiologie der Arthrose ist durch eine chronische, niedrigschwellige inflammatorische Komponente geprägt^{9,23,33,42,43,57,117,225,228-230,233,235,236,240,250}. Hervorzuheben ist eine erhöhte Expression von IL-1- β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α ²²⁶⁻²²⁹, IL-17^{312,313}, IL-22³¹⁴ und eine veränderte beziehungsweise eine erhöhte Aktivität von TGF- β ^{183,184,187,261,289}. Die überwiegend milde Synovialitis einer Arthrose^{42,43,55,235} ist histomorphologisch durch die Invasion von aktivierten Makrophagen, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten gekennzeichnet^{243,315-319}. Insbesondere IL-6 und IL-10 spielen eine wichtige Rolle in der B-Zell-Aktivierung und -Proliferation sowie bei der Immunglobulinsynthese³²⁰⁻³²⁶. Plasmazellen (aktivierte B-Zellen) in der Synovialflüssigkeit von PatientInnen mit einer Arthrose sind ihrerseits ursächlich für erhöhte IL-6-Konzentrationen im Gelenk von PatientInnen mit einer Arthrose³²⁷. Zusätzlich wurde eine positive Korrelation zwischen der IL-6-Konzentration im Gelenk und einer intraartikulären Immunglobulinsynthese bei PatientInnen mit entzündlichen Gelenkerkrankungen nachgewiesen³²⁸. IL-6 ist darüber hinaus in der Lage, durch die Induktion von IL-4 in CD4-positiven T-Zellen, diese zu Typ 2 T-Helferzellen (T_H2-Zellen) zu differenzieren³²⁹. Das Fehlen von IL-6 führte im Tierversuch zu einem Mangel an T_H2-Zellen³³⁰. T_H2-Zellen wiederum spielen eine zentrale Rolle in der B-Zell-Differenzierung zu Plasmazellen³³¹⁻³³³. Darüber hinaus konnte für IL-17 und IL-22 gezeigt werden, dass sie zusammen mit TGF- β und IL-6 T-Helferzellen vom Typ 17 (T_H17-Zellen) aktivieren^{334,335}. T_H17-Zellen sekretieren wiederum IL-17 und IL-22 und T_H17-Zellen spielen eine Rolle in der Regulation bzw. Induktion von Autoimmunität³³⁴⁻³³⁶. Im Rahmen der RA hat die Aktivierung von T_H17-Zellen und ihre Sekretion von IL-21 und IL-22 eine zentrale Rolle in der Induktion von Plasmazellen zur Produktion von pathogenetisch wirksamen Autoantikörpern gegen citrullinierte Matrixproteine³³⁶. Angestoßen durch die Wirkungen der verschiedenen Interleukine kommt es zu einer Aktivierung von knorpelabbauenden Enzymen: darunter MMP1, MMP3, MMP13^{33,34,117,227} sowie ADAMTS4 und ADAMTS5^{33,116,231-233}. Somit kommen im Gelenk von ArthrosepatientInnen Antigene (extrazelluläre Matrixproteine und Matrixprotein-Fragmente), antigenpräsentierende Zellen, die notwendigen B- und T-Zellen sowie die für eine Antikörperbildung essenziellen Interleukine in einem insgesamt

proinflammatorischen Mikromilieu zusammen. Ob Autoantikörper gegen extrazelluläre Matrixproteine im Rahmen einer Arthrose eine konkrete pathophysiologische Rolle spielen oder ob sie lediglich als Folge der lokalen Aktivierung des Immunsystems phänomenologisch nachgewiesen werden können, muss jedoch durch weitere Studien geklärt werden.

Die Verlaufsformen einer Arthrose unterscheiden sich hinsichtlich der Progressionsgeschwindigkeit, durch die Schwere der Symptomatik, durch Gelenkprozesse mit oder ohne akut-entzündliche Episoden und durch einen konstanten Verlauf oder einen Verlauf in Schüben^{49,69}. Biochemische Biomarker einer Arthrose, die mit einer spezifischen Pathophysiologie (molekularer Endotyp) und mit einem bestimmten klinischen Erscheinungsbild (klinischer Phänotyp) korrelieren, nehmen eine immer zentralere Rolle hinsichtlich einer Untergliederung der Arthrose in Subtypen ein²³⁷. Eine solche Unterscheidung in Arthrosesubtypen oder molekulare Endotypen erscheint insbesondere für individuelle, verlaufsmodifizierende Therapien von essentieller Bedeutung zu sein^{237,238}. In der Therapie stellt die Reduktion der beeinflussbaren ätiologischen Risikofaktoren eine zentrale Rolle dar⁶⁵. Der in der hier vorliegenden Studie erbrachte Nachweis von Antikörpern gegen extrazelluläre Matrixproteine im Rahmen einer Arthrose legt somit einen autoimmunen oder Autoantikörper-assoziierten Arthrosesubtyp nahe. So konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass Immunkomplexe aus COMP und Kollagen II im Mausmodell in der Lage sind, direkt mittels Fc-Rezeptoren auf freien Nervenendigungen Schmerzen auszulösen³³⁷. Diese Schmerzinduktion war unabhängig von anderen typischen Schmerztriggern³³⁷. Die in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Antikörper gegen extrazelluläre Matrixmoleküle, insbesondere Antikörper gegen TSP-4, COMP und gegen CLEC3A, könnten somit eine mögliche Ursache für eine stärkere Schmerzsymptomatik bei ArthrosepatientInnen mit autoimmuner Krankheitskomponente sein. In diesem Zusammenhang sollten insbesondere PatientInnen mit stark symptomatischen (Poly-) Arthrosen in weiteren Studien auf die Präsenz der hier beschriebenen Antikörper untersucht werden. Darüber hinaus könnten PatientInnen mit einer Autoantikörper-assoziierten Arthrose gegebenenfalls von einer (lokalen) immunmodulatorischen/immunsuppressiven Therapie profitieren. Solche therapeutischen Ansätze könnten umso effektiver sein, je mehr unterschiedliche Autoantikörper ArthrosepatientInnen zeigen, je höher die Titer solcher Autoantikörper und je höher die Affinitäten solcher Autoantikörper gegen bestimmte extrazelluläre Matrixproteine wären. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Kortison in Plasmazellen bei proinflammatorischer Kostimulation in der Lage ist, die Antikörpersynthese zu verstärken³³⁸. So fand sich im Rahmen einer Studie zur intraartikulären Kortisontherapie an PatientInnen mit einer RA eine deutliche und rasche Verschlechterung des radiologischen Gelenkbefundes nach intraartikulärer Kortisonapplikation im Verlauf³³⁹. Pathophysiologisch relevante Autoantikörper gegen extrazelluläre Matrixproteine könnten nun eine weitere Erklärung für

diese Beobachtung darstellen. Somit stellt sich die Frage, ob bei PatientInnen mit einer Autoantikörper-assoziierten Arthrose eine intraartikuläre Kortisongabe kontraindiziert sein könnte.

Bei den in der hier vorliegenden Studie beschriebenen Antikörpern gegen extrazelluläre Matrixproteine im Serum der Probanden handelt es sich um IgG-Antikörper. Außerdem wurden initial (Vorversuche) auch IgM-Antikörper gegen extrazelluläre Matrixproteine untersucht. Da sich jedoch bei den IgM-Antikörpern keine arthrosespezifischen Assoziationen zeigten, wurden diese Untersuchungen nicht weiterverfolgt.

In der hier vorliegenden Studie wurden neben PatientInnen mit einer Arthrose und gesunden ProbandInnen auch PatientInnen mit einer RA auf die Prävalenz von Antikörpern gegen Matrilin-3, Kollagen II, Kollagen VI, Fibrillin-2, CLEC3A, Tetranectin, TSP-4 und COMP untersucht. Antikörper gegen TSP-4, COMP und CLEC3A zeigten sich bei PatientInnen mit einer RA häufiger als bei den gesunden Kontrollen. Die Unterschiede waren signifikant bis hochsignifikant. Der Unterschied von RA- und ArthrosepatientInnen hinsichtlich der Prävalenz an Antikörpern gegen extrazelluläre Matrixproteine wurde im Rahmen der hier vorliegenden Studie nicht weiter vertieft, da der Fokus auf der Identifizierung von Arthrose-assoziierten Antikörpern lag und Autoantikörper gegen extrazelluläre Matrixproteine im Rahmen einer RA keine Neuheit darstellen ^{340,341}. Im Verlauf einer RA wurden bisher Autoantikörper gegen (citruillinierte) extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin und Kollagene beschrieben ^{341,342}. Solche und weitere Autoantikörper gewinnen in der RA eine pathogenetische Wirksamkeit durch eine veränderte Glykosylierung am Fc-Fragment, die sie von natürlichen und nicht pathogenen Autoantikörpern unterscheidet ³³⁶. In der hier vorliegenden Studie wurden TSP-4, COMP und CLEC3A als Autoantigene in der RA erstmalig beschrieben. Im Tiermodell entwickeln mit COMP immunisierte Mäuse im Verlauf eine chronische Arthritis, die der Kollagen-induzierten-Arthritis (CIA) ähnelt ^{343,344}. Der Nachweis von Antikörpern gegen TSP-4, COMP und CLEC3A erlaubte im Rahmen dieser Studie eine sichere Unterscheidung zwischen gesunden ProbandInnen und RA-PatientInnen. Bei allen RA-PatientInnen konnten Antikörper gegen TSP-4, COMP oder CLEC3A nachgewiesen werden. Der Goldstandard in der serologischen RA-Diagnostik, der Nachweis von Antikörpern gegen citruillinierte Proteine mit Hilfe des anti-zyklisch-citruillinierten Peptid (ACCP)-Tests, zeigt lediglich eine Sensitivität von 70 bis 80 Prozent jedoch mit einer exzellenten Spezifität von nahezu 100 Prozent ³⁴⁵⁻³⁴⁷. Somit stellt sich die Frage, ob die Antikörper gegen COMP, TSP-4 und CLEC3A gegebenenfalls einen zusätzlichen Beitrag zur Diagnostik einer RA leisten könnten. In der hier vorliegenden Studie lässt sich die diagnostische Spezifität und Sensitivität der Antikörper gegen TSP-4, COMP und CLEC3A für die Diagnose einer Arthrose oder einer RA jedoch nicht abschließend beurteilen. Insgesamt könnte der Nachweis von Antikörpern gegen TSP-4,

COMP und CLEC3A zur Diagnose einer Arthrose nach klinisch-serologischen Ausschluss einer RA Verwendung finden.

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie zeigten sich Antikörper gegen Kollagen II bei den gesunden ProbandInnen häufiger als bei den PatientInnen mit einer Arthrose oder einer RA. In anderen Studien konnten hingegen Antikörper gegen Kollagen II im Rahmen einer RA nachgewiesen werden^{341,342}. Eine weitere Studie beschrieb jedoch das Auftreten von Kollagen IX- und Kollagen XI-Antikörpern bei PatientInnen mit einer Arthrose und zeigte, dass Kollagen II-bindende Antikörper (IgG) bei PatientInnen mit einer Arthrose bis zu 10 Prozent des gesamten Immunglobulin G des Patienten ausmachen können³¹¹. In weiteren Studien an PatientInnen mit einer RA und PatientInnen mit weiteren Gelenkerkrankungen bzw. Erkrankungen mit Gelenkbeteiligung fanden sich deutlich höhere Prävalenzen an Antikörpern gegen denaturierte (milde Denaturierung bei 46 °C für 20 Minuten) Kollagene als an Antikörpern gegen native Kollagene^{348,349}. Dieser Effekt zeigte sich für alle Untersuchungsgruppen^{348,349}. Antikörpern gegen native Kollagene wurde jedoch eine höhere pathogenetische Rolle für die RA beigemessen^{348,349}. Der Antikörpernachweis in der hier vorliegenden Studie wurde an stark denaturierten Proteinen (95 °C & SDS für 5 Minuten, Immunoblot) durchgeführt. Möglicherweise führte die Denaturierung im Fall von Kollagen II zu einem Verlust der typischen immunogenen Epitope, die bei PatientInnen mit einer RA eine Rolle spielen. Darüber hinaus könnte die starke Denaturierung von Kollagen II zu einer Zugänglichkeit von normalerweise verdeckten Epitopen geführt haben, an die immunregulative (unspezifisch bindende oder kreuzreagierende und niedrigaffine) Antikörper der „gelenkgesunden“-Probanden binden konnten^{350,351}. So fanden sich bei Untersuchungen zur Kollagen II-induzierten Proliferation von T-Zellen bei PatientInnen mit einer RA und gesunden ProbandInnen bei 36 % der gesunden ProbandInnen (ohne Nachweis von Kollagen II-Antikörpern im Serum) eine Kollagen II-induzierte Stimulation von T-Zellen, wohingegen RA-PatientInnen ohne Nachweis von Kollagen II-Antikörpern im Serum in lediglich 5 Prozent der Fälle eine solche T-Zell-Stimulation zeigten³⁵². Ursächlich für dieses Phänomen wurde eine unvollständige (Thymus-vermittelte) Toleranz naiver T-Zellen gegen Kollagen II angenommen³⁵². Insgesamt könnte somit der Nachweis von Kollagen II-Antikörpern mittels Immunoblot, wie er in der hier vorliegenden Studie durchgeführt wurde, dem Ausschluss einer degenerativen Gelenkerkrankung dienen.

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie zeigten sich Matrilin-3-spezifische Antikörperreaktivitäten bei allen ProbandInnen. Unterschiede zwischen einzelnen ProbandInnen hinsichtlich ihrer Antikörpersignale – und insbesondere fehlender Signale (interne Negativkontrolle) gegen ein spezifisches Protein – qualifizieren die tatsächlich gefundenen Signale als antikörperspezifische Signale. Für Matrilin-3 finden sich diese Unterschiede nicht. Ob dies bei Matrilin-3 durch einen Präparationsartefakt, durch eine

ubiquitäre Kreuzreaktion zu erklären ist oder aber ob tatsächlich alle ProbandInnen Antikörper gegen Matrilin-3 besitzen, bleibt somit offen. Weiterhin muss darauf hingewiesen werden, dass es sich bei dem hier verwendeten Matrilin-3-Konstrukt um ein Matrilin-3 ohne Oligomerisierungsdomäne (Monomer) handelt. Durch die fehlende Domäne im Proteinkonstrukt könnten im nativen Protein nicht vorkommende Neoepitope eine Rolle gespielt haben. Eine Kontrolle dieser Hypothese durch die Verwendung eines nativen Matrilin-3 konnte im Rahmen dieser Studie jedoch nicht weiterverfolgt werden.

Bei der hier durchgeführten Studie handelt es sich um eine explorative, prospektive Beobachtungsstudie. Eine wichtige Einschränkung der Studie liegt in der niedrigen ProbandInnenzahl. Für konfirmatorische Studien hingegen ist es üblich, mit einer a-priori Fallzahlanalyse eine Power von $\geq 80\%$ vorzusetzen. In der hier vorliegenden Studie wird für die Untersuchung von TSP-4-Antikörpern als Unterscheidungsmerkmal zwischen PatientInnen mit einer Arthrose und Gelenkgesunden post-hoc eine Power von 62,3% erreicht (mit je 10 ProbandInnen in der Arthrosegruppe und in der gesunden Kontrollgruppe, einem zweiseitigen Fisher-Exakt-Test, einem Signifikanzniveau von 5% und einer Prävalenz von 50% TSP-4-Antikörpern in der Arthrosegruppe gegen eine Prävalenz von 0% TSP-4-Antikörpern in der gesunden Kontrollgruppe; G*Power, Version 3.1.9.2³⁵³). Eine weitere Einschränkung in der hier vorliegenden Studie lag in einem signifikanten Altersunterschied zwischen den Untersuchungsgruppen. Die Proben für alle drei Untersuchungsgruppen entstammen einer kleineren Biobank mit eingeschränkten Möglichkeiten zur Bereitstellung von sogenannten „matched controls“ (PatientInnen- und Kontrollgruppen, die sich hinsichtlich ihrer Einflussfaktoren gleichen). Die quantitativen Ergebnisse der hier vorliegenden Studie machen nun jedoch erstmals eine a-priori Fallzahlanalyse für eine konfirmatorische Studie möglich. Weiter müssen für eine entsprechende konfirmatorische Studie die Untersuchungsgruppen hinsichtlich ihrer Einfluss- und Risikofaktoren abgeglichen (matched controls) werden. Sollte kein ausreichendes „Matching“ möglich sein, muss die Fallzahl so gewählt werden, dass Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht und Risikofaktoren für eine Arthrose hinsichtlich ihres attributiven Effekts für das Vorkommen der verschiedenen Antikörper modelliert werden können. Abschließend ist auf Grund der unterschiedlichen Antikörper, die getestet wurden und aus den daraus resultierenden kombinatorischen Möglichkeiten das Problem der α -Fehler-Kumulierung zu berücksichtigen. Beim Testen von 100 Hypothesen auf Basis eines Datensatzes mit einem Signifikanzniveau von 5% wären fünf Hypothesen zu erwarten, die fälschlich als signifikant angenommen würden. Eine Möglichkeit zur Kontrolle der α -Fehler-Kumulation bestünde in der Bonferroni-Holm-Korrektur^{354,355}.

Der Nachweis von Antikörpern in PatientInnen- und Kontrollseren erfolgte in der hier vorliegenden Studie mittels Immunoblot. Hierfür wurden Matrilin-3, Kollagen II, Kollagen VI, Fibrillin-2, CLEC3A, Tetranectin, TSP-4 und COMP mittels Immunoblot mit Serum als

Erstantikörper sowie Antihumanglobulin als Zweitantikörper analysiert. Der Nachweis der Antikörper mittels Immunoblot liefert eine sehr sichere Unterscheidung zwischen proteinspezifischen und artifiziellen Signalen ³⁵⁶. Ein Nachteil liegt jedoch in dem hohen Kosten- und Zeitaufwand sowie einer eingeschränkten Quantifizierbarkeit der Ergebnisse. Ein Immunoassay (ELISA-Style-Assay) hingegen hat den Vorteil einer sehr guten Quantifizierbarkeit der gemessenen Signale, den Vorteil mit nativen Proteinen arbeiten zu können und er ist weniger kosten- und zeitintensiv in der Abarbeitung ³⁵⁶. Der Nachteil eines Immunoassay liegt jedoch in einer wesentlich niedrigeren Signalspezifität (mehr falsch-positive Signale) und einer höheren Kontaminationsanfälligkeit ³⁵⁶.

In der hier vorliegenden Studie wurde auch mittels Immunoassay (ELISA-Style-Assay) nach Arthrose-assoziierten Antikörpern gesucht. Es zeigte sich jedoch nur eine mäßige Korrelation zwischen den Ergebnissen der Immunoblots und der Immunoassay. Erklärend für den Unterschied zwischen Immunoblot und Immunoassay könnten Kontaminationen der Proteinpräparationen sein (u.a. LPS), die im Immunoblot nicht nachweisbar waren. Eine weitere mögliche Ursache für die mäßige Korrelation zwischen Immunoblot und Immunoassay könnte darin liegen, dass im Immunoassay native Proteine verwendet wurden. Im Rahmen von degenerativen Gelenkerkrankungen werden die Proteine jedoch mechanisch und durch Proteinase degradiert. Mögliche Neoepitope werden im nativen Protein gegebenenfalls nicht präsentiert, jedoch durch die Denaturierung in der SDS-PAGE.

4.4. Schlussfolgerung aus der Studie zur Identifizierung Arthrose-assoziiierter Antikörper

Zusammenfassend wurde in dieser Studie eine erhöhte Prävalenz von Autoantikörpern gegen TSP-4, COMP und CLEC3A im Serum von PatientInnen mit einer Arthrose im Vergleich zu gesunden ProbandInnen gezeigt. Ausgehend von diesen Ergebnissen könnte der Nachweis von Autoantikörpern gegen TSP-4, COMP und CLEC3A die Diagnose einer Arthrose unterstützen. Weiterhin legen die in dieser Studie vorliegenden Ergebnisse nahe, dass es eine autoimmune bzw. Autoantikörper-assoziierte Arthrose als weiteren Arthrosesubtyp (Endotyp) gibt. Bei PatientInnen mit einer autoimmunen Arthrose könnten immunmodulatorische beziehungsweise immunsuppressive Therapien erfolgreich sein.

5. Literaturverzeichnis

1. Ruthard J, Kamper M, Renno JH, et al. COMP does not directly modify the expression of genes involved in cartilage homeostasis in contrast to several other cartilage matrix proteins. *Connective tissue research* 2014; 55(5-6): 348-56.
2. Ruthard J, Hermes G, Hartmann U, et al. Identification of antibodies against extracellular matrix proteins in human osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 503(3): 1273-7.
3. Litwic A, Edwards MH, Dennison EM, Cooper C. Epidemiology and burden of osteoarthritis. *British Medical Bulletin* 2013; 105(1): 185-99.
4. van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis* 1989; 48(4): 271-80.
5. Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage* 2011; 19(11): 1270-85.
6. Nuesch E, Dieppe P, Reichenbach S, Williams S, Iff S, Juni P. All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip osteoarthritis: population based cohort study. *BMJ* 2011; 342: d1165.
7. Merx H, Dreinhöfer KE, Günther KP. Sozialmedizinische Bedeutung der Arthrose in Deutschland. *Z Orthop Unfall* 2007; 145(04): 421-9.
8. Michael JW, Schluter-Brust KU, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107(9): 152-62.
9. Sandell LJ. Etiology of osteoarthritis: genetics and synovial joint development. *Nature Reviews Rheumatology* 2012; 8: 77.
10. Cross M, Smith E, Hoy D, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2014; 73(7): 1323-30.
11. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, et al. Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly. The framingham study. *Arthritis & Rheumatism* 1997; 40(4): 728-33.
12. Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 1987; 30(8): 914-8.
13. Manninen P, Riihimäki H, Heliovaara M, Makela P. Overweight, gender and knee osteoarthritis. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 1996; 20(6): 595-7.
14. Sharma L, Song J, Dunlop D, et al. Varus and valgus alignment and incident and progressive knee osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2010; 69(11): 1940-5.
15. Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang N-Y, Wigley FM, Klag MJ. Joint Injury in Young Adults and Risk for Subsequent Knee and Hip Osteoarthritis. *Annals of internal medicine* 2000; 133(5): 321-8.
16. Brown TD, Johnston RC, Saltzman CL, Marsh JL, Buckwalter JA. Posttraumatic osteoarthritis: a first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease. *Journal of orthopaedic trauma* 2006; 20(10): 739-44.
17. Seok H, Choi SJ, Yoon J-H, et al. The Association between Osteoarthritis and Occupational Clusters in the Korean Population: A Nationwide Study. *PLOS ONE* 2017; 12(1): e0170229.
18. McAlindon TE, Jacques P, Zhang Y, et al. Do antioxidant micronutrients protect against the development and progression of knee osteoarthritis? *Arthritis Rheum* 1996; 39(4): 648-56.
19. McAlindon TE, Felson DT, Zhang Y, et al. Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study. *Annals of internal medicine* 1996; 125(5): 353-9.

20. Krasnokutsky S, Oshinsky C, Attur M, et al. Serum Urate Levels Predict Joint Space Narrowing in Non-Gout Patients With Medial Knee Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2017; 69(6): 1213-20.
21. Samuels SK, Pillinger M, Kabadi S, Taylor D, Morlock R. FRI0728 Osteoarthritis and gout: real-world evidence evaluating patient characteristics, treatment patterns, and healthcare utilization. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2017; 76(Suppl 2): 766-.
22. Williams MF, London DA, Husni EM, Navaneethan S, Kashyap SR. Type 2 diabetes and osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of diabetes and its complications* 2016; 30(5): 944-50.
23. Jin X, Beguerie JR, Zhang W, et al. Circulating C reactive protein in osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2015; 74(4): 703-10.
24. Buckland-Wright JC, Macfarlane DG, Lynch JA, Jasani MK, Bradshaw CR. Joint space width measures cartilage thickness in osteoarthritis of the knee: high resolution plain film and double contrast macroradiographic investigation. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1995; 54(4): 263-8.
25. Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006; 14(1): 13-29.
26. Lloyd-Roberts GC. The Role of Capsular Changes in Osteoarthritis of the Hip Joint. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume* 1953; 35-B(4): 627-42.
27. Lajeunesse D, Hilal G, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Subchondral bone morphological and biochemical alterations in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7(3): 321-2.
28. van der Kraan PM, van den Berg WB. Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007; 15(3): 237-44.
29. Atarod M, Ludwig TE, Frank CB, Schmidt TA, Shrive NG. Cartilage boundary lubrication of ovine synovial fluid following anterior cruciate ligament transection: a longitudinal study. *Osteoarthritis Cartilage* 2015; 23(4): 640-7.
30. Ludwig TE, Cowman MK, Jay GD, Schmidt TA. Effects of concentration and structure on proteoglycan 4 rheology and interaction with hyaluronan. *Biorheology* 2014; 51(6): 409-22.
31. Ludwig TE, Hunter MM, Schmidt TA. Cartilage boundary lubrication synergism is mediated by hyaluronan concentration and PRG4 concentration and structure. *BMC musculoskeletal disorders* 2015; 16: 386.
32. Svala E, Jin C, Ruetschi U, et al. Characterisation of lubricin in synovial fluid from horses with osteoarthritis. *Equine veterinary journal* 2017; 49(1): 116-23.
33. Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica et biophysica acta* 2012; 1824(1): 133-45.
34. Fukui N, Miyamoto Y, Nakajima M, et al. Zonal gene expression of chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 2008; 58(12): 3843-53.
35. Lotz MK, Otsuki S, Grogan SP, Sah R, Terkeltaub R, D'Lima D. Cartilage cell clusters. *Arthritis and rheumatism* 2010; 62(8): 2206-18.
36. Burr DB, Gallant MA. Bone remodelling in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2012; 8: 665.
37. Havdrup T, Hulth A, Telhag H. The Subchondral Bone in Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis of the Knee: A Histological and Microradiographical Study. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 1976; 47(3): 345-50.
38. Grynpas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I, Pritzker KPH. Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcified Tissue International* 1991; 49(1): 20-6.
39. Resnick D, Niwayama G, Coutts RD. Subchondral cysts (geodes) in arthritic disorders: pathologic and radiographic appearance of the hip joint. *American Journal of Roentgenology* 1977; 128(5): 799-806.
40. Ondrouch AS. CYST FORMATION IN OSTEOARTHRITIS. *J Bone Joint Surg Br* 1963; 45(4): 755-60.
41. Tanamas SK, Wluka AE, Pelletier JP, et al. The association between subchondral bone cysts and tibial cartilage volume and risk of joint replacement in people with knee osteoarthritis: a longitudinal study. *Arthritis Res Ther* 2010; 12(2): R58.

42. Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther* 2017; 19(1): 18.
43. Atukorala I, Kwok CK, Guermazi A, et al. Synovitis in knee osteoarthritis: a precursor of disease? *Ann Rheum Dis* 2016; 75(2): 390-5.
44. Altman RD. Classification of disease: osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1991; 20(6 Suppl 2): 40-7.
45. Altman R, Asch E, Bloch D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986; 29(8): 1039-49.
46. Samborski W, Stratz T, Mackiewicz S, Müller W. Intra-articular treatment of arthritides and activated osteoarthritis with the 5-HT₃ receptor antagonist tropisetron. A double-blind study compared with methylprednisolone. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 2004; 33(sup119): 51-4.
47. Lane NE, Thompson JM. Management of osteoarthritis in the primary-care setting: an evidence-based approach to treatment. *The American journal of medicine* 1997; 103(6a): 25s-30s.
48. Walker-Bone K, Javaid K, Arden N, Cooper C. Medical management of osteoarthritis. *BMJ* 2000; 321(7266): 936-40.
49. Zacher J, Gursche A. Diagnostik der Arthrose. *Der Orthopäde* 2001; 30(11): 841-7.
50. Kellgren J, Lawrence J. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Annals of the rheumatic diseases* 1957; 16(4): 494.
51. MacKay J, Low SB, Smith T, Toms A, McCaskie A, Gilbert F. Systematic review and meta-analysis of the reliability and discriminative validity of cartilage compositional MRI in knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage* 2018; 26(9): 1140-52.
52. Matziolis G. S2k-Leitlinie Koxarthrose. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/033-001.html> (zuletzt abgerufen am 10.06.2020)
53. Stöve J. S2 k-Leitlinie Gonarthrose. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/033-004.html> (zuletzt abgerufen am 18.07.2019)
54. Sarmanova A, Hall M, Moses J, Doherty M, Zhang W. Synovial changes detected by ultrasound in people with knee osteoarthritis—a meta-analysis of observational studies. *Osteoarthritis and cartilage* 2016; 24(8): 1376-83.
55. Takase K, Ohno S, Takeno M, et al. Simultaneous evaluation of long-lasting knee synovitis in patients undergoing arthroplasty by power Doppler ultrasonography and contrast-enhanced MRI in comparison with histopathology. *Clinical and Experimental Rheumatology-Incl Supplements* 2012; 30(1): 85.
56. Abraham AM, Goff I, Pearce MS, Francis RM, Birrell F. Reliability and validity of ultrasound imaging of features of knee osteoarthritis in the community. *BMC musculoskeletal disorders* 2011; 12(1): 70.
57. Mathiessen A, Slatkowsky-Christensen B, Kvien TK, Hammer HB, Haugen IK. Ultrasound-detected inflammation predicts radiographic progression in hand osteoarthritis after 5 years. *Annals of the rheumatic diseases* 2016; 75(5): 825-30.
58. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1957; 16(4): 494-502.
59. Petersson IF, Boegård T, Saxne T, Silman AJ, Svensson B. Radiographic osteoarthritis of the knee classified by the Ahlbäck and Kellgren & Lawrence systems for the tibiofemoral joint in people aged 35–54 years with chronic knee pain. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1997; 56(8): 493-6.
60. Liebl H, Joseph G, Nevitt MC, et al. Early T2 changes predict onset of radiographic knee osteoarthritis: data from the osteoarthritis initiative. *Annals of the rheumatic diseases* 2015; 74(7): 1353-9.
61. Felson DT. The epidemiology of knee osteoarthritis: results from the Framingham Osteoarthritis Study. *Seminars in arthritis and rheumatism*; 1990: Elsevier; 1990. p. 42-50.

62. Hart D, Spector T, Brown P, Wilson P, Doyle D, Silman A. Clinical signs of early osteoarthritis: reproducibility and relation to x ray changes in 541 women in the general population. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1991; 50(7): 467-70.
63. Peat G, Thomas E, Duncan R, Wood L, Hay E, Croft P. Clinical classification criteria for knee osteoarthritis: performance in the general population and primary care. *Annals of the rheumatic diseases* 2006; 65(10): 1363-7.
64. Atkinson HF, Birmingham TB, Moyer RF, et al. MRI T2 and T1p relaxation in patients at risk for knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC musculoskeletal disorders* 2019; 20(1): 182.
65. Bruyere O, Honvo G, Veronese N, et al. An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO). *Semin Arthritis Rheum* 2019.
66. Katz JN, Arant KR, Loeser RF. Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review. *JAMA* 2021; 325(6): 568-78.
67. Gohir SA, Eek F, Kelly A, Abhishek A, Valdes AM. Effectiveness of Internet-Based Exercises Aimed at Treating Knee Osteoarthritis: The iBEAT-OA Randomized Clinical Trial. *JAMA network open* 2021; 4(2): e210012-e.
68. Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics11Supported by Procter & Gamble Pharmaceuticals, Mason, OH. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004; 12: 39-44.
69. Deveza LA, Downie A, Tamez-Peña JG, Eckstein F, Van Spil WE, Hunter DJ. Trajectories of femorotibial cartilage thickness among persons with or at risk of knee osteoarthritis: development of a prediction model to identify progressors. *Osteoarthritis and Cartilage* 2019; 27(2): 257-65.
70. Cooper C, Snow S, McAlindon TE, et al. Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2000; 43(5): 995-1000.
71. Collins KH, Lenz KL, Pollitt EN, et al. Adipose tissue is a critical regulator of osteoarthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2021; 118(1).
72. Buckland-Wright J, Macfarlane D, Williams S, Ward R. Accuracy and precision of joint space width measurements in standard and macroradiographs of osteoarthritic knees. *Annals of the rheumatic diseases* 1995; 54(11): 872-80.
73. Kothari M, Guermazi A, von Ingersleben G, et al. Fixed-flexion radiography of the knee provides reproducible joint space width measurements in osteoarthritis. *European radiology* 2004; 14(9): 1568-73.
74. Tonge D, Pearson M, Jones S. The hallmarks of osteoarthritis and the potential to develop personalised disease-modifying pharmacological therapeutics. *Osteoarthritis and cartilage* 2014; 22(5): 609-21.
75. Lohmander LS, Roos EM. Disease modification in OA—will we ever get there? *Nature Reviews Rheumatology* 2019; 15(3): 133.
76. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69(3): 89-95.
77. De Gruttola VG, Clax P, DeMets DL, et al. Considerations in the Evaluation of Surrogate Endpoints in Clinical Trials: Summary of a National Institutes of Health Workshop. *Controlled Clinical Trials* 2001; 22(5): 485-502.
78. Bay-Jensen AC, Reker D, Kjølgaard-Petersen CF, et al. Osteoarthritis year in review 2015: soluble biomarkers and the BIPED criteria. *Osteoarthritis and Cartilage* 2016; 24(1): 9-20.
79. Dam EB, Loog M, Christiansen C, et al. Identification of progressors in osteoarthritis by combining biochemical and MRI-based markers. *Arthritis research & therapy* 2009; 11(4): R115.
80. Baum T, Joseph G, Karampinos D, Jungmann P, Link T, Bauer J. Cartilage and meniscal T2 relaxation time as non-invasive biomarker for knee osteoarthritis and cartilage repair procedures. *Osteoarthritis and Cartilage* 2013; 21(10): 1474-84.
81. Bauer DC, Hunter DJ, Abramson SB, et al. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006; 14(8): 723-7.

82. Glyn-Jones S, Palmer AJR, Agricola R, et al. Osteoarthritis. *The Lancet* 2015; 386(9991): 376-87.
83. Bi X. Correlation of serum cartilage oligomeric matrix protein with knee osteoarthritis diagnosis: a meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2018; 13(1): 262.
84. Zhang J. Meta-analysis of serum C-reactive protein and cartilage oligomeric matrix protein levels as biomarkers for clinical knee osteoarthritis. *BMC musculoskeletal disorders* 2018; 19(1): 22.
85. Huang M, Zhao J, Huang Y, Dai L, Zhang X. Meta-analysis of urinary C-terminal telopeptide of type II collagen as a biomarker in osteoarthritis diagnosis. *Journal of Orthopaedic Translation* 2018; 13: 50-7.
86. Cheng H, Hao B, Sun J, Yin M. C-Terminal Cross-Linked Telopeptides of Type II Collagen as Biomarker for Radiological Knee Osteoarthritis: A Meta-Analysis. *Cartilage* 2018; 0(0): 1947603518798884.
87. Ren G, Krawetz RJ. Biochemical Markers for the Early Identification of Osteoarthritis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Molecular Diagnosis & Therapy* 2018; 22(6): 671-82.
88. Glyn-Jones S, Palmer A, Agricola R, et al. Osteoarthritis. *The Lancet* 2015; 386(9991): 376-87.
89. Conaghan PG, Hunter DJ, Maillefert JF, Reichmann WM, Losina E. Summary and recommendations of the OARSI FDA osteoarthritis Assessment of Structural Change Working Group. *Osteoarthritis and Cartilage* 2011; 19(5): 606-10.
90. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health* 2009; 1(6): 461-8.
91. Mueller MB, Tuan RS. Anabolic/Catabolic Balance in Pathogenesis of Osteoarthritis: Identifying Molecular Targets. *PM&R* 2011; 3(6, Supplement): S3-S11.
92. Heinegård D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *The FASEB Journal* 1989; 3(9): 2042-51.
93. Miller EJ. Isolation and characterization of a chick cartilage collagen containing three identical chains. *Biochemistry* 1971; 10(9): 1652-9.
94. Weiss C, Rosenberg L, Helfet AJ. An ultrastructural study of normal young adult human articular cartilage. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 1968; 50(4): 663-74.
95. Chandran PL, Horkay F. Aggrecan, an unusual polyelectrolyte: review of solution behavior and physiological implications. *Acta Biomater* 2012; 8(1): 3-12.
96. Newton G, Weremowicz S, Morton CC, et al. Characterization of Human and Mouse Cartilage Oligomeric Matrix Protein. *Genomics* 1994; 24(3): 435-9.
97. Hecht JT, Deere M, Putnam E, et al. Characterization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in human normal and pseudoachondroplasia musculoskeletal tissues. *Matrix Biology* 1998; 17(4): 269-78.
98. Heinegård D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2010; 7: 50.
99. Efimov VP, Engel J, Malashkevich VN. Crystallization and preliminary crystallographic study of the pentamerizing domain from cartilage oligomeric matrix protein: a five-stranded alpha-helical bundle. *Proteins* 1996; 24(2): 259-62.
100. Halasz K, Kassner A, Morgelin M, Heinegard D. COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem* 2007; 282(43): 31166-73.
101. Hansen U, Platz N, Becker A, Bruckner P, Paulsson M, Zaucke F. A secreted variant of cartilage oligomeric matrix protein carrying a chondrodysplasia-causing mutation (p.H587R) disrupts collagen fibrillogenesis. *Arthritis & Rheumatism* 2011; 63(1): 159-67.
102. Agarwal P, Zwolanek D, Keene DR, et al. Collagen XII and XIV, new partners of cartilage oligomeric matrix protein in the skin extracellular matrix suprastructure. *J Biol Chem* 2012; 287(27): 22549-59.
103. Thur J, Rosenberg K, Nitsche DP, et al. Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *J Biol Chem* 2001; 276(9): 6083-92.

104. Chen FH, Herndon ME, Patel N, Hecht JT, Tuan RS, Lawler J. Interaction of cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 with aggrecan. *J Biol Chem* 2007; 282(34): 24591-8.
105. Mann HH, Ozbek S, Engel J, Paulsson M, Wagener R. Interactions between the cartilage oligomeric matrix protein and matrilins. Implications for matrix assembly and the pathogenesis of chondrodysplasias. *J Biol Chem* 2004; 279(24): 25294-8.
106. Di Cesare PE, Chen FS, Moergelin M, et al. Matrix–matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin. *Matrix Biology* 2002; 21(5): 461-70.
107. Briggs MD, Hoffman SMG, King LM, et al. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nature Genetics* 1995; 10(3): 330-6.
108. Lohmander LS, Saxne T, Heinegård DK. Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1994; 53(1): 8-13.
109. Verma P, Dalal K. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in knee osteoarthritis: A novel diagnostic and prognostic biomarker. *Journal of Orthopaedic Research* 2013; 31(7): 999-1006.
110. Saxne T, Heinegard D. Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br J Rheumatol* 1992; 31(9): 583-91.
111. Forslind K, Eberhardt K, Jonsson A, Saxne T. Increased serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein. A prognostic marker in early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1992; 31(9): 593-8.
112. Ganu V, Goldberg R, Peppard J, et al. Inhibition of interleukin-1 α -induced cartilage oligomeric matrix protein degradation in bovine articular cartilage by matrix metalloproteinase inhibitors: Potential role for matrix metalloproteinases in the generation of cartilage oligomeric matrix protein fragments in arthritic synovial fluid. *Arthritis & Rheumatism* 1998; 41(12): 2143-51.
113. Dickinson SC, Vankemmelbeke MN, Buttle DJ, Rosenberg K, Heinegård D, Hollander AP. Cleavage of cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) by matrix metalloproteinases and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs. *Matrix Biology* 2003; 22(3): 267-78.
114. Liu C-j, Kong W, Ilalov K, et al. ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *The FASEB Journal* 2006; 20(7): 988-90.
115. Liu C-j, Kong W, Xu K, et al. ADAMTS-12 associates with and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281(23): 15800-8.
116. Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key enzymes in osteoarthritis. *Journal of Cellular Biochemistry* 2011; 112(12): 3507-14.
117. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J-P, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2010; 7: 33.
118. Happonen KE, Saxne T, Aspberg A, Mörgelin M, Heinegård D, Blom AM. Regulation of complement by cartilage oligomeric matrix protein allows for a novel molecular diagnostic principle in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2010; 62(12): 3574-83.
119. Chen FH, Thomas AO, Hecht JT, Goldring MB, Lawler J. Cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 supports chondrocyte attachment through interaction with integrins. *J Biol Chem* 2005; 280(38): 32655-61.
120. Rock MJ, Holden P, Horton WA, Cohn DH. Cartilage oligomeric matrix protein promotes cell attachment via two independent mechanisms involving CD47 and α V β 3 integrin. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2010; 338(1): 215-24.
121. Clahsen T, Schaper F. Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration. *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 84(6): 1521-9.
122. Vuga LJ, Milosevic J, Pandit K, et al. Cartilage oligomeric matrix protein in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS one* 2013; 8(12): e83120.

123. Magdaleno F, Arriazu E, de Galarreta MR, et al. Cartilage oligomeric matrix protein participates in the pathogenesis of liver fibrosis. *Journal of hepatology* 2016; 65(5): 963-71.
124. Agarwal P, Schulz J-N, Blumbach K, et al. Enhanced deposition of cartilage oligomeric matrix protein is a common feature in fibrotic skin pathologies. *Matrix Biology* 2013; 32(6): 325-31.
125. Farina G, Lemaire R, Korn JH, Widom RL. Cartilage oligomeric matrix protein is overexpressed by scleroderma dermal fibroblasts. *Matrix biology* 2006; 25(4): 213-22.
126. Posey KL, Coustry F, Hecht JT. Cartilage oligomeric matrix protein: COMPathies and beyond. *Matrix Biology* 2018; 71: 161-73.
127. Kato S, Yamada H, Terada N, et al. Joint biomarkers in idiopathic femoral head osteonecrosis: comparison with hip osteoarthritis. *The Journal of rheumatology* 2005; 32(8): 1518-23.
128. Bedi A, Lynch EB, Sibilsky Enselman ER, et al. Elevation in circulating biomarkers of cartilage damage and inflammation in athletes with femoroacetabular impingement. *The American journal of sports medicine* 2013; 41(11): 2585-90.
129. Neidhart M, Müller-Ladner U, Frey W, et al. Increased serum levels of non-collagenous matrix proteins (cartilage oligomeric matrix protein and melanoma inhibitory activity) in marathon runners. *Osteoarthritis and Cartilage* 2000; 8(3): 222-9.
130. Klatt A, Paul-Klausch B, Klinger G, et al. The matrilin-3 VWA1 domain modulates interleukin-6 release from primary human chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage* 2013; 21(6): 869-73.
131. Klatt AR, Klinger G, Paul-Klausch B, et al. Matrilin-3 activates the expression of osteoarthritis-associated genes in primary human chondrocytes. *FEBS letters* 2009; 583(22): 3611-7.
132. Klatt AR, Zech D, Kühn G, et al. Discoidin domain receptor 2 mediates the collagen II-dependent release of interleukin-6 in primary human chondrocytes. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 2009; 218(2): 241-7.
133. Herrero-Beaumont G, Pérez-Baos S, Sánchez-Pernaute O, Roman-Blas JA, Lamuedra A, Largo R. Targeting chronic innate inflammatory pathways, the main road to prevention of osteoarthritis progression. *Biochemical pharmacology* 2019.
134. Clemmensen I, Petersen LC, Kluft C. Purification and characterization of a novel, oligomeric, plasminogen kringle 4 binding protein from human plasma: tetranectin. *Eur J Biochem* 1986; 156(2): 327-33.
135. Nielsen BB, Kastrup JS, Rasmussen H, et al. Crystal structure of tetranectin, a trimeric plasminogen-binding protein with an alpha-helical coiled coil. *FEBS Lett* 1997; 412(2): 388-96.
136. Holtet TL, Graversen JH, Clemmensen I, Thogersen HC, Etzerodt M. Tetranectin, a trimeric plasminogen-binding C-type lectin. *Protein Sci* 1997; 6(7): 1511-5.
137. Kluft C, Jie AF, Los P, de Wit E, Havekes L. Functional analogy between lipoprotein(a) and plasminogen in the binding to the kringle 4 binding protein, tetranectin. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161(2): 427-33.
138. Kluft C, Los P, Clemmensen I. Calcium-dependent binding of tetranectin to fibrin. *Thromb Res* 1989; 55(2): 233-8.
139. Christensen L, Clemmensen I. Tetranectin immunoreactivity in normal human tissues. *Histochemistry* 1989; 92(1): 29-35.
140. Wewer UM, Iba K, Durkin ME, et al. Tetranectin is a novel marker for myogenesis during embryonic development, muscle regeneration, and muscle cell differentiation *in vitro*. *Developmental biology* 1998; 200(2): 247-59.
141. Iba K, Hatakeyama N, Kojima T, et al. Impaired cutaneous wound healing in mice lacking tetranectin. *Wound Repair and Regeneration* 2009; 17(1): 108-12.
142. Chen Y, Han H, Yan X, et al. Tetranectin as a potential biomarker for stable coronary artery disease. *Scientific reports* 2015; 5: 17632.
143. Edgar K, Glezeva N, Collier P, et al. 62 Tetranectin expression is associated with myocardial fibrosis and may be a useful serum biomarker for indicating early myocardial

- injury and predisposition to heart failure development. BMJ Publishing Group Ltd and British Cardiovascular Society; 2019.
144. Park J, Park J, Jeong J, Cho K-H, Choi I, Kim J. Identification of tetranectin as adipogenic serum protein. *Biochemical and biophysical research communications* 2015; 460(3): 583-8.
 145. Park J, Ryu D-y, Rahman S, Kim J. Adipogenic function of mouse tetranectin and identification of its functional domain. *Biochemical and biophysical research communications* 2019; 519(3): 645-51.
 146. Høgdall CK, Høgdall EV, Hørding U, et al. Plasma tetranectin and ovarian neoplasms. *Gynecologic oncology* 1991; 43(2): 103-7.
 147. Heeran MC, Rask L, Høgdall CK, et al. Tetranectin positive expression in tumour tissue leads to longer survival in Danish women with ovarian cancer. Results from the 'Malova' ovarian cancer study. *Apmis* 2015; 123(5): 401-9.
 148. DE VRIES TJ, DE WIT PE, CLEMMENSEN I, et al. Tetranectin and plasmin/plasminogen are similarly distributed at the invasive front of cutaneous melanoma lesions. *The Journal of pathology* 1996; 179(3): 260-5.
 149. Chen H, Li H, Zhao J, et al. High intratumoral expression of tetranectin associates with poor prognosis of patients with gastric cancer after gastrectomy. *Journal of Cancer* 2017; 8(17): 3623.
 150. Wagener R, Kobbe B, Paulsson M. Primary structure of matrilin-3, a new member of a family of extracellular matrix proteins related to cartilage matrix protein (matrilin-1) and von Willebrand factor 1. *FEBS letters* 1997; 413(1): 129-34.
 151. Klatt AR, Nitsche DP, Kobbe B, Mörgelin M, Paulsson M, Wagener R. Molecular structure and tissue distribution of matrilin-3, a filament-forming extracellular matrix protein expressed during skeletal development. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(6): 3999-4006.
 152. Budde B, Blumbach K, Ylöstalo J, et al. Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX. *Molecular and cellular biology* 2005; 25(23): 10465-78.
 153. Wagener R, Ehlen HW, Ko Y-P, et al. The matrilins—adaptor proteins in the extracellular matrix. *FEBS letters* 2005; 579(15): 3323-9.
 154. Mann HH, Ozbek S, Engel J, Paulsson M, Wagener R. Interactions between the cartilage oligomeric matrix protein and matrilins - Implications for matrix assembly and the pathogenesis of chondrodysplasias. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(24): 25294-8.
 155. Thur J, Rosenberg K, Nitsche DP, et al. Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(9): 6083-92.
 156. Pullig O, Weseloh G, Klatt A, Wagener R, Swoboda B. Matrilin-3 in human articular cartilage: increased expression in osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage* 2002; 10(4): 253-63.
 157. Stefánsson SE, Jónsson H, Ingvarsson T, et al. Genomewide scan for hand osteoarthritis: a novel mutation in matrilin-3. *The American Journal of Human Genetics* 2003; 72(6): 1448-59.
 158. Yang X, Trehan SK, Guan Y, et al. Matrilin-3 inhibits chondrocyte hypertrophy as a bone morphogenetic protein-2 antagonist. *Journal of Biological Chemistry* 2014; 289(50): 34768-79.
 159. Jayasuriya CT, Goldring MB, Terek R, Chen Q. Matrilin-3 induction of IL-1 receptor antagonist is required for up-regulating collagen II and aggrecan and down-regulating ADAMTS-5 gene expression. *Arthritis research & therapy* 2012; 14(5): R197.
 160. Uitto J, Prockop DJ. Biosynthesis of cartilage procollagen. Influence of chain association and hydroxylation of prolyl residues on the folding of the polypeptides into the triple-helical conformation. *Biochemistry* 1974; 13(22): 4586-91.
 161. Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. Collagens at a glance. *Journal of cell science* 2007; 120(12): 1955-8.

162. Nishimura G, Haga N, Kitoh H, et al. The phenotypic spectrum of COL2A1 mutations. *Human mutation* 2005; 26(1): 36-43.
163. Zhang B, Zhang Y, Wu N, Li J, Liu H, Wang J. Integrated analysis of COL2A1 variant data and classification of type II collagenopathies. *Clinical genetics* 2019.
164. Lampe A, Bushby K. Collagen VI related muscle disorders. *Journal of medical genetics* 2005; 42(9): 673-85.
165. Gara SK, Grumati P, Urciuolo A, et al. Three novel collagen VI chains with high homology to the $\alpha 3$ chain. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283(16): 10658-70.
166. Cescon M, Gattazzo F, Chen P, Bonaldo P. Collagen VI at a glance. *J Cell Sci* 2015; 128(19): 3525-31.
167. Kuo H-J, Maslen CL, Keene DR, Glanville RW. Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(42): 26522-9.
168. Merlini L, Martoni E, Grumati P, et al. Autosomal recessive myosclerosis myopathy is a collagen VI disorder. *Neurology* 2008; 71(16): 1245-53.
169. Vanegas OC, Bertini E, Zhang R-Z, et al. Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98(13): 7516-21.
170. Jöbsis GJ, Keizers H, Vreijling JP, et al. Type VI collagen mutations in Bethlem myopathy, an autosomal dominant myopathy with contractures. *Nature genetics* 1996; 14(1): 113-5.
171. Liu W, Li L, Ye H, Tao H, He H. Role of COL6A3 in colorectal cancer. *Oncology reports* 2018; 39(6): 2527-36.
172. Sand JM, Martinez G, Midjord A-K, Karsdal MA, Leeming DJ, Lange P. Characterization of serological neo-epitope biomarkers reflecting collagen remodeling in clinically stable chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical biochemistry* 2016; 49(15): 1144-51.
173. Hansen U, Allen JM, White R, et al. WARP interacts with collagen VI-containing microfibrils in the pericellular matrix of human chondrocytes. *PloS one* 2012; 7(12).
174. Reed DA, Yotsuya M, Gubareva P, Toth PT, Bertagna A. Two-photon fluorescence and second harmonic generation characterization of extracellular matrix remodeling in post-injury murine temporomandibular joint osteoarthritis. *PloS one* 2019; 14(3).
175. Zhang H, Apfelroth SD, Hu W, et al. Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. *The Journal of cell biology* 1994; 124(5): 855-63.
176. Quondamatteo F, Reinhardt DP, Charbonneau NL, Pophal G, Sakai LY, Herken R. Fibrillin-1 and fibrillin-2 in human embryonic and early fetal development. *Matrix biology* 2002; 21(8): 637-46.
177. Grant TM, Thompson MS, Urban J, Yu J. Elastic fibres are broadly distributed in tendon and highly localized around tenocytes. *Journal of anatomy* 2013; 222(6): 573-9.
178. Dietz HC, Cutting CR, Pyeritz RE, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 1991; 352(6333): 337-9.
179. Putnam EA, Zhang H, Ramirez F, Milewicz DM. Fibrillin-2 (FBN2) mutations result in the Marfan-like disorder, congenital contractural arachnodactyly. *Nature genetics* 1995; 11(4): 456-8.
180. Gupta PA, Putnam EA, Carmical SG, et al. Ten novel FBN2 mutations in congenital contractural arachnodactyly: delineation of the molecular pathogenesis and clinical phenotype. *Human mutation* 2002; 19(1): 39-48.
181. Nistala H, Lee-Arteaga S, Smaldone S, et al. Fibrillin-1 and-2 differentially modulate endogenous TGF- β and BMP bioavailability during bone formation. *Journal of Cell Biology* 2010; 190(6): 1107-21.
182. van den Bosch MH, Blom AB, van Lent PL, et al. Canonical Wnt signaling skews TGF- β signaling in chondrocytes towards signaling via ALK1 and Smad 1/5/8. *Cellular signalling* 2014; 26(5): 951-8.
183. Van der Kraan P, Davidson EB, Blom A, Van den Berg W. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of

- signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis and cartilage* 2009; 17(12): 1539-45.
184. van der Kraan PM, Goumans M-J, Davidson EB, Ten Dijke P. Age-dependent alteration of TGF- β signalling in osteoarthritis. *Cell and tissue research* 2012; 347(1): 257-65.
 185. Caron M, Emans P, Cremers A, et al. Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7. *Osteoarthritis and cartilage* 2013; 21(4): 604-13.
 186. Afzal F, Pratap J, Ito K, et al. Smad function and intranuclear targeting share a Runx2 motif required for osteogenic lineage induction and BMP2 responsive transcription. *Journal of cellular physiology* 2005; 204(1): 63-72.
 187. Davidson EB, Van der Kraan P, Van Den Berg W. TGF- β and osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage* 2007; 15(6): 597-604.
 188. Neame PJ, Tapp H, Grimm DR. The cartilage-derived, C-type lectin (CLECSF1): structure of the gene and chromosomal location. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1999; 1446(3): 193-202.
 189. Lau D, Elezagic D, Hermes G, et al. The cartilage-specific lectin C-type lectin domain family 3 member A (CLEC3A) enhances tissue plasminogen activator-mediated plasminogen activation. *Journal of Biological Chemistry* 2018; 293(1): 203-14.
 190. Manon-Jensen T, Kjeld N, Karsdal M. Collagen-mediated hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2016; 14(3): 438-48.
 191. Bergmeier W, Hynes RO. Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2012; 4(2): a005132.
 192. Kvolik S, Jukic M, Matijevic M, Marjanovic K, Glavas-Obrovac L. An overview of coagulation disorders in cancer patients. *Surgical oncology* 2010; 19(1): e33-e46.
 193. MURPHY G, STANTON H, COWELL S, et al. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *Apmis* 1999; 107(1-6): 38-44.
 194. Pap G, Eberhardt R, Röcken C, Nebelung W, Neumann H, Roessner A. Expression of stromelysin and urokinase type plasminogen activator protein in resection specimens and biopsies at different stages of osteoarthritis of the knee. *Pathology-Research and Practice* 2000; 196(4): 219-26.
 195. Elezagic D, Mörgelin M, Hermes G, et al. Antimicrobial peptides derived from the cartilage.-specific C-type Lectin Domain Family 3 Member A (CLEC3A)–potential in the prevention and treatment of septic arthritis. *Osteoarthritis and cartilage* 2019; 27(10): 1564-73.
 196. Tsunozumi J, Higashi S, Miyazaki K. Matrilysin (MMP-7) cleaves C-type lectin domain family 3 member A (CLEC3A) on tumor cell surface and modulates its cell adhesion activity. *Journal of cellular biochemistry* 2009; 106(4): 693-702.
 197. Ni J, Peng Y, Yang F-L, Xi X, Huang X-W, He C. Overexpression of CLEC3A promotes tumor progression and poor prognosis in breast invasive ductal cancer. *OncoTargets and therapy* 2018; 11: 3303.
 198. Miki M, Oono T, Fujimori N, et al. CLEC3A, MMP7, and LCN2 as novel markers for predicting recurrence in resected G1 and G2 pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer medicine* 2019; 8(8): 3748-60.
 199. Karlsson C, Dehne T, Lindahl A, et al. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage* 2010; 18(4): 581-92.
 200. Wilson R, Golub SB, Rowley L, et al. Novel elements of the chondrocyte stress response identified using an in vitro model of mouse cartilage degradation. *Journal of proteome research* 2016; 15(3): 1033-50.
 201. Lawler J, Duquette M, Whittaker CA, Adams JC, McHenry K, DeSimone DW. Identification and characterization of thrombospondin-4, a new member of the thrombospondin gene family. *The Journal of cell biology* 1993; 120(4): 1059-67.
 202. Lawler J, McHenry K, Duquette M, Derick L. Characterization of human thrombospondin-4. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(6): 2809-14.

203. Misenheimer TM, Mosher DF. Biophysical characterization of the signature domains of thrombospondin-4 and thrombospondin-2. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(50): 41229-35.
204. Tucker RP, Adams JC, Lawler J. Thrombospondin-4 is expressed by early osteogenic tissues in the chick embryo. *Developmental Dynamics* 1995; 203(4): 477-90.
205. Hauser N, Paulsson M, Kale AA, DiCesare PE. Tendon extracellular matrix contains pentameric thrombospondin-4 (TSP-4). *FEBS letters* 1995; 368(2): 307-10.
206. Arber S, Caroni P. Thrombospondin-4, an extracellular matrix protein expressed in the developing and adult nervous system promotes neurite outgrowth. *The Journal of cell biology* 1995; 131(4): 1083-94.
207. Frolova EG, Drazba J, Krukovets I, et al. Control of organization and function of muscle and tendon by thrombospondin-4. *Matrix Biology* 2014; 37: 35-48.
208. Subramanian A, Schilling TF. Thrombospondin-4 controls matrix assembly during development and repair of myotendinous junctions. *Elife* 2014; 3: e02372.
209. Rysä J, Leskinen H, Ilves M, Ruskoaho H. Distinct upregulation of extracellular matrix genes in transition from hypertrophy to hypertensive heart failure. *Hypertension* 2005; 45(5): 927-33.
210. Mustonen E, Aro J, Puhakka J, et al. Thrombospondin-4 expression is rapidly upregulated by cardiac overload. *Biochemical and biophysical research communications* 2008; 373(2): 186-91.
211. Cingolani OH, Kirk JA, Seo K, et al. Thrombospondin-4 is required for stretch-mediated contractility augmentation in cardiac muscle. *Circulation research* 2011; 109(12): 1410-4.
212. Frolova EG, Sopko N, Blech L, et al. Thrombospondin-4 regulates fibrosis and remodeling of the myocardium in response to pressure overload. *FASEB J* 2012; 26(6): 2363-73.
213. Sawaki D, Hou L, Tomida S, et al. Modulation of cardiac fibrosis by Kruppel-like factor 6 through transcriptional control of thrombospondin 4 in cardiomyocytes. *Cardiovascular research* 2015; 107(4): 420-30.
214. Crosby ND, Zaucke F, Kras JV, Dong L, Luo ZD, Winkelstein BA. Thrombospondin-4 and excitatory synaptogenesis promote spinal sensitization after painful mechanical joint injury. *Experimental neurology* 2015; 264: 111-20.
215. Pan B, Guo Y, Wu HE, et al. Thrombospondin-4 divergently regulates voltage-gated Ca²⁺ channel subtypes in sensory neurons after nerve injury. *Pain* 2016; 157(9): 2068-80.
216. Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, et al. Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* 2009; 139(2): 380-92.
217. Muppala S, Xiao R, Krukovets I, et al. Thrombospondin-4 mediates TGF-beta-induced angiogenesis. *Oncogene* 2017; 36(36): 5189-98.
218. Muppala S, Frolova E, Xiao R, et al. Proangiogenic Properties of Thrombospondin-4. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2015; 35(9): 1975-86.
219. Su F, Zhao J, Qin S, et al. Over-expression of Thrombospondin 4 correlates with loss of miR-142 and contributes to migration and vascular invasion of advanced hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8(14): 23277-88.
220. Kuroda K, Yashiro M, Sera T, et al. The clinicopathological significance of Thrombospondin-4 expression in the tumor microenvironment of gastric cancer. *PLoS One* 2019; 14(11): e0224727.
221. Wu H, Zhang G, Li Z, et al. Thrombospondin-4 expression as a prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Gene* 2019; 696: 219-24.
222. McCart Reed AE, Song S, Kutasovic JR, et al. Thrombospondin-4 expression is activated during the stromal response to invasive breast cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2013; 463(4): 535-45.
223. Maly K, Schaible I, Riegger J, Brenner RE, Meurer A, Zaucke F. The Expression of Thrombospondin-4 Correlates with Disease Severity in Osteoarthritic Knee Cartilage. *International journal of molecular sciences* 2019; 20(2).

224. Howell DS. Pathogenesis of osteoarthritis. *The American journal of medicine* 1986; 80(4): 24-8.
225. Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, et al. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2016; 12: 580.
226. Schlaak J, Pfers I, Meyer KZB, Märker-Hermann E. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clinical and experimental rheumatology* 1996; 14(2): 155-62.
227. Pelletier J, Mccollum R, Cloutier J, Martel-Pelletier J. Synthesis of metalloproteinases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process. *The Journal of Rheumatology Supplement* 1995; 43: 109-14.
228. Kaneko S, Satoh T, Chiba J, Ju C, Inoue K, Kagawa J. Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Cytokines, cellular & molecular therapy* 2000; 6(2): 71-9.
229. Smith MD, Triantafillou S, Parker A, Youssef P, Coleman M. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *The Journal of rheumatology* 1997; 24(2): 365-71.
230. Sandy JD, Flannery CR, Neame PJ, Lohmander LS. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *J Clin Invest* 1992; 89(5): 1512-6.
231. Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, Komiya S, Tortorella MD. Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 2002; 277(25): 22201-8.
232. Song RH, Tortorella MD, Malfait AM, et al. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum* 2007; 56(2): 575-85.
233. Huang K, Wu L. Aggrecanase and Aggrecan Degradation in Osteoarthritis: A Review. *Journal of International Medical Research* 2008; 36(6): 1149-60.
234. Lotz MK. New developments in osteoarthritis: posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis research & therapy* 2010; 12(3): 211.
235. Fleischmann RM, Bliddal H, Blanco FJ, et al. A Phase II Trial of Lutikizumab, an Anti-Interleukin-1 α/β Dual Variable Domain Immunoglobulin, in Knee Osteoarthritis Patients With Synovitis. *Arthritis & Rheumatology* 2019.
236. Murphy G, Nagase H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nature Reviews Rheumatology* 2008; 4(3): 128.
237. Mobasheri A, van Spil WE, Budd E, et al. Molecular taxonomy of osteoarthritis for patient stratification, disease management and drug development: biochemical markers associated with emerging clinical phenotypes and molecular endotypes. *Current opinion in rheumatology* 2019; 31(1): 80-9.
238. Katsoula G, Kreitmaier P, Zeggini E. Insights into the molecular landscape of osteoarthritis in human tissues. *Current Opinion in Rheumatology* 2022; 34(1): 79-90.
239. Chu CR, Williams AA, Coyle CH, Bowers ME. Early diagnosis to enable early treatment of pre-osteoarthritis. *Arthritis research & therapy* 2012; 14(3): 212.
240. Gómez R, Villalvilla A, Largo R, Gualillo O, Herrero-Beaumont G. TLR4 signalling in osteoarthritis—finding targets for candidate DMOADs. *Nature Reviews Rheumatology* 2015; 11(3): 159.
241. Yoo S-J, Kim J, Lee S, et al. AB0796 Characterization of mononuclear cells in osteoarthritis synovial fluid monocytes. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2014; 73(Suppl 2): 1067-.
242. Da R-R, Qin Y, Baeten D, Zhang Y. B cell clonal expansion and somatic hypermutation of Ig variable heavy chain genes in the synovial membrane of patients with osteoarthritis. *The Journal of Immunology* 2007; 178(1): 557-65.
243. Sanchez-Lopez E, Coras R, Torres A, Lane NE, Guma M. Synovial inflammation in osteoarthritis progression. *Nature Reviews Rheumatology* 2022: 1-18.
244. Bondeson J, Blom AB, Wainwright S, Hughes C, Caterson B, Van Den Berg WB. The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving

- inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2010; 62(3): 647-57.
245. Klatt AR, Paul-Klausch B, Klinger G, et al. A critical role for collagen II in cartilage matrix degradation: collagen II induces pro-inflammatory cytokines and MMPs in primary human chondrocytes. *Journal of orthopaedic research* 2009; 27(1): 65-70.
 246. Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G. Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor α of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1990; 1052(3): 366-78.
 247. Cawston T, Curry V, Summers C, et al. The role of oncostatin M in animal and human connective tissue collagen turnover and its localization within the rheumatoid joint. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 1998; 41(10): 1760-71.
 248. Rowan A, Koshy P, Shingleton W, et al. Synergistic effects of glycoprotein 130 binding cytokines in combination with interleukin-1 on cartilage collagen breakdown. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 2001; 44(7): 1620-32.
 249. Reboul P, Pelletier J-P, Tardif G, Cloutier J-M, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *The Journal of clinical investigation* 1996; 97(9): 2011-9.
 250. Bluteau G, Conrozier T, Mathieu P, Vignon E, Herbage D, Mallein-Gerin F. Matrix metalloproteinase-1,-3,-13 and aggrecanase-1 and-2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2001; 1526(2): 147-58.
 251. Sun L, Wang X, Kaplan DL. A 3D cartilage-inflammatory cell culture system for the modeling of human osteoarthritis. *Biomaterials* 2011; 32(24): 5581-9.
 252. Mayne R. Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 1989; 32(3): 241-6.
 253. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews* 2003; 55(12): 1531-46.
 254. Bateman JF, Lamande SR, Ramshaw JA. Collagen superfamily. *Extracellular matrix* 1996; 2: 22-67.
 255. Jacques C, Recklies A, Levy A, Berenbaum F. HC-gp39 contributes to chondrocyte differentiation by inducing SOX9 and type II collagen expressions. *Osteoarthritis and cartilage* 2007; 15(2): 138-46.
 256. Zhang F, Yao Y, Su K, et al. Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes by adenoviral vector-mediated TGF- β 3 and collagen-1 silencing shRNA in 3D culture. *Annals of biomedical engineering* 2011; 39(12): 3042.
 257. Benya PD, Padilla SR, Nimni ME. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* 1978; 15(4): 1313-21.
 258. Hauselmann H, Fernandes RJ, Mok SS, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *Journal of cell science* 1994; 107(1): 17-27.
 259. Shen G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthodontics & craniofacial research* 2005; 8(1): 11-7.
 260. Gibson GJ, Beaumont BW, Flint MH. Synthesis of a low molecular weight collagen by chondrocytes from the presumptive calcification region of the embryonic chick sterna: the influence of culture with collagen gels. *The Journal of cell biology* 1984; 99(1): 208-16.
 261. Van der Kraan P, Van den Berg W. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis and cartilage* 2012; 20(3): 223-32.

262. Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis research & therapy* 2010; 12(5): 216.
263. Re'em T, Kaminer-Israeli Y, Ruvinov E, Cohen S. Chondrogenesis of hMSC in affinity-bound TGF-beta scaffolds. *Biomaterials* 2012; 33(3): 751-61.
264. Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, Deng C-X. TGF- β /Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *The Journal of cell biology* 2001; 153(1): 35-46.
265. Tran V, Karsai A, Fong MC, et al. Label-Free and Direct Visualization of Multivalent Binding of Bone Morphogenetic Protein-2 with Cartilage Oligomeric Matrix Protein. *The Journal of Physical Chemistry B* 2018; 123(1): 39-46.
266. Homandberg GA. Cartilage damage by matrix degradation products: fibronectin fragments. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2001; 391: S100-S7.
267. Huhtala P, Humphries MJ, McCarthy JB, Tremble PM, Werb Z, Damsky CH. Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *The Journal of cell biology* 1995; 129(3): 867-79.
268. Yasuda T, Poole AR. A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1—mediated pathway. *Arthritis & Rheumatism* 2002; 46(1): 138-48.
269. Chen Q, Kinch MS, Lin TH, Burridge K, Juliano R. Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269(43): 26602-5.
270. Homandberg G, Meyers R, Xie D. Fibronectin fragments cause chondrolysis of bovine articular cartilage slices in culture. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267(6): 3597-604.
271. Rock MJ, Holden P, Horton WA, Cohn DH. Cartilage oligomeric matrix protein promotes cell attachment via two independent mechanisms involving CD47 and $\alpha\beta$ 3 integrin. *Molecular and cellular biochemistry* 2010; 338(1-2): 215-24.
272. Chen FH, Thomas AO, Hecht JT, Goldring MB, Lawler J. Cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 supports chondrocyte attachment through interaction with integrins. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(38): 32655-61.
273. Acharya C, Yik JH, Kishore A, Van Dinh V, Di Cesare PE, Haudenschild DR. Cartilage oligomeric matrix protein and its binding partners in the cartilage extracellular matrix: interaction, regulation and role in chondrogenesis. *Matrix Biol* 2014; 37: 102-11.
274. Ganu V, Goldberg R, Peppard J, et al. Inhibition of interleukin-1 α -induced cartilage oligomeric matrix protein degradation in bovine articular cartilage by matrix metalloproteinase inhibitors: Potential role for matrix metalloproteinases in the generation of cartilage oligomeric matrix protein fragments in arthritic synovial fluid. *Arthritis & Rheumatism* 1998; 41(12): 2143-51.
275. Stracke JO, Fosang AJ, Last K, et al. Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *FEBS letters* 2000; 478(1-2): 52-6.
276. Åhrman E, Lorenzo P, Holmgren K, et al. Novel cartilage oligomeric matrix protein (COMP) neoepitopes identified in synovial fluids from patients with joint diseases using affinity chromatography and mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* 2014; 289(30): 20908-16.
277. Skiöldebrand E, Ekman S, Mattsson Hultén L, et al. Cartilage oligomeric matrix protein neoepitope in the synovial fluid of horses with acute lameness: A new biomarker for the early stages of osteoarthritis. *Equine veterinary journal* 2017; 49(5): 662-7.
278. Andrés Sastre E, Zaucke F, Witte-Bouma J, van Osch GJ, Farrell E. Cartilage Oligomeric Matrix Protein-Derived Peptides Secreted by Cartilage Do Not Induce Responses Commonly Observed during Osteoarthritis. *Cartilage* 2021; 13(2_suppl): 1229S-36S.
279. Li Q, Wang C, Wang Y, et al. HSCs-derived COMP drives hepatocellular carcinoma progression by activating MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2018; 37(1): 1-15.

280. Papadakos KS, Bartoschek M, Rodriguez C, et al. Cartilage Oligomeric Matrix Protein initiates cancer stem cells through activation of Jagged1-Notch3 signaling. *Matrix Biology* 2019; 81: 107-21.
281. Ma B, Yao F, Xie N, et al. Cartilage oligomeric matrix protein is a novel notch ligand driving embryonic stem cell differentiation towards the smooth muscle lineage. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2018; 121: 69-80.
282. Haudenschild DR, Hong E, Yik JH, et al. Enhanced activity of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) bound to cartilage oligomeric matrix protein. *J Biol Chem* 2011; 286(50): 43250-8.
283. Clark AG, Jordan JM, Vilim V, et al. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 1999; 42(11): 2356-64.
284. Fernandes F, Pucinelli MLC, da Silva N, Feldman D. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in knee osteoarthritis in a Brazilian population: clinical and radiological correlation. *Scandinavian journal of rheumatology* 2007; 36(3): 211-5.
285. Zhang R, Li G, Zeng C, et al. Mechanical stress contributes to osteoarthritis development through the activation of transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1). *Bone & joint research* 2018; 7(11): 587-94.
286. Zhai G, Doré J, Rahman P. TGF- β signal transduction pathways and osteoarthritis. *Rheumatology international* 2015; 35(8): 1283-92.
287. Li H, Haudenschild DR, Posey K, Hecht J, Di Cesare P, Yik J. Comparative analysis with collagen type II distinguishes cartilage oligomeric matrix protein as a primary TGF- β -responsive gene. *Osteoarthritis and cartilage* 2011; 19(10): 1246-53.
288. Iwasaki M, Nakata K, Nakahara H, et al. Transforming growth factor-beta 1 stimulates chondrogenesis and inhibits osteogenesis in high density culture of periosteum-derived cells. *Endocrinology* 1993; 132(4): 1603-8.
289. Davidson ENB, Remst DF, Vitters EL, et al. Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice. *The Journal of Immunology* 2009; 182(12): 7937-45.
290. Monteagudo S, Cornelis FM, Wang X, et al. ANP32A represses Wnt signaling across tissues thereby protecting against osteoarthritis and heart disease. *Osteoarthritis and Cartilage* 2022.
291. Miyamoto K, Ohkawara B, Ito M, et al. Fluoxetine ameliorates cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling. *PLoS one* 2017; 12(9): e0184388.
292. Blom A, van Lent P, van der Kraan P, van den Berg W. To seek shelter from the WNT in osteoarthritis? WNT-signaling as a target for osteoarthritis therapy. *Current drug targets* 2010; 11(5): 620-9.
293. Deshmukh V, Hu H, Barroga C, et al. A small-molecule inhibitor of the Wnt pathway (SM04690) as a potential disease modifying agent for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis and cartilage* 2018; 26(1): 18-27.
294. Ferreira GE, McLachlan AJ, Lin C-WC, et al. Efficacy and safety of antidepressants for the treatment of back pain and osteoarthritis: systematic review and meta-analysis. *bmj* 2021; 372.
295. Maroudas A. Distribution and diffusion of solutes in articular cartilage. *Biophysical journal* 1970; 10(5): 365-79.
296. Rosenberg K, Olsson H, Morgelin M, Heinegard D. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J Biol Chem* 1998; 273(32): 20397-403.
297. Meyers C, Johanson K, Miles L, et al. Purification and characterization of human recombinant interleukin-1 beta. *Journal of Biological Chemistry* 1987; 262(23): 11176-81.
298. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 Beta—A Friend or Foe in Malignancies? *International journal of molecular sciences* 2018; 19(8): 2155.

299. Khan AH, Bayat H, Rajabibazl M, Sabri S, Rahimpour A. Humanizing glycosylation pathways in eukaryotic expression systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2017; 33(1): 4.
300. Tsan M-F, Baochong G. Review: Pathogen-associated molecular pattern contamination as putative endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research* 2007; 13(1): 6-14.
301. Alexander C, Rietschel ET. Invited review: bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of endotoxin research* 2001; 7(3): 167-202.
302. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology* 2003; 3(2): 169-76.
303. Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; 42(2): 145-51.
304. Voss S, Skerra A. Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein engineering* 1997; 10(8): 975-82.
305. Goldring MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Current rheumatology reports* 2000; 2(6): 459-65.
306. Guerne P, Carson D, Lotz M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *The Journal of Immunology* 1990; 144(2): 499-505.
307. Kenis G, Teunissen C, De Jongh R, Bosmans E, Steinbusch H, Maes M. Stability of interleukin 6, soluble interleukin 6 receptor, interleukin 10 and CC16 in human serum. *Cytokine* 2002; 19(5): 228-35.
308. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/technology* 1996; 14(1): 61.
309. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 2016; 537(7620): 347.
310. Ishida K, Acharya C, Christiansen BA, Yik JH, DiCesare PE, Haudenschild DR. Cartilage oligomeric matrix protein enhances osteogenesis by directly binding and activating bone morphogenetic protein-2. *Bone* 2013; 55(1): 23-35.
311. Paróczai C, Németh-Csóka M. Estimation of serum anticollagen and the antibodies against chondrocyte membrane fraction: their clinical diagnostic significance in osteoarthritis. *Clinical biochemistry* 1988; 21(2): 117-21.
312. Attur MG, Patel RN, Abramson SB, Amin AR. Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 1997; 40(6): 1050-3.
313. Honorati M, Bovara M, Cattini L, Piacentini A, Facchini A. Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002; 10(10): 799-807.
314. Deligne C, Casulli S, Pigenet A, et al. Differential expression of interleukin-17 and interleukin-22 in inflamed and non-inflamed synovium from osteoarthritis patients. *Osteoarthritis and cartilage* 2015; 23(11): 1843-52.
315. Haywood L, McWilliams D, Pearson C, et al. Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 2003; 48(8): 2173-7.
316. Revell PA, Mayston V, Lalor P, Mapp P. The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Ann Rheum Dis* 1988; 47(4): 300-7.
317. De Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, Van Osch GJ, et al. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis and cartilage* 2012; 20(12): 1484-99.
318. Sakkas LI, Platsoucas CD. The role of T cells in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 2007; 56(2): 409-24.

319. Saito I, Koshino T, Nakashima K, Uesugi M, Saito T. Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. *Osteoarthritis and cartilage* 2002; 10(2): 156-62.
320. Tosato G, Seamon KB, Goldman ND, et al. Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon-beta 2 (BSF-2, IL-6). *Science* 1988; 239(4839): 502-4.
321. Kopf M, Baumann H, Freer G, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994; 368(6469): 339.
322. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, et al. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science* 1994; 264(5158): 561-3.
323. Vernino L, McAnally L, Ramberg J, Lipsky P. Generation of nondividing high rate Ig-secreting plasma cells in cultures of human B cells stimulated with anti-CD3-activated T cells. *The Journal of Immunology* 1992; 148(2): 404-10.
324. Arkatkar T, Du SW, Jacobs HM, et al. B cell-derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 2017; 214(11): 3207-17.
325. Jego G, Palucka AK, Blanck J-P, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003; 19(2): 225-34.
326. Rousset F, Garcia E, Defrance T, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992; 89(5): 1890-3.
327. Doss F, Menard J, Hauschild M, et al. Elevated IL-6 levels in the synovial fluid of osteoarthritis patients stem from plasma cells. *Scandinavian journal of rheumatology* 2007; 36(2): 136-9.
328. Hermann E, Fleischer B, Mayet W, Poralla T. Correlation of synovial fluid interleukin 6 (IL-6) activities with IgG concentrations in patients with inflammatory joint disease and osteoarthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 1989; 7(4): 411-4.
329. Rincón M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* 1997; 185(3): 461-70.
330. Samoilova EB, Horton JL, Hilliard B, Liu T-ST, Chen Y. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *The Journal of Immunology* 1998; 161(12): 6480-6.
331. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383(6603): 787.
332. Noelle R, Snow E. T helper cell-dependent B cell activation. *The FASEB journal* 1991; 5(13): 2770-6.
333. Coffman RL, Seymour BW, Lebman DA, et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunological reviews* 1988; 102(1): 5-28.
334. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Current opinion in immunology* 2007; 19(3): 281-6.
335. Korn T, Mitsdoerffer M, Croxford AL, et al. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105(47): 18460-5.
336. Coutant F, Miossec P. Evolving concepts of the pathogenesis of rheumatoid arthritis with focus on the early and late stages. *Current opinion in rheumatology* 2020; 32(1): 57-63.
337. Bersellini Farinotti A, Wigerblad G, Nascimento D, et al. Cartilage-binding antibodies induce pain through immune complex-mediated activation of neurons. *The Journal of experimental medicine* 2019.
338. Cooper D, Duckett M, Petts V, Penny R. Corticosteroid enhancement of immunoglobulin synthesis by pokeweed mitogen-stimulated human lymphocytes. *Clinical and experimental immunology* 1979; 37(1): 145.
339. Chandler G, Wright V. Deleterious effect of intra-articular hydrocortisone. *The Lancet* 1958; 272(7048): 661-3.

340. Nandakumar KS. Pathogenic antibody recognition of cartilage. *Cell and tissue research* 2010; 339(1): 213.
341. Mewar D, Wilson A. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomedicine & pharmacotherapy* 2006; 60(10): 648-55.
342. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* 2011; 365(23): 2205-19.
343. Carlsen S, Nandakumar KS, Backlund J, et al. Cartilage oligomeric matrix protein induction of chronic arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 2008; 58(7): 2000-11.
344. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nature protocols* 2007; 2(5): 1269.
345. Vos I, Van Mol C, Trouw LA, et al. Anti-citrullinated protein antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA): diagnostic performance of automated anti-CCP-2 and anti-CCP-3 antibodies assays. *Clinical rheumatology* 2017; 36(7): 1487-92.
346. Van Venrooij WJ, Van Beers JJ, Pruijn GJ. Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. *Nature Reviews Rheumatology* 2011; 7(7): 391.
347. De Rycke L, Peene I, Hoffman I, et al. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Annals of the rheumatic diseases* 2004; 63(12): 1587-93.
348. Morgan K, Clague R, Collins I, Ayad S, Phinn S, Holt P. Incidence of antibodies to native and denatured cartilage collagens (types II, IX, and XI) and to type I collagen in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 1987; 46(12): 902-7.
349. Stuart JM, Huffstutter EH, Townes AS, Kang AH. Incidence and specificity of antibodies to types I, II, III, IV, and V collagen in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases as measured by 125I-radioimmunoassay. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 1983; 26(7): 832-40.
350. Sapir T, Shoenfeld Y. Facing the enigma of immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulin. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2005; 29(3): 185-99.
351. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Carbonneil C, et al. Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2003; 101(2): 758-65.
352. Snowden N, Reynolds I, Morgan K, Holt L. T cell responses to human type II collagen in patients with rheumatoid arthritis and healthy controls. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 1997; 40(7): 1210-8.
353. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior research methods* 2007; 39(2): 175-91.
354. Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian journal of statistics* 1979: 65-70.
355. Kowalski A, Enck P. Statistische Methoden bei Mehrfachtestung—die Bonferroni-Korrektur. *PPmP-Psychotherapie· Psychosomatik· Medizinische Psychologie* 2010; 60(07): 286-7.
356. Grodzicki RL, Steere AC. Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease. *Journal of Infectious Diseases* 1988; 157(4): 790-7.

